

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA SANTOS CAVALCANTI BREGINSKI

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HLA-G EM CARCINOMAS DUCTAIS
INFILTRANTES MAMÁRIOS

CURITIBA
2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

FERNANDA SANTOS CAVALCANTI BREGINSKI

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE HLA-G EM CARCINOMAS DUCTAIS
INFILTRANTES MAMÁRIOS

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de concentração em Genética.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Bicalho
Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro

CURITIBA
2014

Ao meu marido amado, Eduardo,
por sempre estar ao meu lado me
incentivando, apoiando e me
amando. Muito obrigado por tudo.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer às minhas orientadoras, Prof.^a Dr.^a Maria da Graça Bicalho e Prof.^a Dr.^a Enilze Ribeiro, pela dedicação, acompanhamento, ensinamentos, orientação científica e amizade. Gostaria de agradecer também à minha banca de acompanhamento, Prof.^a Dr.^a Maria Luiza Petzl-Erler e Prof. Dr. Iglénir João Cavalli pela disponibilidade, orientação e sugestões ao longo destes quatro anos.

À todo o pessoal do LIGH e do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, em especial à Lorhenn, muito obrigado por tudo.

Aos meus pais, obrigado pela vida, por sempre estarem ao meu lado, pelo amor, carinho, dedicação e amizade e por me tornarem a pessoa que sou hoje. Amo muito vocês.

Muito obrigado aos meus irmãos, Marcella e Raphael, pela amizade e carinho, amo vocês.

Aos meus sogros e cunhados por serem a minha segunda família, por todo o carinho e atenção, em especial a minha sogrinha que sei que sempre está olhando por nós, amo vocês.

Gostaria de agradecer à Deus pela vida e por tudo, em especial pelo meu marido Eduardo, que é tudo para mim.

Dúzinho, você é o amor da minha vida, sem você nada disso seria possível. Obrigado por sempre estar ao meu lado me ajudando, me incentivado, me respeitando, me dando carinho e me amando todos estes anos. Você é a razão do meu sorriso, da minha vontade de perseverar, obrigado por me fazer uma pessoa melhor. Obrigado por ser o melhor marido do universo! Não existem palavras para dizer o quanto amo você e o quanto você é importante para mim. Te amo infinitamente para sempre, muito obrigado por tudo, meu amor.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

A descoberta de novos marcadores moleculares como ferramentas no diagnóstico, prognóstico e tratamento de diversas doenças, incluindo o câncer, é de extrema importância. A proteína HLA-G apresenta função de imunotolerância, auxiliando as células tumorais a escaparem do reconhecimento e destruição pelo sistema imune. Níveis aumentados de expressão do produto do gene *HLA-G* já foram identificados e associados com piores prognósticos em diversos tipos de neoplasias malignas como no câncer de pulmão, colo-retal, mama, melanomas e leucemias, sendo, portanto considerado, um potencial marcador. Neste estudo a expressão de HLA-G foi analisada através da técnica de imunoistoquímica (IHQ) em 202 carcinomas ductais infiltrantes de mama (IDC) e 104 tecidos mamários normais emblocados em parafina. Dentre estas amostras, 64 IDC e 14 normais foram avaliados por PCR quantitativa em tempo real (RT-qPCR). Dos 202 IDC, 38 (18,8%) coraram positivamente para HLA-G. Diferentemente destes, somente uma (0,9%) das 104 amostras de tecido não tumoral corou positivamente para HLA-G ($p < 0,0001$). Os tumores triplo negativos (TNBC), geralmente mais agressivos, representavam 37 dos 202 IDC, sendo que destes 13 (35,1%) coraram positivamente para HLA-G ($p < 0,01$). Dos 64 IDC utilizados para a RT-qPCR, 11 (17,2%) eram positivos para HLA-G na IHQ. As 64 amostras de tecido mamário tumoral e 14 normais foram submetidas a uma primeira rodada de amplificação, onde não houve amplificação para o gene *HLA-G*, em nenhuma das amostras com exceção das amostras de placenta (controle positivo) e do gene *ACTB* (referência). Esta falha na primeira amplificação sugere que o *HLA-G* é pouco expresso em tecidos mamários e/ou que havia pouca quantidade de RNA nas amostras utilizadas para a sensibilidade do método. Uma reação de reamplificação foi então realizada somente nas amostras positivas para HLA-G na IHQ, resultando na amplificação de *HLA-G* em nove das 11 amostras de tecido mamário tumoral. Portanto, no presente estudo sugere-se uma nova padronização para a utilização de blocos histológicos na avaliação de expressão gênica de *HLA-G* em tumores mamários. Os achados deste estudo sugerem o HLA-G como um potencial marcador auxiliando no diagnóstico diferencial, no prognóstico e talvez no tratamento de pacientes com IDC, e mais especificamente naqueles com TNBC, através do uso de IHQ e possivelmente RT-qPCR.

Palavras-chave: HLA-G. Câncer de mama. Expressão gênica. TNBC. Marcadores moleculares.

ABSTRACT

The discovery of new clinical cancer biomarkers as aiding tools for diagnosis, prognosis and treatment is of great importance, where immunosurveillance molecules may be potential candidates. One such molecule is the HLA-G protein, which has an immunotolerant function, helping tumor cells escape immune recognition and destruction. Elevated levels of expression of the *HLA-G* gene product have already been identified in a variety of different cancers, such as melanoma, leukemia, lung, colorectal and breast cancers, where HLA-G has been considered a potential marker for malignancy. In this study HLA-G expression was analyzed in 202 invasive ductal breast carcinomas (IDC) and 104 normal breast formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (FFPE) by immunohistochemistry (IHC) and 64 IDC and 14 normal breast tissue by real time quantitative PCR (RT-qPCR). Of the 202 IDC, 38 (18.8%) stained positive for HLA-G IHC, whereas 164 (81.2%) stained negative. In contrast, only one (0.9%) of the 104 normal breast tissue samples stained positive for HLA-G ($p < 0.0001$). The more aggressive triple negative breast tumors (TNBC) composed 37 of the 202 IDC tumor samples, of which 13 (35.1%) stained positive for HLA-G IHC ($p < 0.01$). Of the 64 IDC tumor samples used in RT-qPCR, 11 (17.2%) stained positive for HLA-G IHC. The 64 IDC and 14 normal breast tissue controls were submitted to a first round of amplification, where there was no amplification of *HLA-G* in any of the tested samples, except for the positive placental control. The reference gene *ACTB* however was amplified in all samples. This first round of amplification suggested that *HLA-G* is expressed at extremely low levels in breast cancer tissue and/or that RNA quantity was scarce in samples used for the sensibility of the method. A second round of RT-qPCR was then performed using only the positively HLA-G stained samples. After re-amplification of these tumors, nine out of the 11 positively HLA-G stained samples showed *HLA-G* expression. The findings in this study suggest that HLA-G may be a useful marker in the differential diagnosis, prognosis and possibly treatment of both IDC breast cancer patients and in the more aggressive TNBC, through the use of IHC and possibly RT-qPCR.

Keywords: *HLA-G*. Gene expression. Breast cancer. TNBC. Molecular markers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2010, 2012 E 2014 DO NÚMERO DE CASOS NOVOS DE CÂNCER EM MULHERES NA POPULAÇÃO BRASILEIRA	17
FIGURA 2 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2014 DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100 MIL E DE NÚMERO DE NOVOS CASOS POR CÂNCER EM MULHERES NA REGIÃO SUL E CAPITAIS	17
FIGURA 3 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2014 DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100 MIL E DE NÚMERO DE NOVOS CASOS POR CÂNCER EM MULHERES DO ESTADO DO PARANÁ E CAPITAL, CURITIBA.....	17
FIGURA 4 - ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.....	19
FIGURA 5 - COMPONENTES ESTRUTURAIS DO HLA-I E II E SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES EM CÉLULAS T.....	29
FIGURA 6 - ESTRUTURA E EXPRESSÃO GÊNICA DO <i>HLA-G</i>	32
FIGURA 7 - ESTRUTURA GÊNICA DO <i>HLA-G</i> E TRANSCRIÇÃO.....	33
FIGURA 8 - ESTRUTURA PROTEICA DO <i>HLA-G</i> E SUA FUNÇÃO.....	35
FIGURA 9 - FUNÇÕES IMUNOREGULATÓRIAS MEDIADAS PELO <i>HLA-G</i> , CÉLULAS-ALVO E RECEPTORES.....	36
FIGURA 10 - <i>HLA-G</i> E IMUNOEDIÇÃO DO CÂNCER.....	39
FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE <i>HLA-G</i> EM DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER.....	40

LISTA DE ABREVIações

APC	- Células apresentadoras de antígenos
CDKs	- Quinases dependentes de ciclinas
cDNA	- DNA complementar
CK5/6	- Citoqueratina 5/6
CKIs	- Inibidores de quinases dependentes de ciclinas
CLDN	- Gene <i>Claudina</i>
DAB	- 3,3'-Diaminobenzidina
EGFR	- Receptor do fator de crescimento epidermal
ELISA	- Ensaio de imunoabsorção enzimática
FISH	- Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
GM-CSF macrófagos	- Fator estimulador de colônias de granulócitos-
HER-2/neu / ERBB2	- Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano
HLA	- Antígenos leucocitários humanos
HSE	- Elemento <i>heat shock</i>
IARC	- <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IDC	- Carcinoma ductal infiltrante
IFN	- Interferon
IHQ	- Imunoistoquímica
IL	- Interleucina
ILT	- <i>Immunoglobulin-like transcript</i>
INCA	- Instituto Nacional do Câncer
ISRE	- Elemento de resposta sensível a Interferon
kDa	- Kilo Daltons
KIR	- <i>Killer-cell immunoglobulin-like receptors</i>
LILBR	- <i>Inhibitory immunoglobulin-like receptors</i>
MHC	- Complexo principal de histocompatibilidade
mTOR	- <i>Mammalian target of rapamycin</i>
NK	- Células <i>Natural Killer</i>
OMS	- Organização Mundial da Saúde
pb	- Pares de bases
PCR	- Reação em cadeia de polimerase
PI3K /Akt	- <i>Phosphoinositide-3-kinase-protein kinase /Akt</i>
PRE	- Elemento de resposta ao RE
RA	- Receptor de andrógeno
RE	- Receptor de estrógeno
RNA _m	- RNA mensageiro
RP	- Receptor de progesterona
RRES	- Elementos de resposta <i>Ras</i>
RT-qPCR	- PCR quantitativa em tempo real com uso de transcriptase reversa
SOE	- Sem outra especificação
TNBC	- Tumores malignos de mama triplo negativos
UFPR	- Universidade Federal do Paraná

β 2M

- beta-2-microglobulina

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
2.1 INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CÂNCER DE MAMA NO BRASIL E NO MUNDO	15
2.2 ANATOMIA MAMÁRIA.....	18
2.3 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	20
2.4 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA	23
2.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) DO CÂNCER DE MAMA	24
2.6 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA (ASSINATURA GÊNICA)	25
2.7 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E SISTEMA HLA	27
2.7.1 HLA de Classe I (HLA-I)	27
2.7.2 HLA de Classe II (HLA-II)	28
2.8 HLA-G	29
2.8.1 Funções imunoregulatórias do HLA-G e interação com receptores .	33
2.8.2 Regulação da expressão do gene <i>HLA-G</i>	37
2.8.3 A expressão da molécula HLA-G e sua associação ao câncer	37
2.8.4 A expressão da molécula HLA-G no câncer de mama	40
3 JUSTIFICATIVA	44
4 OBJETIVOS	46
4.1 OBJETIVO GERAL	46
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	46
5 CAPÍTULO I – HLA-G EXPRESSION IN BREAST CANCER: HIGH POSITIVITY FREQUENCY IN TRIPLE NEGATIVE SUBGROUP.....	47
6 DISCUSSÃO GERAL	68
7 CONCLUSÕES.....	74
REFERÊNCIAS	76
APÊNDICES	90

1 INTRODUÇÃO

Com o aumento na incidência mundial de vários tipos de cânceres, em especial o câncer de mama, a comunidade científica vem tentando incessantemente identificar e descobrir novas vias e marcadores associados à detecção precoce, diagnóstico e prognóstico destas doenças. Determinados marcadores estão vinculados a diferentes tipos de tratamentos e condutas clínicas fazendo com que a pesquisa nesta área seja de extrema importância para a evolução científica e principalmente para que tratamentos melhores, mais adequados e específicos sejam desenvolvidos.

Especial atenção vem sendo dada ao câncer de mama principalmente pelo aumento significativo na incidência desta doença em mulheres ao redor do mundo nos últimos anos, aumento este da ordem de 20% desde 2008. Mais alarmante ainda é o fato de que o câncer de mama é o maior causador de mortes em mulheres (OMS, 2010; IARC, 2013).

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, intimamente relacionada à estrutura da glândula mamária que gera diversos tipos tumorais. Os tumores mamários podem ser originados tanto do epitélio glandular quanto do epitélio de revestimento papilar ou metaplásico, assim como do seu estroma. Cerca de 95% dos tumores malignos são originados do epitélio glandular mamário sendo então denominados de adenocarcinomas. Estes são classificados em dois grandes grupos conhecidos como carcinomas ductais sem outra especificação (SOE) e tipos especiais de carcinomas, sendo ainda subclassificados em *in situ* ou infiltrantes (AMBS, 2010; BOYD *et al.*, 2010; ASSI *et al.*, 2013).

Os tumores malignos de mama podem também ser subdivididos de acordo com o seu *status* hormonal e presença de amplificação *ERBB2* (também conhecido como HER2 ou NEU). Mais recentemente, as neoplasias malignas da mama de origem epitelial vêm sendo classificadas de acordo com seu perfil molecular como basalóides, com superexpressão de HER2 (HER2 *enriquecido*), luminal A e luminal B, *claudin-low*, interferon, apócrino e tecido mamário normal símile constituindo-se em ferramentas importantes no

prognóstico e tratamento da doença (BUCHHOLZ e WAZER, 2002; WEIGELT *et al.*, 2008; ADLY *et al.*, 2010; LEHMANN-CHE *et al.*, 2013).

Fatores genéticos têm imensa contribuição no desenvolvimento do câncer de mama. A idade, dieta, alcoolismo, tabagismo, sedentarismo e exposição hormonal, são também alguns fatores contribuintes para o desenvolvimento da doença. Em termos genéticos os cânceres de mama são divididos em hereditários e esporádicos, sendo a grande maioria esporádica, correspondendo a 95% dos casos, sendo multifatoriais. Entre os genes relacionados ao câncer de mama hereditário estão os conhecidos *BRCA1*, *BRCA2*, *BRCA3* além de *TP53*, *PTEN* e *ATM* entre outros (DE MOURA GALLO *et al.*, 2005; ECCLES *et al.*, 2007). Já o tipo esporádico de câncer de mama pode ser causado pelos genes *TNFA*, *TNFR1* e *HSP70-2* entre outros (BUCHHOLZ e WAZER, 2002; DE MOURA GALLO *et al.*, 2005).

Sabendo-se que o sistema imune tem papel importante na prevenção e eliminação de tumores, este reconheceria células tumorais e as destruiria evitando a formação de tumores propriamente ditos (UROSEVIC e DUMMER, 2008; AMIOT *et al.*, 2011). Em contrapartida ocorrem falhas no sistema imune que permitem a evasão das células tumorais do ataque imunológico, levando à evolução tumoral com acúmulo de mutações no DNA, modificações epigenéticas e de expressão gênica, que poderiam modular a expressão de antígenos tumorais específicos, como por exemplo, o antígeno leucocitário humano HLA-G (DUNN *et al.*, 2002; DUNN *et al.*, 2004; UROSEVIC e DUMMER, 2008; AMIOT *et al.*, 2011).

O gene *HLA-G* faz parte do HLA-I não-clássico, expresso em tecidos de origem fetal e em tecidos adultos imunoprivilegiados (córnea, timo, ilhotas pancreáticas, tecidos epiteliais e endoteliais e em células de linhagem eritropoética), promovendo a tolerância imunológica. Posteriormente, o *HLA-G* foi encontrado expresso após transplantes, infecções virais, processos e doenças inflamatórias e autoimunes bem como variados tipos de câncer (SHIH, 2007). As funções imunoregulatórias do *HLA-G* são realizadas através da inibição de diferentes células imunocompetentes através de seus receptores *ILT-2* (CD85j, *LILRB1*), *ILT-4* (CD85d, *LILRB2*), *KIR2DL4* (CD158d), *CD160* e *CD8*. Assim a molécula *HLA-G* vem sendo relacionada à indução de apoptose, citotoxicidade, diferenciação, inibição de proliferação celular e ainda modulação

da liberação de citocinas (MCMASTER *et al.*, 1998; MENIER *et al.*, 2008; MORANDI *et al.*, 2010; AMIOT *et al.*, 2011; BRENOL *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2013).

A molécula HLA-G também pode exercer sua função imunossupressora através de mecanismos indiretos como a modulação de outros componentes do sistema imune e também através da trogocitose. Ainda, a regulação do próprio *HLA-G* pode ser feita pela secreção de citocinas e também através da regulação da expressão gênica desta molécula, pelo controle da transcrição, estabilidade do RNA mensageiro (RNAm), tradução e modificações pós-traducionais (CAROSELLA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2007).

Conseqüentemente, o *HLA-G* tornou-se um interessante alvo no estudo de lesões malignas, onde os tumores expressariam esta molécula e assim não seriam reconhecidos pelo sistema imunológico resultando no desenvolvimento e progressão tumoral (SINGER *et al.*, 2003; YIE *et al.*, 2006; SHIH, 2007; MENIER *et al.*, 2008; SAYED *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2010). No câncer de mama o *HLA-G* vem sendo estudado quanto ao seu potencial como biomarcador prognóstico, diagnóstico e terapêutico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

O câncer de mama consiste em um grupo heterogêneo de tumores devido a distintas características histológicas, patológicas e genéticas, além de diferente resposta a tratamentos e intervalo livre de doença. Nas últimas décadas, a importância do câncer de mama vem sendo enfatizada pela comunidade científica e pela prática médica não somente devido ao seu impacto social, mas também devido aos importantes avanços da biologia molecular. A mesma atenção é dada pela população em geral que vem sendo conscientizada pelas intensas campanhas preventivas e aumento na incidência mundial.

O aumento na incidência deve-se, em grande parte a mudanças socioeconômicas bruscas, em especial em países em desenvolvimento, que levariam a alterações nos hábitos de vida, no perfil epidemiológico da população nas últimas décadas, na história reprodutiva das mulheres globalmente, além do desenvolvimento e aprimoramento diagnóstico através de técnicas de imagem (PAULINELLI *et al.*, 2005).

2.1 INCIDÊNCIA E MORTALIDADE DO CÂNCER DE MAMA NO BRASIL E NO MUNDO

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum no mundo sendo o mais frequente em mulheres. Segundo o banco de dados da *International Agency for Research on Cancer* (IARC), GLOBOCAN, 1.7 milhões de mulheres foram diagnosticadas com câncer de mama no mundo em 2012, representando um em cada quatro casos de cânceres (IARC, 2013). A incidência e mortalidade de câncer de mama apresentaram aumento de mais de 20% e 14%, respectivamente, desde estimativas de 2008. É ainda importante salientar que esta doença é a maior causadora de mortes em mulheres sendo responsável por mais de 522.000 mortes somente em 2012 (PARKIN *et al.*, 2005; OMS, 2010).

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a estimativa de novos casos de câncer de mama no Brasil para 2014 é de 57.120

apresentando um aumento quando comparado às estimativas para 2010 e 2012 que correspondiam a 49.240 e 52.680, respectivamente (FIGURA 1) (INCA, 2010; 2012; 2014).

Não considerando os tumores de pele não-melanoma, o câncer de mama é o tipo de câncer mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (71,18/100.000) e Sul (70,98/100.000) seguidos do Centro-Oeste (51,30/100.000), Nordeste (36,74/100.000) e Norte (21,29/100.000) (INCA, 2014). Entre todas as regiões, comparativamente às estimativas de 2012 (65/100.00), o Sul apresentaria o maior aumento na incidência para o ano de 2014, atingindo 10.370 novos casos de câncer de mama (FIGURA 2) (INCA, 2014). Dentre estes números, o estado do Paraná atingiria 3.490 e a capital Curitiba 910 novos casos (FIGURA 3) (INCA, 2014).

Entre os países desenvolvidos, a Bélgica apresentou maior incidência de casos de câncer de mama em 2012 (111,9/100.000), seguida da Dinamarca e França (IARC, 2013).

Os índices globais de sobrevivência para o câncer de mama apresentam grande variação. Em países desenvolvidos a sobrevida em um, cinco, dez e 20 anos é de 95.8%, 85.1%, 77% e 65%, respectivamente (INCA, 2014). A sobrevida relativa para o câncer de mama é de 5 anos, sendo maior na América do Norte, Japão, Austrália e regiões do norte, sul e oeste da Europa. Já no Brasil, Argélia e leste Europeu a sobrevida é menor (COLEMAN *et al.*, 2008). Em países de renda média o índice de sobrevida de cinco anos é de 60% e nos países de renda baixa este é menor que 40% (COLEMAN *et al.*, 2008).

Esta variação se deve à redução da mortalidade estar intimamente ligada a fatores de prevenção, detecção precoce e tratamentos adequados, refletindo em mais de 50% dos casos serem encontrados em países industrializados e desenvolvidos (PARKIN *et al.*, 2005).

Apesar do câncer de mama ter bom prognóstico, quando diagnosticado e tratado precocemente, as taxas de mortalidade no Brasil ainda permanecem elevadas, em consequência do diagnóstico em estágios avançados.

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos		
	2014	2012	2010
Mama Feminina	57.120	52.680	49.240

FIGURA 1 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2010, 2012 E 2014 DO NÚMERO DE CASOS NOVOS DE CÂNCER DE MAMA EM MULHERES NA POPULAÇÃO BRASILEIRA.
 FONTE: Instituto Nacional do Câncer – INCA (2010, 2012 e 2014)

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Mulheres			
	Estados		Capitais	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	10.370	70,98	2.240	112,73

FIGURA 2 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2014 DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100 MIL E DE NÚMERO DE NOVOS CASOS POR CÂNCER EM MULHERES NA REGIÃO SUL E CAPITAIS
 FONTE: Instituto Nacional do Câncer – INCA (2014)

Localização Primária da Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Mulheres			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	3.490	61,74	910	92,47

FIGURA 3 - ESTIMATIVAS PARA O ANO DE 2014 DAS TAXAS BRUTAS DE INCIDÊNCIA POR 100 MIL E DE NÚMERO DE NOVOS CASOS POR CÂNCER EM MULHERES DO ESTADO DO PARANÁ E CAPITAL, CURITIBA.
 FONTE: Instituto Nacional do Câncer – INCA (2014)

2.2 ANATOMIA MAMÁRIA

A mama é composta por tecido epitelial especializado e estroma, contendo de seis a 10 sistemas de ductos maiores. Estes por sua vez, levam a unidade ducto-lobular terminal. Na mama adulta os ductos terminais espalham-se em grupamentos de pequenos ácinos formando o lóbulo mamário. Dois tipos de células compõem ambos os ductos e lóbulos: células mioepiteliais contrácteis e células epiteliais luminais. As células mioepiteliais encontram-se junto à membrana basal e através de sua capacidade contrátil auxiliam na amamentação e suporte estrutural dos lóbulos. Já as células luminais encontram-se sobre as células mioepiteliais e são os únicos tipos de células que produzem o leite. Os dois tipos celulares, células mioepiteliais e luminais, derivam de uma célula-tronco progenitora encontrado no ducto terminal (FIGURA 4) (DIMRI *et al.*, 2005; ROBBINS *et al.*, 2010).

Existem também dois tipos de estroma: interlobular e intralobular. O estroma interlobular consiste em tecido conjuntivo denso e fibroso juntamente a tecido adiposo. Já o estroma intralobular envolve os ácinos dos lóbulos, sendo composto de fibroblastos e linfócitos (DIMRI *et al.*, 2005; ROBBINS *et al.*, 2010).

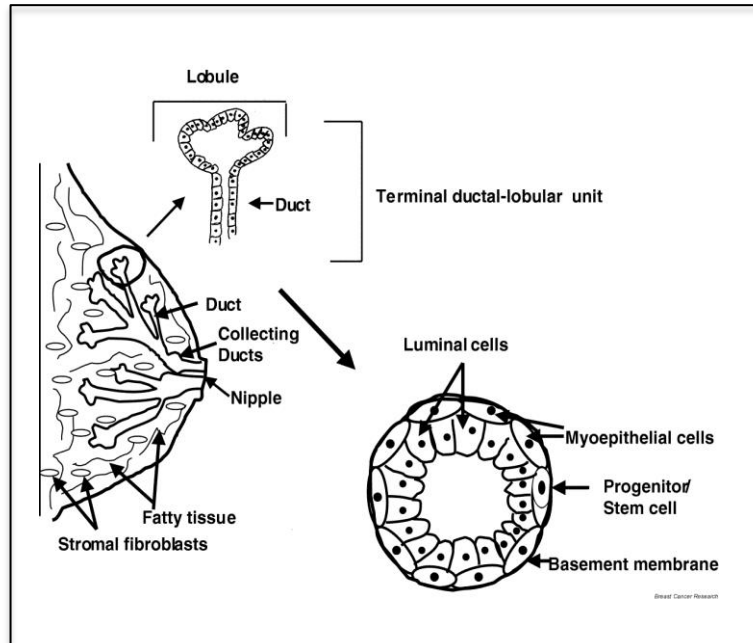


FIGURA 4 - ESTRUTURA DA GLÂNDULA MAMÁRIA.

FONTE: Dimri *et al.*, 2005.

NOTA: Estrutura da glândula mamária demonstrando a unidade terminal do ducto-lobular, composta das células ductais. Estroma composto por adipócitos e fibroblastos. Ducto normal formado pelas células luminiais e mioepiteliais.

2.3 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama, como os outros tipos de cânceres, é resultante da interação de fatores genéticos e epigenéticos, ambientais, sociais e características e hábitos individuais que tem efeitos cumulativos, dando origem ao seu desenvolvimento (PARKIN *et al.*, 2005). Além disso, o aparecimento do câncer é influenciado pelo organismo do indivíduo que está sendo afetado já que cada um responde aos agentes mutagênicos endógenos e exógenos de modo diferente.

Os cânceres de mama hereditários correspondem a somente 5% dos casos, enquanto os casos esporádicos compõem a maioria atingindo os 95% (ECCLES *et al.*, 2007). O tipo hereditário é associado a uma gama muito variada de genes, entre eles: *BRCA1*, *BRCA2*, *BRCA3*, *TP53*, *BRCATA*, *PTEN*, *STK11*, *BRIP1*, *RB1CC1*, *CHEK2*, *CDH1*, *PALB2* e *ATM* (DE MOURA GALLO *et al.*, 2005; ECCLES *et al.*, 2007). Já o câncer de mama do tipo esporádico é multifatorial podendo ser causado pelos genes *TNFA*, *TNFR1* e *HSP70-2*, entre outros associado aos fatores ambientais (BUCHHOLZ e WAZER, 2002; DE MOURA GALLO *et al.*, 2005).

A história familiar é um dos fatores de risco de maior importância no desenvolvimento do câncer de mama. Um histórico de câncer de mama em parentes de primeiro grau aumenta a probabilidade de desenvolvimento da doença em aproximadamente 13%. Já um histórico de câncer de mama em mais de um parente de primeiro grau diagnosticado durante o período pré-menopausa aumenta esta probabilidade para aproximadamente 21%. É importante ainda acrescentar que casos de câncer de mama bilateral e de câncer de mama em homens da família também são fatores que contribuem para um aumento no risco de desenvolvimento desta doença (DE MOURA GALLO *et al.*, 2005; METCALFE *et al.*, 2009).

O desenvolvimento do câncer de mama, como grande parte de outros tipos de tumores malignos, é o resultado de alterações celulares decorrentes de mutações genéticas em etapas de importância para a manutenção da homeostase celular. Estas alterações celulares estão relacionadas a dois tipos de genes que podem encontrar-se mutados e que são responsáveis pelo

controle da divisão e diferenciação celular: os oncogenes e os genes supressores de tumor.

Os proto-oncogenes são genes atuam na regulação do ciclo celular. Quando mutados, são denominados de oncogenes, podendo ativar e promover a divisão celular. Os produtos dos oncogenes podem atuar como sinalizadores no estímulo de certas atividades celulares, como receptores de sinais ou como agentes intracelulares que transportam e comunicam estes sinais até o núcleo, ou ainda como fatores de transcrição que estimulam a expressão gênica. Os produtos dos proto-oncogenes desempenham papel importante na regulação de atividades celulares (OSBORNE *et al.*, 2004).

Entre os oncogenes mais conhecidos relacionados ao surgimento e progressão do câncer de mama está o *ERBB2 (HER2)*. Este se encontra amplificado em cerca de 20 a 30% dos casos de câncer de mama primários que tem características mais agressivas. Este gene faz parte da família *ERBB* de genes que atuam como receptores transmembrana com atividade tirosina quinase. Estes receptores podem fosforilar outras proteínas que regulam a expressão de genes envolvidos em processos de crescimento e divisão celular, e atuar como transdutores de sinais até o núcleo (HOWE e BROWN, 2011).

Além deste, outros membros da família *ERBB (HER)*, como o receptor de fator de crescimento epitelial (*EGFR / HER1*) e *HER4* estão envolvidos no desenvolvimento de tumores que apresentam um prognóstico clínico desfavorável. Algumas vias de sinalização intracelular tem papel importante no controle transcricional e traducional de genes envolvidos no controle e progressão do ciclo celular, como a via PI3K/AKT/mTOR (CARRAWAY e HIDALGO, 2004).

Na classe dos proto-oncogenes, estão as ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDKs), responsáveis pelo eficiente controle do ciclo celular. A progressão do ciclo celular é realizada pelas ciclinas e CDKs. As duas formam um complexo que gera a progressão e controle do ciclo celular onde a fosforilação e ativação das CDKs ocorre somente na presença das ciclinas (FOSTER *et al.*, 2001).

Os genes supressores de tumor inibem ou reprimem a proliferação celular através do controle do ciclo celular ou promovendo a apoptose. Quando mutados estes genes deixam de prevenir a divisão celular (OSBORNE *et al.*,

2004). Os genes supressores de tumor mais conhecidos envolvidos no desenvolvimento do câncer de mama são o *TP53*, *BRCA1*, *BRCA2*, *p27*, *SKp2*, *PTEN*, *SYK*, *NES1*, *DBC2*, *TSG101* (SASCO, 2001; BUCHHOLZ e WAZER, 2002). Mutações no *TP53* são encontradas em aproximadamente 20 a 30% dos tumores malignos de mama, atuando na regulação da divisão celular, podendo ainda determinar a transcrição de uma série de genes envolvidos no ciclo celular. A proteína p53 codificada pelo *TP53* tem papel importante nas respostas celulares ao stress. Em células normais os níveis de p53 encontram-se baixos, ao tratar as células com agentes mutagênicos este nível se eleva rapidamente. Assim, em resposta ao dano no DNA a p53 é fosforilada e assim ativada. Uma vez ativada ela pode gerar dois tipos de estímulos. O estímulo da transcrição de genes cujos produtos param o ciclo celular através da ativação da p21, inibidora do complexo ciclina/CDK, para que haja o reparo de DNA. O segundo estímulo pode ser a ativação de genes cujos produtos causam a apoptose através da indução da proteína BAX (OSBORNE *et al.*, 2004; DE MOURA GALLO *et al.*, 2005; FENG *et al.*, 2005).

Os genes supressores de tumor, *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por cerca de 45% dos casos de câncer de mama em famílias com vários indivíduos afetados podendo atingir até 90% (EASTON *et al.*, 1993; PESHKIN *et al.*, 2010). O gene *BRCA1* encontra-se mutado em aproximadamente 5% dos casos de câncer de mama em mulheres abaixo dos 40 anos, no entanto, esta porcentagem se eleva para mais de 90% em casos em que há história familiar da doença, tendo quatro ou mais casos de câncer de mama e mais de um caso de câncer de ovário (OSBORNE *et al.*, 2004). Já o gene *BRCA2*, quando mutado, é responsável por 20% dos casos de câncer de mama hereditário (OSBORNE *et al.*, 2004; NAROD e OFFIT, 2005). Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são responsáveis por várias funções celulares, como o reparo de DNA por recombinação homóloga, estabilidade genômica, regulação transcricional, ubiquitinação proteica, remodelamento cromatínico e controle do ciclo celular (VENKITARAMAN, 2002; NAROD e FOULKES, 2004).

O câncer de mama também pode ser causado por uma variedade de outros fatores sendo considerado multifatorial. Fatores endógenos e exógenos como hábitos nutricionais / dieta, consumo de álcool, idade, exposição a radiação, tabagismo, sedentarismo, diagnóstico confirmado de hiperplasia

atípica, aumento da densidade mamária, história de menarca precoce ou menopausa tardia, terapia hormonal pós-menopausa, nuliparidade ou primeira gravidez após os 30 anos de idade, amamentação, uso de contraceptivo oral (estrógeno e progesterona), obesidade pós-menopausa, ingestão de certos medicamentos, como por exemplo, o clorambucil e ciclofosfamida e certos agentes biológicos podem atuar no desenvolvimento da doença (SASCO, 2001; NAROD e OFFIT, 2005; PAULINELLI *et al.*, 2005; LORINCZ e SUKUMAR, 2006).

A idade constitui um dos fatores de risco de maior importância no desenvolvimento do câncer de mama, com um aumento da probabilidade, a partir de 30 anos de idade. Dos 30 aos 39 anos de idade o risco absoluto de desenvolvimento de câncer de mama é de uma em cada 227 mulheres ou 0,44%. Dos 40 aos 49 anos este risco aumenta para uma em cada 68 mulheres ou 1,47%, alcançando uma em cada 42 mulheres ou 2,38% dos 50 aos 59 anos. O risco absoluto atinge, então, o seu pico na faixa etária dos 60 aos 69 anos, com uma em cada 28 mulheres ou 3,56%, sendo a idade média de diagnóstico de 64 anos de idade (LI *et al.*, 2005b).

Além da idade, outro fator de risco de extrema importância é a exposição ao estrógeno, correlacionada à história reprodutiva, onde a menarca precoce, menopausa tardia, primeira gravidez após os 30 anos de idade, nuliparidade, amamentação, uso de contraceptivos orais compostos de altos níveis de estrógeno ou progesterona (embora os estudos ainda não sejam conclusivos quanto a esta questão) e reposição hormonal, afetam diretamente os níveis de estrogênio circulante, que é diretamente associado ao desenvolvimento do câncer de mama.

2.4 CLASSIFICAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DO CÂNCER DE MAMA

A classificação dos tumores malignos de mama ocorre tanto de acordo com os aspectos histopatológicos quanto com a sua origem.

A grande maioria, cerca de 95%, dos tumores malignos de mama são adenocarcinomas e tem origem no epitélio glandular mamário (VIEIRA *et al.*, 2008). Estes são classificados em dois grupos conhecidos como carcinomas ductais (sem outra especificação - SOE) e tipos especiais de carcinomas

(WEIGELT *et al.*, 2008). Estes por sua vez, podem ainda ser subclassificados como *in situ* ou infiltrantes (invasivos). Os tumores *in situ* são aqueles confinados a estrutura glandular mamária, englobados e circundados por membrana basal íntegra o que não lhes confere capacidade metastatizante. Constituem de 15 a 30% dos casos. Já os tumores infiltrantes, que correspondem a 70 a 85% dos casos, exibem interrupção ou quebra desta barreira biológica estrutural invadindo o estroma adjacente às glândulas mamárias o que subsequentemente lhes confere capacidade de comprometimento de metastatização/comprometimento secundário de linfonodos e órgãos à distância (YERUSHALMI *et al.*, 2009). De acordo com Weigelt e colaboradores, os tumores ductais infiltrantes não especificados correspondem a 50-80% dos casos de carcinomas invasivos de mama, enquanto os tumores lobulares infiltrantes correspondem a 5-15% dos casos (WEIGELT *et al.*, 2008). Além destes tumores invasivos, existem também os tumores ducto-lobulares, mucinosos, tubulares, medulares e papilíferos que correspondem a 7, 2,4, 1,5, 1,2 e 1% dos tumores invasivos de mama, respectivamente (LI *et al.*, 2005a).

Aproximadamente 5% dos tumores malignos de mama são carcinomas de células escamosas, tumores filóides, sarcomas ou metástases secundárias no tecido mamário (VIEIRA *et al.*, 2008).

De acordo com a sua morfologia os carcinomas invasivos e *in situ* de mama, são graduados de acordo com seu grau de diferenciação. Estes podem ser G1, G2 e G3, sendo bem, moderadamente e pouco diferenciados, respectivamente (SCHNITT, 2010). Em relação aos tumores infiltrantes tal subdivisão leva em consideração tanto o grau nuclear como a quantidade de túbulos formados e o índice mitótico. No que concerne aos tumores *in situ* os parâmetros observados são o grau nuclear e presença ou não de necrose.

2.5 CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA (IHQ) DO CÂNCER DE MAMA

Os tumores malignos da mama podem também ser subdivididos de acordo com o seu *status* hormonal e presença de hiperexpressão de HER2 de acordo com a técnica de imunoistoquímica (IHQ). Os tumores são considerados hormônios dependentes ou não de acordo com a positividade ou

não quanto ao receptor de estrógeno (RE) / receptor de progesterona (RP). Em relação à expressão de HER2, as lesões podem demonstrar sua hiperexpressão ou não sendo consideradas HER2 negativas ou positivas (CARIATI e PURUSHOTHAM, 2008). Esta estratificação auxiliou os clínicos e a comunidade científica a melhor entender as diferenças moleculares e a heterogeneidade dos variados tipos de câncer de mama, possibilitando um tratamento mais adequado e específico.

Conseqüentemente, cada subtipo de tumor apresenta uma resposta específica a determinados tratamentos de acordo com a sua expressão hormonal, como os tumores RE+ que geralmente respondem a terapias anti-estrógeno ou terapias endócrino-hormonais, fazendo uso de bloqueadores hormonais como, o mais frequentemente utilizado, o medicamento Tamoxifeno (ELLIS, 2004; GOMEZ *et al.*, 2007; RIGGINS *et al.*, 2007; COLEY, 2008; DEAN-COLOMB e ESTEVA, 2008; YAMASHITA, 2008). Tumores positivos para a amplificação do gene do receptor HER2 são na grande maioria tratados com terapia-alvo utilizando o anticorpo monoclonal Trastuzumab (*Herceptin*®) que se liga ao receptor gerando a inibição da proliferação celular (DEAN-COLOMB e ESTEVA, 2008). Já os tumores triplo negativos, também conhecidos como TNBC, são negativos para os três marcadores imunohistoquímicos, RE, RP e HER2. Estes, por sua vez, constituem um grupo bastante heterogêneo de tumores, são mais difíceis de tratar, apresentando geralmente pior prognóstico, já que são na sua grande maioria tumores usualmente mais agressivos e que não respondem às terapias citadas acima (RING e DOWSETT, 2004).

2.6 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA (ASSINATURA GÊNICA)

Recentemente, com o desenvolvimento e aprimoramento de técnicas moleculares e conseqüente descoberta de novos marcadores surgiu uma nova classificação para o câncer de mama baseada nos padrões de expressão gênica através da utilização de microarranjos de DNA complementar (cDNA), denominada de classificação molecular (PEROU *et al.*, 2000). Foram

identificados cinco grupos significativos de expressão gênica para o câncer de mama classificados como basalóides, HER2 enriquecidos, luminal A e luminal B e tecido mamário normal símile (SØRLIE *et al.*, 2001). Muito embora este último subgrupo tem levantado suspeitas de que as amostras utilizadas na determinação deste subtipo foram contaminadas por tecido mamário normal (HU *et al.*, 2006). Posteriormente, através de novos estudos, foram propostas duas novas categorias, denominadas de interferon e *claudin-low* (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; HU *et al.*, 2006; OH *et al.*, 2006; PRAT *et al.*, 2010). O subtipo apócrino, foi identificado em 2005, compondo cerca de 10% dos TNBC (FARMER *et al.*, 2005; SANGA *et al.*, 2009).

Os tumores basalóides são, em geral, negativos para RE e HER2, podendo ser positivos para CK5/6 ou EGFR, muitas vezes designados como TNBC, já que em grande parte podem ser negativos para RP (AMBS, 2010). É importante salientar que os tumores basalóides são geralmente triplo negativos porém nem todo triplo negativo o é. Em relação aos tumores luminal A, estes são positivos para RE e/ou RP e negativos para HER2 e apresentam um índice proliferativo menor que 14%. Já os tumores Luminal B podem ser subdivididos em tumores que expressam RE e/ou RP e hiperexpressar o HER2 ou podem ainda ser RE e/ou RP positivos que não expressam HER2 e apresentam um índice proliferativo (Ki-67) maior ou igual a 14% (PEROU *et al.*, 2000). Como o próprio nome indica, o grupo dos tumores HER2 positivos apresenta amplificação deste gene e hiperexpressão da proteína, sendo negativos para RE e RP (PEROU *et al.*, 2000; AMBS, 2010). Os tumores ricos em interferon são caracterizados pela hiperexpressão de genes regulados pelo interferon (HU *et al.*, 2006). Os tumores *claudin-low* apresentam baixa expressão de genes *claudina* (*CLDN*), cujos produtos estão relacionados às proteínas de junção e adesão celular, claudinas-3, 4 e 7, assim como a e-caderina. Estes últimos são ainda tumores de pior prognóstico e fazem parte do heterogêneo grupo dos TNBC (PEROU *et al.*, 2000; HENNESSY *et al.*, 2009). Outra característica importante dos tumores *claudin-low* é que estes quase sempre apresentam intenso infiltrado de células linfocitárias. Estes também apresentam características semelhantes às células-tronco, já que podem expressar o mesmo perfil de marcadores relacionados a estas células, sendo CD44⁺CD24⁻/_{low} (PRAT *et al.*, 2010). O mais recentemente descrito grupo de tumores,

conhecidos como apócrino expressam o receptor de adrógeno (RA), são negativos para os receptores hormonais, podendo expressar ou não HER2 (FARMER *et al.*, 2005; SANGA *et al.*, 2009). Assim os TNBC podem ser enquadrados dentro da classificação molecular como basalóides, *claudin-low* ou ainda apócrinos.

2.7 COMPLEXO PRINCIPAL DE HISTOCOMPATIBILIDADE E SISTEMA HLA

O complexo principal de histocompatibilidade (MHC) foi primeiramente descrito em 1936 por George Snell através do estudo de transplantes teciduais em camundongos, onde foi investigada a importância deste complexo no sucesso ou não do tecido transplantado. O MHC é formado por um agrupamento de genes, sendo que os genes MHC de Classe I e II codificam moléculas responsáveis pela disponibilização de peptídeos estranhos na superfície celular, que por sua vez são reconhecidos pelas células T. Em humanos o MHC é conhecido pela sigla HLA (do inglês Human Leucocyte Antigen) ou antígeno leucocitário humano.

O HLA foi identificado através dos estudos de três pesquisadores, Jean Dausset, Rose Payne e Jon Van Rood em 1954, sendo constituído por genes localizados no braço curto do cromossomo 6 (6p21), composto de aproximadamente 4 milhões de pares de bases (pb) (DAUSSET, 1981; MEHRA, 2000; SHANKARKUMAR, 2004).

A principal função dos antígenos HLA consiste no controle do reconhecimento do próprio e conseqüente defesa contra organismos, sendo responsável por diversas funções relacionadas à defesa contra doenças autoimunes e virais, rejeição de transplantes, no combate e ao mesmo tempo indução de cânceres (BISHARA *et al.*, 1997; BADRISING *et al.*, 2004; BOTTLEY *et al.*, 2008; THORSBY, 2009).

2.7.1 HLA de Classe I (HLA-I)

Os antígenos da classe I ou HLA-I consistem em uma cadeia pesada de glicoproteína de 45 Kilodaltons (kDa) denominada cadeia alpha (α) e que

possui três domínios extracelulares (α_1 , α_2 e α_3). Estas formam heterodímeros associados de forma não covalente a uma cadeia leve de beta-2-microglobulina (β_2M) que tem função estrutural. Imagens tridimensionais da estrutura do HLA-I através de cristalografia de raios-X demonstram uma fenda na superfície da molécula entre os domínios α_1 e α_2 , utilizada no posicionamento de peptídeos processados (SHANKARKUMAR, 2004; CHOO, 2007) (FIGURA 5).

As proteínas ou antígenos HLA-I são expressos na superfície das células nucleadas tendo como principal função identificar e apresentar peptídeos endógenos que, por sua vez, são reconhecidos pelos receptores de células T CD8+, levando a sua ativação (BODMER, 1987; SHANKARKUMAR, 2004; MENIER *et al.*, 2008; THORSBY, 2009).

Esta classe de proteínas é codificada pelos genes *A*, *B*, *C*, *E*, *F* e *G* subdivididos em genes HLA-Ia clássicos (*HLA-A*, *HLA-B* e *HLA-C*) e HLA-Ib não-clássicos (*HLA-E*, *HLA-F* e *HLA-G*) (BODMER, 1987; SHANKARKUMAR, 2004; MENIER *et al.*, 2008; THORSBY, 2009). Os genes clássicos são polimórficos e polialélicos com ampla expressão tecidual, enquanto os genes não-clássicos são caracterizados por serem pouco polimórficos, apresentarem número reduzido de alelos e distribuição tecidual limitada (DA SILVA, *et al.*, 2013).

2.7.2 HLA de Classe II (HLA-II)

As moléculas HLA de Classe II ou HLA-II, são também heterodímeros compostos pela associação não covalente de cadeias polipeptídicas α e β glicosiladas inseridas na membrana plasmática (MENIER *et al.*, 2008). A fenda que serve de região de ligação de peptídeos é formada pelos domínios α_1 e β_1 e possui uma abertura maior permitindo a ligação e acomodação de peptídeos maiores (12 amino ácidos ou mais) (FIGURA 5) (CHOO, 2007).

A expressão de moléculas HLA-II é restrita às células apresentadoras de antígenos (APCs) que incluem os linfócitos B, monócitos/macrófagos e células dendríticas (BODMER, 1987). Diferentemente das moléculas do grupo HLA-I, os antígenos HLA-II apresentam peptídeos de proteínas extracelulares ou exógenas. Após a degradação e transporte destes peptídeos à superfície celular estes são reconhecidos pelos receptores de células T CD4+ gerando a

ativação das células T CD4+ (SHANKARKUMAR, 2004). Os principais genes da classe II são notadamente polimórficos (*HLA-DRA/DRB*, *HLA-DQA/DQB* e *HLA-DPA/DPB*) e codificam, respectivamente para as cadeias α e β das proteínas HLA-DR, HLA-DQ e HLA-DP (SHANKARKUMAR, 2004; VAN LITH *et al.*, 2010).

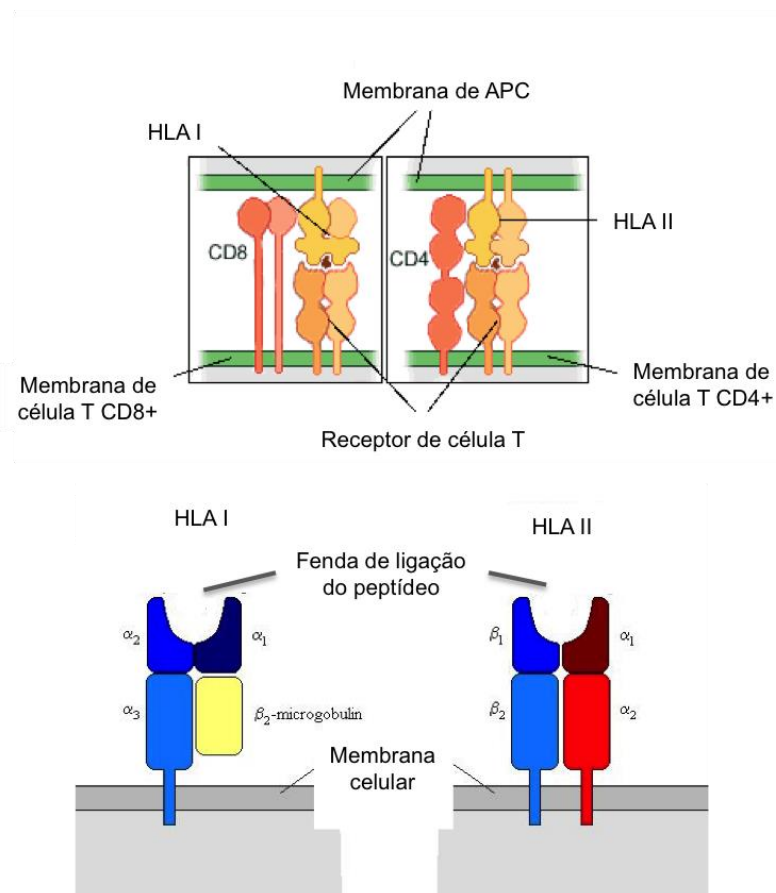


FIGURA 5 - COMPONENTES ESTRUTURAIS DO HLA-I E II E SEUS RESPECTIVOS RECEPTORES EM CÉLULAS T.
 FONTE: Adaptado de Klein e Sato, 2000.

2.8 HLA-G

Originalmente o gene *HLA-G* era supostamente expresso de forma seletiva no primeiro trimestre da gravidez em células placentárias. Sua presença em células do trofoblasto extraviloso e citotrofoblasto, teria papel importante na tolerância imunológica, promovendo a proteção do feto contra a resposta imunológica materna e determinando o sucesso ou não da gravidez

(KOVATS *et al.*, 1990; KIRSZENBAUM *et al.*, 1994; MENIER *et al.*, 2008; SAYED *et al.*, 2010). Na gravidez, a baixa expressão de *HLA-G* está intimamente associada à pré-eclâmpsia e abortos espontâneos recorrentes, sendo que uma maior expressão pelo trofoblasto tem sido associada com a proteção do feto contra a ação das células *Natural Killer* (NK) (MENIER *et al.*, 2008).

Estudos posteriores, demonstraram a expressão constitutiva do *HLA-G* em outros tecidos de origem fetal, tais como, nas células amnióticas e precursores eritróides, além de tecidos adultos imunoprivilegiados como a córnea, timo, ilhotas pancreáticas, tecidos epiteliais e endoteliais e em células de linhagem eritropoética (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005; AMIOT *et al.*, 2011). Além destes tecidos e órgãos o *HLA-G* foi encontrado expresso após transplantes, infecções virais, processos e doenças inflamatórias e autoimunes bem como variados tipos de câncer (SHIH, 2007; AMIOT *et al.*, 2011; KOCHAN *et al.*, 2013).

Com limitados 50 alelos descritos até o momento, que codificam 16 proteínas funcionais e duas proteínas modificadas por alelos nulos, o *HLA-G* é considerado um gene pouco polimórfico quando comparado a outros genes da classe I (*IGMT HLA nomenclature*, <http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>, acesso em Fevereiro de 2014).

O transcrito primário do *HLA-G* sofre *splicing* alternativo produzindo sete RNAm que codificam quatro proteínas ligadas à membrana (HLA-G1 – HLA-G4) e outras três solúveis/secretadas (sHLA-G5 –sHLA-G7), cuja expressão é tecido e fisiologicamente dependente (SAYED *et al.*, 2010).

Estruturalmente a molécula HLA-G assemelha-se às demais moléculas não-clássicas do HLA-I, podendo ser constituída de duas formas: uma cadeia pesada α , composta por três domínios (α_1 , α_2 e α_3) ligados de forma não covalente a uma cadeia de β_2M e um peptídeo, forma representada pelas isoformas HLA-G1 e HLA-G5; ausência de um ou dois domínios da cadeia pesada sem ligação com β_2M , geralmente menores e representadas pelas demais isoformas de HLA-G (AMIOT *et al.*, 2011; WANG *et al.*, 2013). Na primeira forma, o peptídeo situa-se na fenda entre os domínios α_1 e α_2 , e a ligação com co-receptores pode ocorrer através do domínio α_3 (CLEMENTS *et al.*, 2005; BRENOL *et al.*, 2012). A maior diversidade de aminoácidos é

observada nos domínios α_1 , α_2 e α_3 , enquanto que nas moléculas clássicas do HLA-I estes resíduos encontram-se principalmente no sítio de ligação dos peptídeos, ou seja, domínios α_1 e α_2 (CLEMENTS *et al.*, 2005; BRENOL *et al.*, 2012). Outra característica importante das moléculas HLA-G é a formação de heterodímeros com a cadeia β_2M , além da capacidade de formar homodímeros e tetrâmeros ativos e funcionais (KOCHAN *et al.*, 2013). Entre as isoformas, a molécula HLA-G1 é a única completa, enquanto que as demais contêm pelo menos um domínio α_1 (FIGURA 6) (BRENOL *et al.*, 2012).

O gene *HLA-G* exibe sete *introns* e oito *exons* que codificam a cadeia pesada α da molécula. O *exon* 1 codifica o peptídeo líder; os *exons* 2, 3 e 4 codificam os domínios extracelulares α_1 , α_2 e α_3 , respectivamente; os *exons* 5 e 6 codificam os domínios transmembrana e citoplasmáticos da cadeia α ; o *exon* 7 encontra-se sempre ausente do RNAm maduro; e o *exon* 8 não é traduzido, sendo hoje conhecido como a região 3' não traduzida (3'UTR) (CAROSELLA *et al.*, 2008). A região 3'UTR do *HLA-G* consiste em vários elementos regulatórios que incluem motivos ricos em AU, além de cauda poli-A (DA SILVA *et al.*, 2013). Vários estudos apontam um polimorfismo de deleção/inserção de 14 pares de nesta região, influenciando na estabilidade do RNAm do *HLA-G* e nos padrões de *splicing* alternativo, resultando na modulação dos níveis de expressão do *HLA-G* (FIGURAS 6 E 7 - D) (SHANKARKUMAR, 2004; DA SILVA *et al.*, 2013).

A região promotora deste gene apresenta sequências de intensificadores (*enhancers A - enhA*), S e X1 e alguns elementos regulatórios de transcrição. Ademais, vários elementos de resposta (*response elements*) são encontrados nesta região, dentre os quais estão o elemento *heat shock* (HSE), elemento de resposta sensível a interferon (IFN) (ISRE), elementos de resposta *Ras* (RRES) e elemento de resposta ao RP (PRE) (FIGURA 7 - C) (IBRAHIM *et al.*, 2000; LEFEBVRE *et al.*, 2002; YIE *et al.*, 2006; MOREAU *et al.*, 2009).

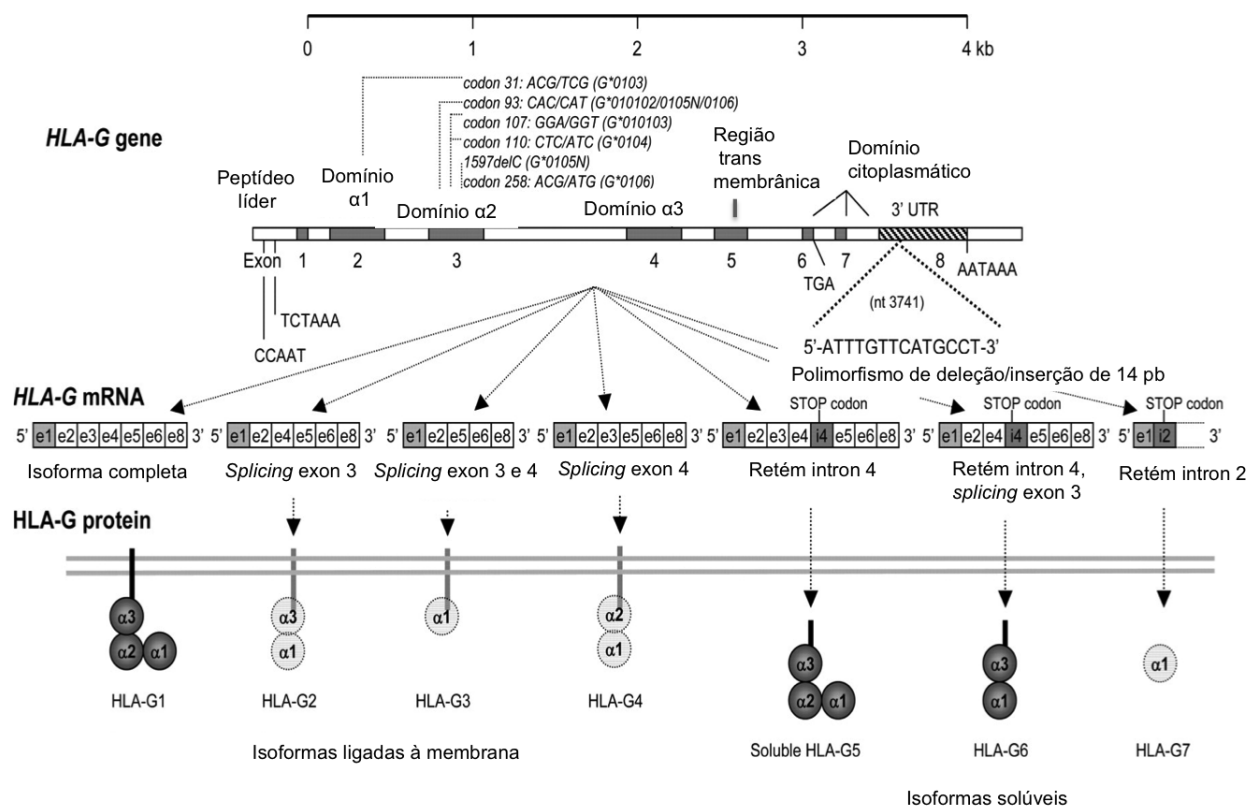


FIGURA 6 - ESTRUTURA E EXPRESSÃO GÊNICA DO *HLA-G*.

FONTE: Adaptado de Hviid, 2006.

NOTA: Estrutura gênica do *HLA-G* composta de 7 *introns* e 8 *exons*. Região 3'-UTR incluindo polimorfismo de deleção/inserção de 14 pb. RNAm formados por *splicing* alternativo, suas formas gênicas, estruturais e funcionais

Enquanto a molécula HLA-G1 contém todos os *exons*, a HLA-G2 não apresenta o *exon* 3, a HLA-G3 não apresenta o *exon* 3 e 4 e a HLA-G4 não apresenta o *exon* 4. As HLA-G1 a G4 são restritas à membrana devido à presença das caudas transmembrânicas e citoplasmáticas, codificadas pelos *exons* 5 e 6. A HLA-G6 não apresenta o *exon* 3, mas igualmente a HLA-G5 apresenta o *intron* 4, que por sua vez, dita a forma solúvel de ambas as moléculas. Assim como a HLA-G6, a HLA-G7 não apresenta o *exon* 3, porém retém o *intron* 2 que contém um códon prematuro de parada, conferindo a sua forma solúvel (FIGURA 7 – D) (KOCHAN *et al.*, 2013).

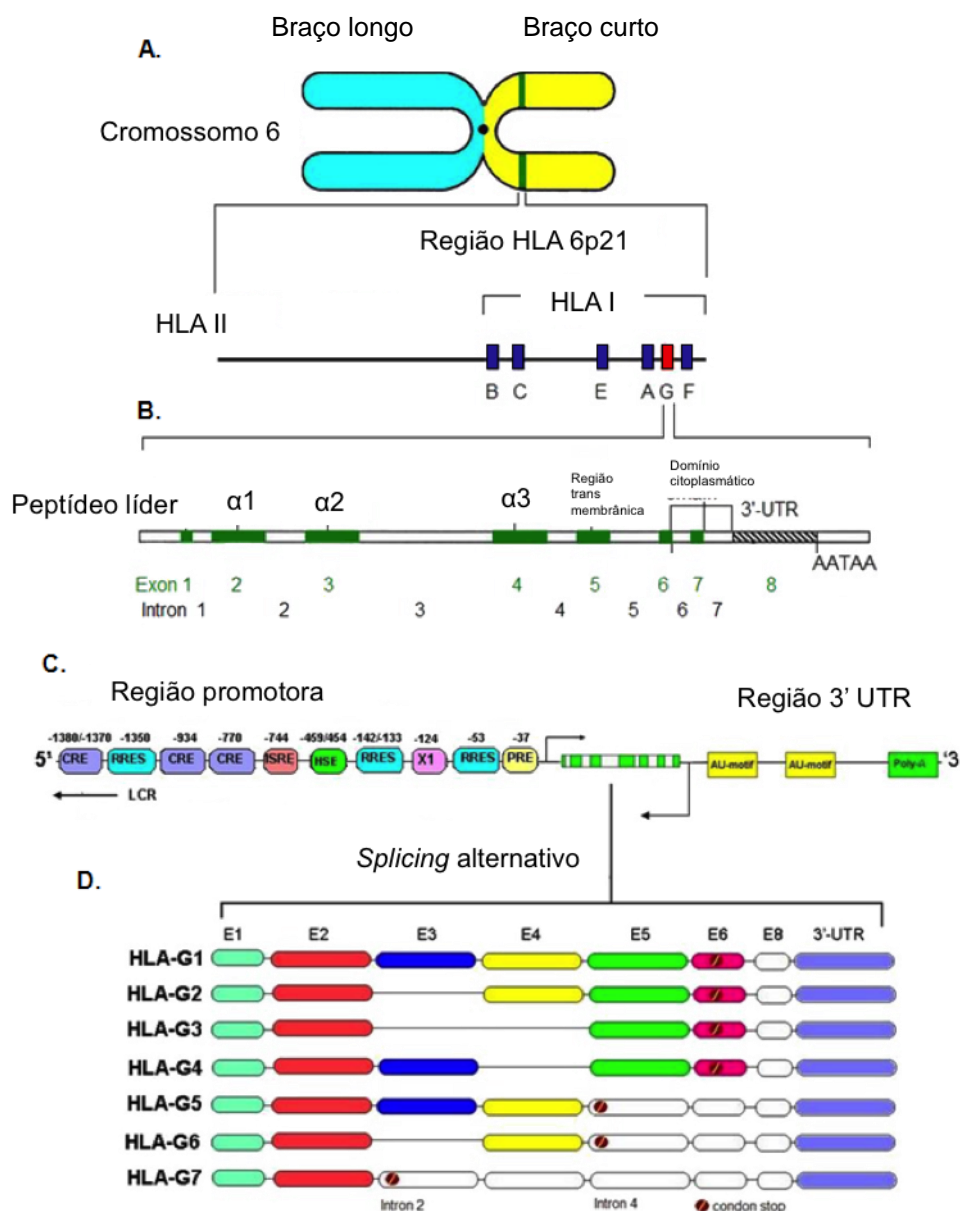


FIGURA 7 - ESTRUTURA GÊNICA DO *HLA-G* E TRANSCRIÇÃO.

FONTE: Adaptado de Yie, 2012.

NOTA: A. Localização do *HLA-G* no cromossomo 6. B. Estrutura gênica do *HLA-G* composta de 7 introns (em branco) e 8 exons (em verde). C. Região promotora do *HLA-G* demonstrando elementos regulatórios que controlam a transcrição gênica do *HLA-G* e região 3'-UTR incluindo motivos ricos em AU e cauda poli-A. CRE – elemento de resposta de AMP cíclico (AMPc); RRES – elementos de resposta RAS; ISRE – elemento de resposta sensível a interferon; HSE – elemento de resposta de *heat shock*; PRE – elemento de resposta ao RP; X1 para bloco X1. D. transcrito primário de *HLA-G* e *splicing* alternativo demonstrando sete RNAm de *HLA-G* 1 a -G7.

2.8.1 Funções imunoregulatórias do HLA-G e interação com receptores

A molécula HLA-G vem sendo relacionada à indução de apoptose, citotoxicidade, diferenciação, inibição de proliferação celular e ainda modulação da liberação de citocinas (FIGURAS 8 E 9) (MORANDI *et al.*, 2010).

As funções imunoregulatórias de HLA-G são realizadas através da inibição de diferentes células imunocompetentes. Este efeito inibitório, por sua vez, é mediado pela ligação direta das moléculas do HLA-G a receptores inibitórios do sistema imunológico, como os receptores de leucócitos tipo imunoglobulina ILT-2 (CD85j, LILRB1) e ILT-4 (CD85d, LILRB2) e o receptor tipo imunoglobulina de células *Killer* KIR2DL4 (CD158d), podendo ser também considerado um receptor ativador (MCMASTER *et al.*, 1998; MENIER *et al.*, 2008; AMIOT *et al.*, 2011; HOWANGYIN *et al.*, 2012). Outros estudos descrevem um quarto e quinto receptor de HLA-G, denominados de CD160, membro da superfamília de imunoglobulinas, e CD8 (FONS *et al.*, 2006). O receptor ILT-2 é amplamente expresso por células de linhagem mielóide e linfóide, especificamente por células NK, células B, células T, monócitos/macrófagos e células dendríticas, enquanto o receptor ILT-4 tem sua expressão restrita às células da linhagem mielóide, como as células dendríticas e monócitos/macrófagos. Já o receptor KIR2DL4 é expresso somente nas células NK (AMIOT *et al.*, 2011; BRENOL *et al.*, 2012; HOWANGYIN *et al.*, 2012). O receptor CD160 foi encontrado expresso em células NK, células T NK (NKT), células T e em células endoteliais, enquanto o mais recentemente descrito, CD8, foi encontrado expresso em células NK e em células T CD8+ (FIGURA 8 – C E FIGURA 9) (CAROSELLA *et al.*, 2008; MORANDI *et al.*, 2010; KOCHAN *et al.*, 2013).

Os receptores da família ILT, mesmo reconhecendo todas as moléculas do HLA-I, o fazem com menor afinidade, e se associam diferentemente quanto as estruturas a que estes se ligam. O ILT-2 se liga às moléculas HLA-G que apresentam em sua estrutura o β 2M, enquanto os ILT-4 se associam predominantemente às moléculas com ausência de β 2M (LEMAOULT *et al.*, 2007). Em contrapartida, o KIR2DL4 é um receptor específico do HLA-G, conseqüentemente tendo maior afinidade a esta molécula (FIGURA 8- C E FIGURA 9) (CAROSELLA *et al.*, 2003; LEMAOULT *et al.*, 2007; MORANDI *et al.*, 2010).

Através da ligação a estes receptores, o HLA-G regula as atividades do sistema imunológico atuando principalmente na inibição de vários efetores celulares. Desta forma esta molécula inibe a função citotóxica e migração das

células NK; inibe a maturação, diferenciação e ativação de células dendríticas; inibe a função citolítica das células T CD8+; e inibe ainda a ação de células T CD4+ através da diferenciação destas em células supressoras (FONS *et al.*, 2006; MENIER *et al.*, 2008; AMIOT *et al.*, 2011; KETROUSSI *et al.*, 2011; KOCHAN *et al.*, 2013). O HLA-G pode ainda levar à apoptose de células T CD8+ e células NK através da ligação a seus receptores (MENIER *et al.*, 2008; KOCHAN *et al.*, 2013). Outros estudos apontam a presença de HLA-G como indutor de angiogênese através do receptor CD160, sendo importante em condições tumorais (FONS *et al.*, 2006).

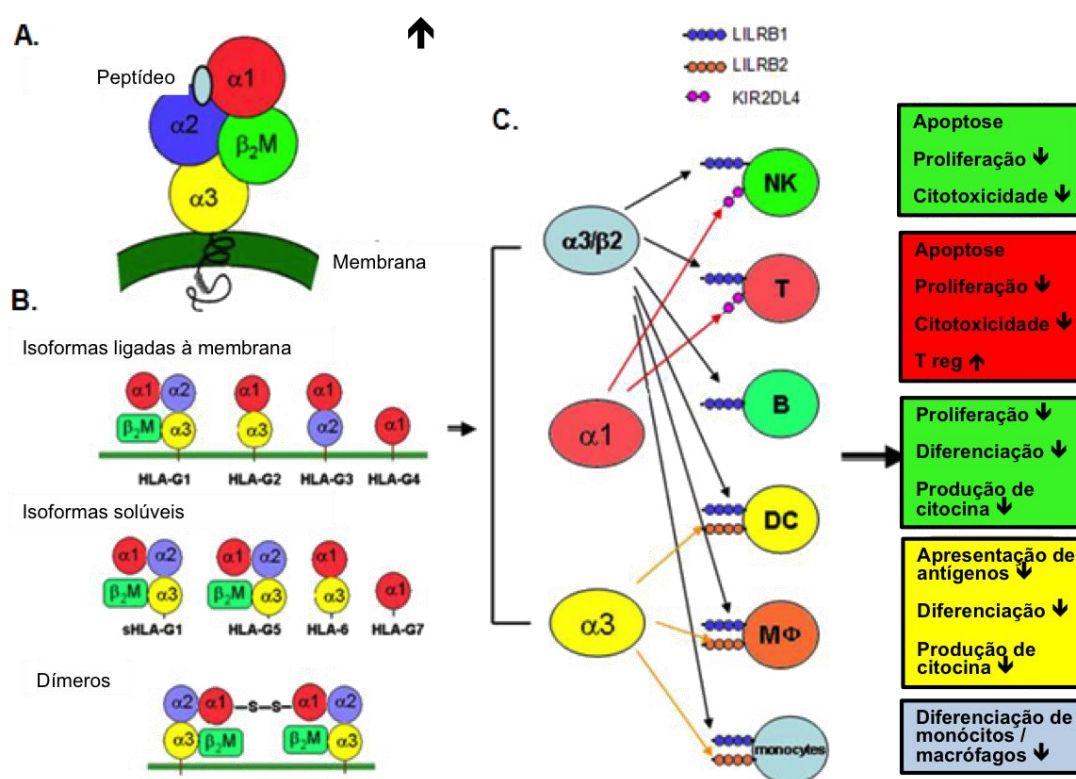


FIGURA 8 - ESTRUTURA PROTEICA DO HLA-G E SUA FUNÇÃO.

FONTE: Adaptado de Yie, 2012.

NOTA: A. Heterodímero composto de uma cadeia pesada α composta por três domínios α_1 , α_2 e α_3 , domínio transmembrana e citoplasmático, além da cadeia leve formada pela β_2M . B. *Splicing* alternativo de transcritos primários. C. Atividades imunoregulatórias do HLA-G indicando células-alvos e receptores.

O HLA-G também pode exercer sua função imunossupressora através de mecanismos indiretos, atuando na expressão de outra molécula não-clássica HLA-Ib, o HLA-E. Esta por sua vez interage com receptores

CD94/NKG2A resultando na inibição da proliferação e efeitos citotóxicos das células NK e células T (CAROSELLA *et al.*, 2003; DE KRUIJF *et al.*, 2010; AMIOT *et al.*, 2011). Outro mecanismo é através da trogocitose, processo pelo qual ocorre a troca de partes da membrana e moléculas associadas de uma célula para outra. Assim, células que não possuem a molécula HLA-G em sua superfície podem adquiri-las. Através deste processo, moléculas HLA-G contidas na superfície de células T e/ou células NK permutadas, podem torná-las não responsivas (BRENOL *et al.*, 2012).

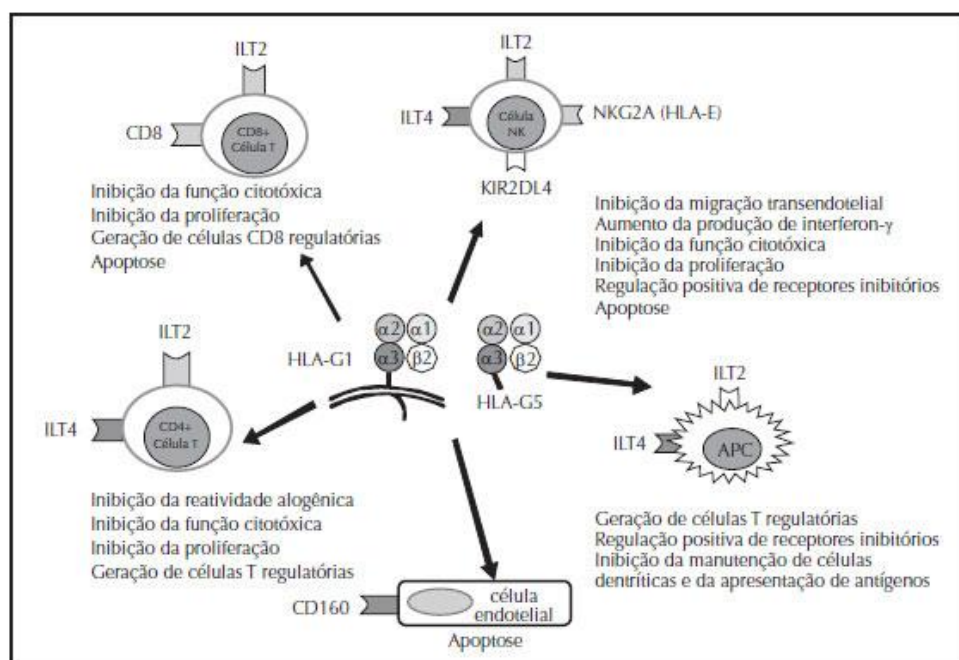


FIGURA 9 - FUNÇÕES IMUNOREGULATÓRIAS MEDIADAS PELO HLA-G, CÉLULAS-ALVO E RECEPTORES.

FONTE: Brenol *et al.*, 2012

O HLA-G desempenha então vários papéis importantes na regulação e modulação do sistema imunológico, sendo também regulado por outras moléculas. A secreção de HLA-G foi encontrada aumentada em vários cenários, através da estimulação com citocinas, como por exemplo, interferon-gama (IFN-γ), beta (IFN-β) e alfa (IFN-α), fator estimulador de colônias de granulócitos-macrófagos (GM-CSF), interleucina-2 (IL-2) e IL-10 (PICCINNI *et al.*, 1995; YIE *et al.*, 2006; AMIOT *et al.*, 2011). De modo inverso, o HLA-G

pode modular a liberação e secreção das próprias citocinas (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005).

2.8.2 Regulação da expressão do gene *HLA-G*

A expressão da informação genética é regulada por mecanismos complexos que controlam a transcrição, estabilidade do RNAm (processamento e degradação), tradução e modificações pós-traducionais. A expressão do *HLA-G* pode ser controlada no nível transcricional pelos vários elementos regulatórios presentes em sua região promotora, pelo próprio *splicing* alternativo do transcrito primário, além de ser regulada pelas citocinas, citadas no tópico anterior, e também por fatores indutores de estresse, como *heat shock*, hipoxia e isquemia (CAROSELLA *et al.*, 2003; GOMES *et al.*, 2007). Além disso, modificações epigenéticas, como a metilação do DNA e modificações de histonas (acetilação) demonstram ser mecanismos importantes na regulação da expressão do *HLA-G* (GOMES *et al.*, 2007; SAYED *et al.*, 2010). Além da regulação gênica transcricional, existem mecanismos de regulação pós-traducionais, como por exemplo os microRNAs específicos encontrados em alguns tumores como mediadores da expressão do *HLA-G* (AMIOT *et al.*, 2011).

2.8.3 A expressão da molécula *HLA-G* e sua associação ao câncer

O sistema imune tem papel importante na prevenção e eliminação de tumores, processo denominado de imunovigilância tumoral ou neoplásica. O sistema imune reconheceria células anormais, displásicas e neoplásicas, e as destruiria evitando a formação de tumores propriamente ditos (UROSEVIC e DUMMER, 2008; AMIOT *et al.*, 2011). O conceito de imunovigilância foi primeiramente proposto em 1909 por Paul Ehrlich, sendo formalizado somente em 1950 por Macfarlene Burnet e Lewis Thomas, e posteriormente modificado e ampliado por Schreiber em 2001 e 2006, dando origem ao mais recente conceito: imunoedição do câncer (DUNN *et al.*, 2002; DUNN *et al.*, 2004; UROSEVIC e DUMMER, 2008; MANJILI, 2011).

O conceito de imunoeedição do câncer consiste em três fases, denominadas de eliminação, equilíbrio e evasão (FIGURA 10). Na primeira etapa de eliminação, o sistema imune reconhece e destrói células tumorais que se desenvolveram, através da ação de citocinas produzidas pelo próprio infiltrado tumoral e células NK, resultando na destruição parcial ou total destas células (DUNN *et al.*, 2002; DUNN *et al.*, 2004; UROSEVIC e DUMMER, 2008; AMIOT *et al.*, 2011). Na etapa posterior, a chamada fase de equilíbrio, ocorre o equilíbrio propriamente dito entre o sistema imune e o tumor, podendo resultar na quiescência de células tumorais. O sistema imune, no entanto, não demonstra ser muito eficaz neste sentido, e a evasão das células tumorais ao ataque imunológico é frequente. A falha do sistema imune no controle das células tumorais leva à persistência das células tumorais e seleção de clones tumorais mais resistentes. A persistência destas células pode ainda, levar à evolução tumoral e ao acúmulo de mutações de DNA e modificações epigenéticas e de expressão gênica, que poderiam modular a expressão de antígenos tumorais específicos, como o HLA-G (DUNN *et al.*, 2002; DUNN *et al.*, 2004; UROSEVIC e DUMMER, 2008; AMIOT *et al.*, 2011). Estas células resistentes, poderiam então suprimir, resistir e escapar das respostas imunes tumorais. Finalmente, na etapa de evasão, o sistema imune torna-se incapaz na habilidade de controlar o crescimento e progressão tumoral, sendo relacionado à inflamação crônica, hipóxia e produção de citocinas (AMIOT *et al.*, 2011).

Pelas características de suas funções, a molécula HLA-G tornou-se um interessante alvo no estudo de lesões malignas, hipotetizando-se que, tumores que expressassem esta molécula não seriam reconhecidos pelo sistema imunológico, o que resultaria no desenvolvimento e progressão tumoral (SINGER *et al.*, 2003; YIE *et al.*, 2006; SHIH, 2007; MENIER *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2010; SAYED *et al.*, 2010).

É importante ressaltar que pode ocorrer, a regulação transcricional do *HLA-G*, levando à ativação do gene em situações de estresse metabólico como durante a hipóxia e isquemia, além do estímulo pelas citocinas já citadas, IL-10 e GM-CSF, sendo todos estes fatores presentes no desenvolvimento do câncer (CHANG *et al.*, 2003; MENG *et al.*, 2004; MENIER *et al.*, 2008; LIU *et al.*, 2009). A expressão do gene *HLA-G* também pode ser modulada via receptor

de progesterona (RP) sendo de grande importância nos tumores de mama que são positivos para este. Outro estudo correlacionou a presença de HLA-G com tumores moderadamente e fortemente reativos para ambos ER e PR (HE *et al.*, 2010).

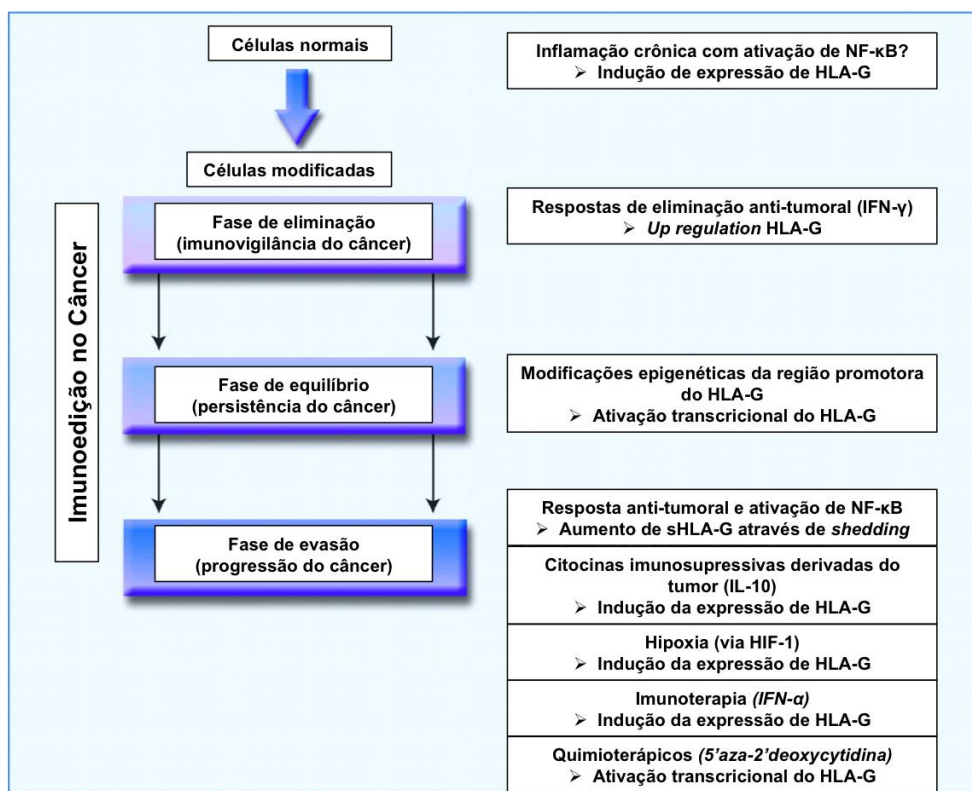


FIGURA 10 - HLA-G E IMUNOEDIÇÃO DO CÂNCER.

FONTE: Adaptado de Urosevic e Dummer, 2008.

NOTA: Ilustração demonstrando as etapas do conceito de imunoeedição do câncer e possíveis pontos onde pode ocorrer a ativação e modulação do *HLA-G* durante a tumorigênese e tratamentos imuno e quimioterápicos.

O HLA-G foi detectado em sangue e efusões, na sua forma solúvel (sHLA-G) e na sua forma normal em tecidos tumorais malignos dos mais variados: carcinomas de ovário, pulmão, rim, pâncreas, esôfago, cólon, mama; melanomas; neuroblastomas e gliomas; mieloma múltiplo; além de leucemias e outros tipos de tumores (FIGURA 11) (SINGER *et al.*, 2003; YIE *et al.*, 2006; SHIH, 2007; MENIER *et al.*, 2008; HE *et al.*, 2010; SAYED *et al.*, 2010). Diferenças marcantes foram encontradas quanto a frequência de expressão do HLA-G em tipos tumorais distintos, variando de 0% nos carcinomas de laringe e melanoma uveal/ocular a 100% em molas hidatiformes (ROUAS-FREISS *et al.*, 2005).

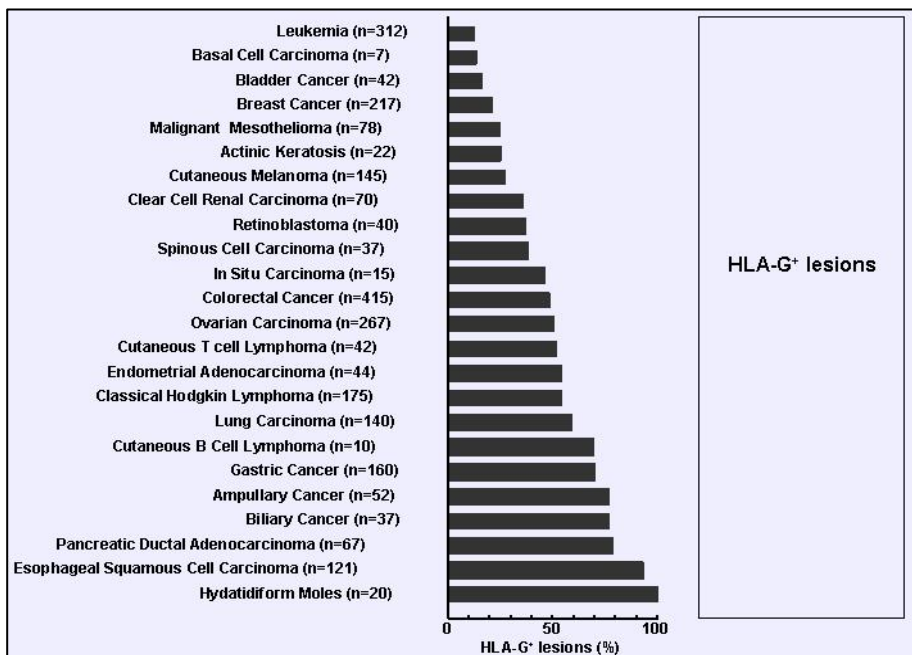


FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE HLA-G EM DIVERSOS TIPOS DE CÂNCER.
 FONTE: Menier *et al.*, 2008.

A sua íntima relação com a tolerância imunológica resultou em análises comparativas de lesões malignas e benignas, como aquela realizada por Paul e colaboradores em 1998, realizada em biópsias de pele com diagnóstico de melanoma metastático (PAUL *et al.*, 1998). Os resultados demonstraram um aumento significativo na expressão do gene *HLA-G* nestas lesões malignas e em tumores primários; no entanto, tumores benignos e tecido de pele normal não apresentaram expressão do gene *HLA-G*, evidenciando, portanto, que o *HLA-G* poderia ser utilizado como um potencial indicador de malignidade (PAUL *et al.*, 1998).

2.8.4 A expressão da molécula HLA-G no câncer de mama

Vários pesquisadores realizaram estudos investigando a expressão de HLA-G por meio de técnicas de IHQ, reação imunorreativa de ELISA (Ensaio de imunoabsorção enzimática), citometria de fluxo, técnica de *Western blotting* e RT-qPCR, onde foram utilizados blocos histológicos de parafina, plasma, líquido ascítico, e linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7, T47D e MDA-MB-231), respectivamente.

A utilização de amostras de líquido ascítico de pacientes com carcinomas mamários, revelou níveis significativamente mais altos de expressão de sHLA-G nestas amostras. As mesmas foram então centrifugadas e os *pellets* obtidos foram congelados para processamento posterior através de RT-qPCR, onde somente amostras positivas para a IHQ de HLA-G foram testadas. Os resultados obtidos demonstraram a expressão de *HLA-G5* em todas as amostras de carcinoma mamário submetidas a RT-qPCR (SINGER *et al.*, 2003).

Sayed e colaboradores, realizaram estudos comparativos em 45 pacientes com câncer de mama com um grupo saudável, analisando amostras de carcinoma mamário quanto a concentração de sHLA-G e expressão do gene *HLA-G* no sangue e tumor, respectivamente (SAYED *et al.*, 2010). Demonstraram um aumento significativo na concentração de sHLA-G no sangue de pacientes portadoras de câncer de mama quando comparadas ao grupo controle. No caso da expressão do gene *HLA-G*, o tecido mamário normal não apresentou qualquer expressão; no entanto na análise de sHLA-G no sangue, o grupo controle apresentou concentração variável (mesmo assim menor que a do grupo de câncer de mama), muito provavelmente devido aos monócitos, inflamação ou doenças autoimunes (SAYED *et al.*, 2010).

Um segundo estudo realizado em 44 carcinomas primários de mama, também demonstrou um aumento significativo no sHLA-G no plasma das pacientes quando comparadas a um grupo controle. Estudos de IHQ também foram realizados em 235 blocos histológicos de câncer de mama, sendo marcado positivamente em 66% das amostras (155/235). Além disso, pode-se correlacionar o tamanho tumoral, *status* linfonodal e estágio avançado da doença à expressão de HLA-G. Foram também avaliados os efeitos de estradiol/progesterona e seus antagonistas tamoxifeno/RU486 na expressão do gene *HLA-G* na linhagem celular de câncer de mama, MCF-7. Neste foi observado um aumento na expressão de *HLA-G* em células MCF-7 tratadas com estradiol/progesterona e uma redução na sua expressão quando as células foram tratadas com seus antagonistas (HE *et al.*, 2010).

Recentemente Kruijff e colaboradores avaliaram a expressão de HLA-G e HLA-E quanto ao prognóstico de pacientes com câncer de mama inicial em 677 pacientes. As amostras neste estudo foram divididas em dois grupos

quanto à expressão IHQ ou não de HLA-G e HLA-E no tumor. Das pacientes do primeiro grupo 39% apresentaram um tempo livre de doença de 10 anos, enquanto que no grupo sem expressão de HLA-G, 56% não apresentaram recidiva no mesmo período, dados que sugerem que a molécula HLA-G como um potencial marcador prognóstico (DE KRUIJF *et al.*, 2010). Corroborando outros estudos, 87% dos casos de câncer de mama marcaram positivamente para o HLA-G quando comparados a 1% do grupo controle de mama normal.

Diversos outros estudos também analisaram a expressão de HLA-G em tumores malignos de mama através de IHQ e sHLA-G no plasma de pacientes, sendo observada elevada expressão de HLA-G nestas (CHEN *et al.*, 2010; ELLIOTT *et al.*, 2011). O estudo de Elliot e colaboradores analisou também a expressão de *HLA-G* em três linhagens celulares de câncer de mama (MCF-7, T47D e MDA-MB-231) através de RT-qPCR, observando a aumento de expressão de RNAm de *HLA-G* nestas em comparação a linhagens celulares de tecido mamário saudável (ELLIOTT *et al.*, 2011). Assim como os estudos de Elliot e Chen, Provatopoulou e colaboradores também observaram aumento na expressão de sHLA-G em pacientes com câncer de mama, especificamente em pacientes com tumores ductais com componente lobular (PROVATOPOULOU *et al.*, 2012).

Dong e colaboradores em 2012 avaliaram a expressão IHQ de HLA-G em 104 pacientes com tumores invasivos de mama. Neste estudo foi correlacionada a expressão do HLA-G com os subtipos não-luminais, e inversamente à densidade linfocitária tumoral. Ainda evidenciou-se a associação de altos níveis de HLA-G com maior risco de recorrência (DONG *et al.*, 2012).

Em estudo de 2013 realizado por da Silva e colaboradores, foram avaliadas 52 biópsias de câncer de mama invasivo na forma de blocos histológicos de parafina através de IHQ. O HLA-G foi altamente expresso em 25% das lesões menores de 2 cm e 30.7% em lesões maiores. Foi observada também a expressão de HLA-G preferencialmente em tumores G2 e G3 (57%), e com maior grau de atipia nuclear (DA SILVA *et al.*, 2013; ROLFSEN *et al.*, 2013).

Com o avanço de métodos e técnicas de biologia molecular aplicáveis à carcinogênese humana, vários marcadores tornaram-se rotineiros como

auxiliares na detecção precoce, diagnóstico, prognóstico e no planejamento terapêutico da doença, como o uso de CA-125, CA 19-9, CA 15-3, CEA (antígeno carcinoembriogênico), alfa-feto proteína, aminopeptidase (SHIH, 2007). Considerando as informações obtidas sobre a expressão diferencial do HLA-G, como acima referida, pode-se admitir que o mesmo se constitui em um potencial marcador molecular além de possível alvo terapêutico não somente no câncer de mama, bem como em outros tipos de câncer, o que justifica a sua análise como proposta neste projeto.

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma doença de grande impacto na sociedade, acometendo mais de um milhão de mulheres anualmente em todo o mundo, sendo a maior causa de mortes neste grupo. A taxa de sobrevivência desta doença é relativamente alta em países desenvolvidos e em desenvolvimento, atingindo 73% e 57% respectivamente. Isto se deve à redução da mortalidade que está intimamente ligada à prevenção, detecção precoce e tratamentos progressivamente mais adequados. Entretanto, o câncer de mama continua sendo uma doença de grande relevância pela alta incidência e morbidade, além de manter alta taxa de mortalidade em países como o Brasil. Portanto, apesar dos avanços alcançados há necessidade de novos métodos de prevenção, detecção e tratamento para proporcionar uma melhora nestes índices. Vários marcadores tumorais vêm sendo estudados com o objetivo de auxiliar na detecção precoce e no prognóstico clínico adequado do câncer de mama.

O HLA-G vem demonstrando ser um marcador tumoral de grande potencial na diferenciação de lesões malignas e benignas, no prognóstico clínico, tempo livre de doença e metástase, já que este é associado à tolerância imunológica e inibição de células do sistema imune que poderiam combater o câncer. Mesmo sendo um marcador tecidual não específico, o HLA-G foi observado expresso em diferentes lesões malignas, incluindo o câncer de mama, não sendo expresso em lesões benignas. Além disso, este marcador em potencial é de grande valia, já que pode ser detectado facilmente no sangue e efusões, através de sHLA-G, e em sua forma normal no tecido tumoral.

Em função de suas características, o HLA-G poderia se tornar útil na detecção precoce de tumores de mama em pacientes de risco, na detecção de recidiva e no prognóstico e conduta terapêutica de pacientes com a doença já instalada. Mais ainda, a pesquisa clínica de HLA-G pode ser conjugada a pesquisa de outros marcadores já conhecidos para melhor direcionar o clínico a um tratamento mais adequado, sensível e específico às necessidades das pacientes portadoras de câncer de mama, proporcionando assim melhor

qualidade de vida.

Este estudo é pioneiro na análise de expressão gênica e proteica de HLA-G em uma amostra bastante homogênea composta por carcinomas ductais infiltrantes de mama. Acrescenta ainda, a padronização de métodos de utilização de blocos histológicos de parafina, além de analisar a associação da expressão da molécula HLA-G com os marcadores tumorais RE, RP, HER2 e Ki-67.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Analisar a expressão gênica e proteica do HLA-G em amostras de carcinomas mamários ductais infiltrantes e relacionar a expressão deste com fatores preditivos e patológicos da origem e progressão da doença.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a expressão em nível de RNAm de *HLA-G* em tecido mamário tumoral e não tumoral.
- Analisar a expressão proteica de HLA-G em tecido mamário tumoral e não tumoral.
- Comparar a expressão de HLA-G com a expressão de outros marcadores tumorais: receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 e Ki-67 em tecido mamário tumoral.
- Comparar a expressão de HLA-G em tecido mamário tumoral, com fatores clínico-histopatológicos.
- Avaliar a viabilidade da utilização de material histológico emblocado em parafina na determinação da expressão gênica de *HLA-G*.

5 CAPÍTULO I

To be submitted to **Immunology**.

HLA-G expression in breast cancer: high positivity frequency in the triple negative subgroup.

Fernanda S.C. Breginski, PhD¹ Maria da Graça Bicalho, PhD¹, Marcella S. Cavalcanti, M.D.², Teresa Cristina S. Cavalcanti, M.D, M.S.², Enilze M.S.F. Ribeiro, PhD¹.

¹Genetics Department, Federal University of Paraná. Curitiba, Paraná, Brazil.

²Citolab Histopathology and Pathology Laboratory, Curitiba, Paraná, Brazil.

Funding: CAPES and CNPq.

Running title: HLA-G expression in TNBC tumors

Corresponding author: Enilze M.S.F. Ribeiro, PhD

Genetics Department, Federal University of Paraná. Centro Politécnico, Jardim das Américas, Curitiba-PR, CEP 81531-970, Brazil. Phone/Fax: +55 (41) 3361-1793, e-mail: eribeiro@ufpr.br

Number of words/characters in the abstract: 226/1510

Conflict of Interest:

The authors declare they have no competing financial interests.

Abstract

Introduction: The discovery of new clinical cancer biomarkers as aiding tools for diagnosis, prognosis and treatment is of great importance, where immunosurveillance molecules may be potential candidates. One such molecule is HLA-G, which has an immunotolerant function, helping tumor cells escape immune recognition and destruction. This antigen has been identified in a variety of different cancers, such as melanoma, leukemia, lung, colorectal and breast cancers. **Materials and Methods:** HLA-G expression was analyzed in 202 infiltrating ductal breast carcinomas (IDC) and 104 normal breast formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (FFPE) by immunohistochemistry (IHC). **Results:** Of the 202 IDC, 18.8% (38) stained positive for HLA-G IHC, whereas 81.2% (164) stained negative. In contrast, only 1 (0.96%) of the 104 normal breast tissue samples stained positive for HLA-G. The more aggressive triple negative breast tumors (TNBC) composed 37 of the 202 IDC tumor samples, of which 35.1% (13) stained positive for HLA-G IHC. Comparison between HLA-G IHC staining in IDC and normal breast tissue was significant at $p < 0.05$. **Conclusion:** This study suggests HLA-G as a marker of malignancy in breast tumors, as well as being an important marker of tumor aggressiveness and worse prognosis, specifically in TNBC.

Keywords: HLA-G; breast cancer; TNBC; gene expression

Introduction

High incidence and mortality rates of breast cancer are a worldwide concern, being the leading cause of cancer related deaths among women (1). An estimated 1.7 million women were diagnosed with breast cancer and 522,000 deaths were recorded in 2012 alone (2).

Breast malignant tumors are stratified according to their hormonal status and overexpression of *HER2* (ERBB2) by use of immunohistochemistry (IHC) as well as through molecular profiling of *HER2*, *CK5/6*, *EGFR*, *CLDN* and *E-cadherin*, in addition to the known estrogen (ER), progesterone (PR) and androgen receptors (AR). Accordingly tumors are classified as basal-like, luminal A, luminal B, HER2 enriched, interferon, molecular apocrine and *claudin-low* (3, 4).

The triple negative tumors (TNBCs), which are ER, PR and HER2 negative are of worst prognosis, since they are more aggressive and more difficult to treat, which account for 10-20% of breast cancer cases (5). These tumors comprise a very heterogeneous group of tumors, which can be categorized mainly into the basal-like, apocrine and *claudin-low* subsets of

breast tumors.

Strong evidence has shown that the immune system plays a major role in controlling tumor progression. However, tumor cells may have mechanisms of escaping this regulation through various means. One way may be through the expression of the non-classical human leukocyte antigen class I molecules, such as HLA-G. These molecules play a critical role in immune surveillance and immune regulation through inhibition of different immune competent cells.

HLA-G has restricted tissue expression, having been originally discovered in trophoblasts and cytotrophoblasts in placentas from early pregnancy, having a pivotal function in immune tolerance, during which it protects the fetus from the maternal immune system (6-11). Later studies demonstrated that *HLA-G* was not only expressed in fetal originated tissues, being constitutively expressed in immune privileged sites, such as the cornea, thymus, pancreatic islets, epithelial and endothelial tissues as well as in the erythropoietic lineage (6, 11). In addition, *HLA-G* was found to be expressed after transplantation, inflammatory and auto-immune diseases, viral infections, as well as in a variety of malignant tumors (12-14).

Through its functions, HLA-G has been associated with induction of apoptosis, cytotoxicity, differentiation, inhibition of cellular proliferation in addition to modulating the secretion of cytokines, important cell signaling molecules (15). HLA-G binds five receptors, ILT-2 (CD85j, LILRB1), ILT-4 (CD85d, LILRB2), CD160 and CD8, all of which have inhibitory effects, with the exception of KIR2DL4 (CD158d), which may at times, act as an activator. ILT-2 is widely expressed in natural killer (NK) cells, B cells, T cells, monocytes/macrophages and dendritic cells (DC), whereas ILT-4 is strictly expressed in myeloid lineages, such as DC and monocytes/macrophages. KIR2DL4, on the other hand is only expressed in NK cells (12, 15, 16, 17). Likewise, CD160 is expressed in NK cells, NK T cells, T cells and endothelial cells, while the most recent associated to HLA-G, CD8, was found to be expressed in some NK cells and CD8+ T cells (6, 13). By binding to these receptors, HLA-G regulates the activities of the immune system by inhibiting various effector cells. Furthermore, HLA-G inhibits the cytotoxic function and migration of NK cells, the differentiation and activation of DC, the cytolytic function of CD8+ T cells, in addition to inhibiting CD4+ T (Treg) cell function by

the differentiation of these into suppressor cells (12, 13, 18-20). Moreover, HLA-G can lead to NK and CD8+ T cell apoptosis and induce angiogenesis through its CD160 receptor (13, 18, 20).

As an immune regulator HLA-G has become an interesting target for studies in malignant lesions, where tumor cells would express this molecule in order not to be recognized by the immune system, resulting in tumor development and progression (9, 11, 14, 21-23). Various factors, present in the tumor microenvironment, like hypoxia and ischemia coupled with inflammatory cytokines may contribute to *HLA-G* transcriptional activation (9, 24-27).

A number of studies were performed investigating HLA-G expression in carcinomas of the breast, lung, ovary, esophagus, colon, melanomas, neuroblastomas and gliomas, as well as leukemias, where HLA-G expression was found to be significantly increased (9, 11, 14, 21-23). Previous studies performed in breast cancer samples showed elevated HLA-G expression through the use of immunohistochemistry (IHC), ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), flow cytometry and reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR), using formalin-fixed, paraffin-embedded tissue (FFPE), blood samples and malignant ascites specimens, respectively. This study was performed primarily in order to investigate the expression of HLA-G in invasive ductal breast carcinomas in comparison to normal breast controls, as well as to evaluate the potential correlation of this marker with other routinely used breast cancer markers such as ER, PR, HER2 and Ki-67. Due to intrinsic differences in the breast cancer IHC subtypes, we also evaluated the correlation of HLA-G expression with the major IHC breast cancer subgroups.

Materials and Methods

Patients and Tissue Specimens

HLA-G expression was analyzed in 202 confirmed invasive ductal breast carcinomas (IDC) not otherwise specified (NOS) and invasive ductal breast carcinomas (IDC) with *in situ* component (IS-comp) as well as 104 normal breast formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections (FFPE) selected from a Pathology Laboratory's database, Citolab in Curitiba-PR (Brazil). Tumor FFPE were obtained from patients submitted to either surgical or biopsy procedures

with no ongoing or prior treatment, whereas normal breast FFPE samples were retrieved through breast reduction and/or mammoplasty. The study was approved by the ethics committee of the Federal University of Paraná (UFPR). Age at diagnosis, lymph node metastatic status, histological grade and tumor type were available.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical staining was performed by use of monoclonal antibodies (mAbs) for HLA-G 4H84 (1:100 μ l - BD Pharmingen[™]), estrogen receptor (ER) Sp1 (1:2000 μ l – Labvision), progesterone receptor (PR) PGR636 (1:2000 μ l – DAKO) and Ki-67 MIB-1 proliferation index (1:1000 μ l – DAKO) for breast tumor FFPE whose receptors had not yet been processed. Briefly, 4-5 μ m tissue sections of FFPE were deparaffinized and rehydrated, submitted to antigen retrieval, blockage of endogenous peroxidase activity and incubated with specific mAbs at 4°C overnight. After thorough washing in phosphate buffered saline (PBS) solution, sections were incubated for approximately 1 hour using the streptavidin-biotin (LSAB®, DAKO) system. Finally, sections were stained with 3,3'-Diaminobenzidine (31) and faintly counterstained with hematoxylin. Normal breast FFPE sections were solely stained with HLA-G. HER2 staining was performed through the *HerceptTest*[™] assay (DAKO) according to the manufacturer. Positive external and internal controls were included in each experiment. First trimester placental tissue slides served as positive controls for HLA-G staining.

Immunostaining Analysis

Microscopic analysis of HLA-G, ER, PR, Ki-67 and HER2 immunostaining was assessed by two experienced pathologists in a blinded manner. Based on estimated percentage of positive cells and intensity of nuclear (ER, PR and Ki-67) and membrane (HER2 and HLA-G) immunostaining. Results for HLA-G, ER and PR were classified as negative, weakly, moderately and strongly stained. For analysis purposes these results were represented as follows: (-) tissue specimens without staining – 0; (+) tissue specimens with less than 25% stained cancer tissue and/or weakly stained - 1; (++) tissue specimens with 25-50% of stained cancer tissue and/or

moderately stained – 2 and (+++) tissue specimens with more than 50% of stained cancer tissue and/or strongly stained (28). ER, PR and HLA-G immunohistochemistry was considered positive when more than 1% of invasive tumor cells were stained (29). Ki-67 proliferation index was assessed through estimated counting of stained nuclei and represented as a percentage of the total number of tumor cells. In addition, HER2 was evaluated according to the *American Society of Clinical Oncology and College of American Pathologists (CAP) 2007 guidelines* (30). Following these guidelines, HER2 2+ immunostained tumors were considered inconclusive and were thus submitted to fluorescent *in situ* hybridization (FISH) (Vysis PathVysion HER2 kit) for *HER-2/neu* gene amplification detection.

Statistical Analysis

Fisher's exact test or Chi-square test was used in order to evaluate the association between qualitative variables and HLA-G expression. Student's t-test or the Mann-Whitney U-test was used to compare two groups regarding quantitative variables for independent samples. Data normality was evaluated by the Kolmogorov-Smirnov test. In order to evaluate the association between the molecular classification of breast cancer tumors and HLA-G expression, a modified logistic regression analysis was performed. In addition the Wald test was used to compare molecular classifications. Differences with $p < 0.05$ were considered to be statistically significant. Data were analyzed using SPSS v.20.0 computer statistical analysis software.

Results

HLA-G IHC expression in Breast Cancer

HLA-G protein was stained in only one of the 104 normal breast tissue samples. In contrast, HLA-G protein expression was observed in 18.81% (38/202) of malignant breast cancer samples, of which 47.36% (18/38) were weakly expressed, 28.94% (11/38) were moderately expressed and 23.68% (9/38) were regarded as strongly expressed. HLA-G protein expression was found to be significantly higher in breast cancer patients as compared with normal controls ($P = 0.0009$). HLA-G predominantly presented a membrane

stained pattern, with few cases staining the cytoplasm or an association of both membrane and cytoplasm staining (Figure 1).

Comparison with Clinicopathological Features

The mean age of breast cancer patients was 50.7 years. Of the 202 breast cancer samples analyzed, 147 were IDC, whereas 55 were IDC+ DCIS. Twelve of these were grade I, 133 were grade II and 57 were grade III. The great majority of HLA-G stained tumors were found to be of a higher histological grade (G2 and G3), corresponding to 94.73% (36/38). However, no association between HLA-G expression and histological tumor grade were obtained ($P = 0.231$). Since the majority of the specimens were obtained through biopsies, information pertaining tumor size and axillary lymph node metastatic status was not available. In this matter, tumor size was available for only 31.68% (64/202) of the specimens, with an average of 2.1 cm. Axillary lymph node metastasis status was available for only 28.21% (57/202), were it was present in 52.63% (30/57) and absent in 47.36% (27/57) of samples. No significant correlation was found between HLA-G expression and age, tumor size and axillary lymph node metastatic status ($P = 0.433, 0.520$ and 0.722 , respectively). Clinicopathological features and HLA-G expression results are shown in Table 1.

Ki-67

As to Ki-67, 25.24% (51/202) of tumors showed a proliferation index lower than 14%, whereas 74.75% (151/202) were 14% or higher. HLA-G was positively stained in only five tumors which had a proliferation index lower than 14%, representing 13.15% (10/38) of HLA-G expressed tumors. In contrast, a total of 33 of the 38 HLA-G stained samples had a high proliferation index, considered to be 14% or higher. The average percentage for Ki-67 was 29%. Eventhough HLA-G positively stained tumors had a higher proliferative index, the results obtained were considered to of borderline significance ($P=0.064$) (Table 2).

ER, PR and HER2 Status

Overall, 76.73% (155/202) and 60.89% (123/202) of tumors examined in the study showed ER and PR expression, respectively. Of these, 60.89%

(123/202) of tumors showed both ER and PR expression. In contrast 23.26% (47/202) of tumors were negative for both ER and PR expression. HLA-G was expressed in 34.04% (16/47) and 14.19% (22/155) of ER negative and positive tumors, respectively ($P=0.005$). Similar to ER tumors, HLA-G was expressed 26.58% (21/79) and 13.82% (17/123) of PR negative and positive tumors, respectively ($P=0.028$).

With respect to HER2, 83.66% (169/202) of tumor samples were negative for HER2, where 18.93% (32/169) stained positive for HLA-G and 81.07% (137/169) were negative. Only 16.33% (33/202) of tumors were positive for HER2, where 18.18% (6/33) were HLA-G positive and 81.82% (27/33) were negative. No significant difference was found between HER2 positive and negative subgroups as to HLA-G expression ($P=1.0$) (Table 2).

Molecular Classification

According to breast cancer immunohistochemical markers and molecular classification samples were divided into five major groups: Luminal A, Luminal B/HER2-, Luminal B/HER2+, HER2-enriched and TNBC not otherwise specified (NOS). HLA-G expression was significantly different among the five molecular breast cancer subgroups ($P = 0.032$) (Table 3). With this result, further analysis was performed by comparing two molecular subgroups at a time. Statistical difference was observed in both Luminal A and Luminal B/HER2- molecular subgroups when compared to TNBC ($P = 0.006$ and $P = 0.035$, respectively) (Table 4). A total of 37 out of 202 tumor samples were TNBC. Interestingly, 35.14% (13/37) of the TNBC in this study were positively stained for HLA-G, ($P = 0.009$) (Table 5).

Discussion

The immune system is capable of recognizing and destroying tumor cells, playing a major role in controlling tumor development and progression (31, 32). However, tumor cells have evolved efficient mechanisms of evading and escaping this regulation (10, 32, 33). HLA-G may be one way in which tumors down-regulate and escape host immune response (10-12, 14, 34-36). Our study, as others, has shown that HLA-G protein expression is significantly

increased in breast cancer tissue when compared to normal breast tissue controls (11, 21-23, 37, 38).

Although a significant difference between tumors of greater histological grading (G2 and G3) and higher HLA-G expression was previously seen, our study has not, even though the majority of HLA-G stained tumors were of higher grade. In support of our findings, He *et al.* did not establish an association between tumor histological grade and HLA-G expression (21). The association of HLA-G expression and higher histological grading suggests that less differentiated and generally more aggressive tumors have acquired the ability to escape tumor host immune response, perhaps through HLA-G expression. HLA-G expression also associated positively with other high-grade histological tumors such as ovarian carcinomas, lung cancer, colorectal cancer, gastric cancer and cutaneous T cell lymphoma (22, 39-44). Moreover, HLA-G expression has been shown to be an independent prognostic factor for worst outcome of patients, in both colorectal and breast cancer (21, 38, 44).

Other studies have also demonstrated that overall survival of patients with negative and weak HLA-G expression was significantly higher than those with moderate and strong HLA-G expression (11, 21).

The association of HLA-G expression and several clinicopathological parameters, such as lymph node metastatic status and tumor size, is somewhat controversial. Some studies have found that the presence of lymph node metastasis is associated with higher HLA-G expression, whereas others have not found any association (11, 21, 37). Arguably, it should be noted that HLA-G expression should be increased in tumors with pN+ nodal stage, indicating more advanced stage disease. HLA-G expression and association with tumor size, has also generated argumentative results. And, again, one can extrapolate on the idea that HLA-G should be found in tumors of increased size, since they tend to be associated with worse patient outcome as well being a factor, which could indicate that the tumor has acquired the ability to evade the hosts' immune system. However, in the studies that evaluated this parameter with HLA-G expression, no significant results were obtained (37). Due to lack of information in the vast majority of tumors in our sample with regard to lymph node metastatic status and tumor size, no correlation with HLA-G expression could be analyzed. Even though increased age is one of the most important risk

factors in breast cancer development, no correlation with HLA-G expression was found in our study as well as in others (21).

Currently, numerous IHC markers are used routinely aiding in the diagnosis, prognosis and primarily treatment of breast malignant tumors. One such marker is the nuclear protein, Ki-67, involved in the active phases of the cell cycle acting mainly in cellular proliferation. Consequently, Ki-67 has become an important cellular proliferation index in the evaluation of prognosis, overall and disease-free survival for numerous types of cancers, including breast cancer (45). To our knowledge this is the first study to evaluate Ki-67 association with HLA-G expression in breast cancer. Our results have shown that the great majority of HLA-G positive tumors present a proliferative Ki-67 index higher than 14%, with an average of 32%, even though a borderline significant p value was obtained for this marker. This finding is in support of the fact that more aggressive tumors as well as high histological grade tumors, which have a worse prognosis, have a high proliferative index. In addition, this suggests the presence of HLA-G in these tumors as a protective mechanism against tumor host response.

Apart from Ki-67, other markers such as ER, PR and HER2 are the most widely and commonly used markers in breast tumor subtyping. These markers have a fundamental role in the prognosis of breast cancer, mainly aiding in the choice of therapeutic treatments. As previously described the majority of invasive breast tumors present themselves as ER+/PR+, generally being HER2 negative (46). In our study, HLA-G expression was significantly associated with hormone receptor status in breast cancer, where an association was found with ER- and PR- tumors. This may be due to the assumption that ER- and PR- tumors are usually more aggressive tumors, which have a worse prognosis (47).

According to the literature available, this is the first study to investigate HLA-G expression and its relation with TNBC. Corroborating our previous findings that ER- and PR- tumors are significantly associated to HLA-G positive expression, HLA-G expression was also significantly associated with TNBC, where tumors are hormone receptor and HER2 negative, making up a very heterogeneous and distinctive group of tumors. Furthermore, these tumors have been stratified by gene expression profiles into basal-like, *claudin*-low, and

molecular apocrine (48). Of these, TNBC fall in the majority of cases into the basal-like and *claudin*-low subtypes (48, 49). TNBC usually represent approximately 10-20% of all breast cancers, histologically are high grade, characterized by worst overall and disease-free survival, as well as being more aggressive tumors, with rapid progression and early metastasis in addition to being resistant to therapy (5, 37, 48, 50-52). These tumors are usually diagnosed at a younger age and in patients with a family history of breast cancer, being carriers of mutations in *BRCA1* (52). In addition, the vast majority of these tumors are p53 mutated, have loss of *retinoblastoma-1* gene (*RB1*), as well as a high proliferative index (Ki-67), all of which play an important role in cell cycle regulation (49, 52). The factors above may contribute to HLA-G activation and consequent evasion of host immune response. Moreover, HLA-G may be induced in TNBC as a result of the activation of other pathways as well as factors present in the tumor microenvironment, like hypoxia, ischemia and inflammatory cytokines (12, 23, 53). When comparing TNBC tumors with other molecular breast cancer subtypes, Luminal A and B tumors were significantly different as to HLA-G expression. This may be due to clinicopathological features of both Luminal A and B/HER2- tumors. Luminal A tumors are usually characterized as having low histological tumor grade, are usually not aggressive tumors, have excellent prognosis, better treatment response, as well as fairly high survival rates and low recurrence rates, all of which could relate to a low HLA-G expression (48, 50). After the Luminal A subtype tumors, Luminal B tumors are the second ranked as far as prognosis goes, where these tumors usually have a better prognosis than HER2-enriched, TNBC, *claudin*-low, molecular apocrine and basal-like tumors (50).

Conclusion

Many factors may be involved in HLA-G expression, albeit through direct or indirect mechanisms which activate and regulate HLA-G in particular microenvironments, where in turn, these antigens would inhibit the activities of NK cells and T lymphocytes against the tumor. Taken together, findings in this study provide insights in breast cancer development and progression providing further evidence of the role of the host immune system in combating this

disease. Once again, HLA-G has been elucidated as a potential marker of malignancy in breast tumors, as well as being an important marker of tumor aggressiveness and worse prognosis, specifically in TNBC. It is very important to shed a light in the tumorigenesis of TNBC, considering their limited successful array of therapies. Additionally, HLA-G may be a potential therapeutic target. Perhaps the use of similar monoclonal antibody therapy can be applied to HLA-G expressing tumors, where the blocking of HLA-G could possibly result in the re-activation of NK and T lymphocytes. Further activation of these immune competent cells would possibly aid in a more effective host immune response, culminating in tumor regression. Likewise, HLA-G may be used in association with other drug regimens, which could possibly lead to a more improved and successful treatment. To this effect, further studies should be pursued as to better understand the intrinsic factors behind HLA-G expression and breast cancer development.

Acknowledgments

We would like to thank CAPES/CNPq and FUNPAR-LIGH Alliance for funding our study.

References

1. OMS. GLOBOCAN 2000: Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide 2010. Available from: <http://www.who.int/cancer/resources/incidences/en/>.
2. IARC. Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. 2013. Available from: <http://www.ncri.ie/news/article/iarc-release-globocan-2012-global-cancer-burden-rises-141-million-new-cases-2012-and>.
3. Ambs S. Prognostic significance of subtype classification for short- and long-term survival in breast cancer: survival time holds the key. *PLoS Med.* 2010;7(5):e1000281.
4. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
5. Ring A, Dowsett M. Mechanisms of tamoxifen resistance. *Endocr Relat Cancer.* 2004;11(4):643-58.
6. Carosella ED, Moreau P, Le Maout J, Le Discorde M, Dausset J, Rouas-Freiss N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. *Adv Immunol.* 2003;81:199-252.
7. Kirszenbaum M, Moreau P, Gluckman E, Dausset J, Carosella E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1994;91(10):4209-13.
8. Kovats S, Main EK, Librach C, Stubblebine M, Fisher SJ, DeMars R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. *Science.* 1990;248(4952):220-3.
9. Menier C, Rouas-Freiss N, Carosella E. The HLA-G non classical MHC class I molecule is expressed in cancer with poor prognosis. Implications in tumour escape from immune system and clinical applications. *Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol.*; 2008.
10. Rouas-Freiss N, Moreau P, Ferrone S, Carosella ED. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? *Cancer Res.* 2005;65(22):10139-44.
11. Sayed D, Badr G, Maximous D, Mikhail NN, Abu-Tarboush F, Alhazza IM. HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. *Tissue Antigens.* 2010;75(1):40-7.
12. Amiot L, Ferrone S, Grosse-Wilde H, Seliger B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? *Cell Mol Life Sci.* 2011;68(3):417-31.
13. Kochan G, Escors D, Breckpot K, Guerrero-Setas D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. *Oncoimmunology.* 2013;2(11):e26491.
14. Shih IM. Application of human leukocyte antigen-G expression in the diagnosis of human cancer. *Hum Immunol.* 2007;68(4):272-6.
15. Morandi F, Ferretti E, Bocca P, Prigione I, Raffaghello L, Pistoia V. A novel mechanism of soluble HLA-G mediated immune modulation: downregulation of T cell chemokine receptor expression and impairment of

chemotaxis. *PLoS One*. 2010;5(7):e11763.

16. Howangyin KY, Loustau M, Wu J, Alegre E, Daouya M, Caumartin J, et al. Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors. *Cell Mol Life Sci*. 2012.

17. Brenol CV, Veit TD, Chies JA, Xavier RM. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. *Rev Bras Reumatol*. 2012;52(1):82-91.

18. Fons P, Chabot S, Cartwright JE, Lenfant F, L'Faqihi F, Giustiniani J, et al. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. *Blood*. 2006;108(8):2608-15.

19. Ketrroussi F, Giuliani M, Bahri R, Azzarone B, Charpentier B, Durrbach A. Lymphocyte cell-cycle inhibition by HLA-G is mediated by phosphatase SHP-2 and acts on the mTOR pathway. *PLoS One*. 2011; 6:e22776.

20. Riteau B, Menier C, Khalil-Daher I, Sedlik C, Dausset J, Rouas-Freiss N, et al. HLA-G inhibits the allogeneic proliferative response. *J Reprod Immunol*. 1999;43(2):203-11.

21. He X, Dong DD, Yie SM, Yang H, Cao M, Ye SR, et al. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on alloctotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. *Ann Surg Oncol*. 2010;17(5):1459-69.

22. Singer G, Rebmann V, Chen YC, Liu HT, Ali SZ, Reinsberg J, et al. HLA-G is a potential tumor marker in malignant ascites. *Clin Cancer Res*. 2003;9(12):4460-4.

23. Yie SM, Xiao R, Librach CL. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. *Hum Reprod*. 2006;21(10):2538-44.

24. Bamberger AM, Jenatschke S, Schulte HM, Löning T, Bamberger MC. Leukemia inhibitory factor (LIF) stimulates the human HLA-G promoter in JEG3 choriocarcinoma cells. *J Clin Endocrinol Metab*. 2000;85(10):3932-6.

25. Moreau P, Mouillot G, Rousseau P, Marcou C, Dausset J, Carosella ED. HLA-G gene repression is reversed by demethylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100:1191-6.

26. Chang CC, Murphy SP, Ferrone S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. *Hum Immunol* 2003; 64:1057-63.

27. Liu R, Li Z, Bai S, Zhang H, Tang M, Lei Y, et al. Mechanism of cancer cell adaptation to metabolic stress: proteomics identification of a novel thyroid hormone-mediated gastric carcinogenic signaling pathway. *Mol Cell Proteomics* 2009; 8:70-85.

28. Chen HX, Lin A, Shen CJ, Zhen R, Chen BG, Zhang X, et al. Upregulation of human leukocyte antigen-G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. *Hum Immunol*. 2010;71(9):892-8.

29. Hammond ME, Hayes DF, Wolff AC, Mangu PB, Temin S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Oncol Pract*. 2010;6(4):195-7.

30. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2

testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118-45.

31. Dunn GP, Bruce AT, Ikeda H, Old LJ, Schreiber RD. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. *Nat Immunol*. 2002;3(11):991-8.

32. Dunn GP, Old LJ, Schreiber RD. The three Es of cancer immunoediting. *Annu Rev Immunol*. 2004;22:329-60.

33. Manjili MH. Revisiting cancer immunoediting by understanding cancer immune complexity. *J Pathol*. 2011;224(1):5-9.

34. Dong DD, Yie SM, Li K, Li F, Xu Y, Xu G, et al. Importance of HLA-G expression and tumor infiltrating lymphocytes in molecular subtypes of breast cancer. *Hum Immunol*. 2012;73(10):998-1004.

35. Gomes AQ, Correia DV, Silva-Santos B. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. *EMBO Rep* 2007; 8:1024-30.

36. Zidi I, Ben Amor N. HLA-G regulators in cancer medicine: an outline of key requirements. *Tumour Biol* 2011; 32:1071-86.

37. da Silva GB, Silva TG, Duarte RA, Neto NL, Carrara HH, Donadi EA, et al. Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. *Int J Breast Cancer*. 2013;2013:250435.

38. de Kruijf EM, Sajet A, van Nes JG, Natanov R, Putter H, Smit VT, et al. HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. *J Immunol*. 2010;185(12):7452-9.

39. Elliott RL, Jiang XP, Phillips JT, Barnett BG, Head JF. Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression. *Cancer Biother Radiopharm* 2011; 26:153-7.

40. Kleinberg L, Flørenes VA, Skrede M, Dong HP, Nielsen S, McMaster MT, et al. Expression of HLA-G in malignant mesothelioma and clinically aggressive breast carcinoma. *Virchows Arch*. 2006;449(1):31-9.

41. Lefebvre S, Antoine M, Uzan S, McMaster M, Dausset J, Carosella ED, et al. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. *J Pathol*. 2002;196(3):266-74.

42. Werner M, Chott A, Fabiano A, Battifora H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. *Am J Surg Pathol*. 2000;24(7):1016-9.

43. Urosevic M, Dummer R. Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. *Cancer Res*. 2008;68(3):627-30.

44. Ye SR, Yang H, Li K, Dong DD, Lin XM, Yie SM. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. *Mod Pathol*. 2007;20(3):375-83.

45. Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M, et al. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. *Breast Cancer Res Treat* 2013; 139:539-52.

46. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. *Mod Pathol* 2010; 23 Suppl 2:S60-4.

47. Hefti MM, Hu R, Knoblauch NW, Collins LC, Haibe-Kains B, Tamimi RM, et al. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Res*. 2013;15(4):R68.

48. Choi J, Jung WH, Koo JS. Clinicopathologic features of molecular subtypes of triple negative breast cancer based on immunohistochemical markers. *Histol Histopathol.* 2012;27(11):1481-93.
49. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist.* 2010;15 Suppl 5:39-48.
50. Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, Mukesh BN. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin Med Res.* 2009;7(1-2):4-13.
51. Peshkin BN, Alabek ML, Isaacs C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. *Breast Dis.* 2010;32(1-2):25-33.
52. Suba Z. Triple-negative breast cancer risk in women is defined by the defect of estrogen signaling: preventive and therapeutic implications. *Onco Targets Ther.* 2014;7:147-64.
53. Piccinni MP, Giudizi MG, Biagiotti R, Beloni L, Giannarini L, Sampognaro S, et al. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. *J Immunol* 1995; 155:128-33.

TABLE 1 HLA-G expression and clinicopathological features in breast cancer samples

Clinicopathological features	N	HLA-G expression		P value*
		Negative	Positive	
<i>Age (years)</i>				
<40	24	17 (70.8%)	7 (29.1%)	0.433
40-50	75	63 (84%)	12 (16%)	
51-60	73	61 (83,5%)	12 (16,4%)	
>60	30	23 (76,6%)	7 (23,3%)	
<i>Histological grade</i>				
G1	12	10 (83,3%)	2 (16,6%)	0.231
G2	133	112 (84,2%)	21 (15,7)	
G3	57	42 (73,6%)	15 (26,3%)	
<i>Lymph node metastasis</i>				
Absent	30	26 (86,6%)	4 (13,3%)	0.722
Present	27	22 (81,4%)	5 (18,5)	
<i>Tumor size</i>				
≥ 2cm	34	27 (79,4%)	7 (20,5%)	0.520
< 2cm	30	26 (86,6%)	4 (13,3%)	

* Fisher's exact test

TABLE 2 IHC markers and HLA-G expression in breast cancer samples

IHC Markers	N	HLA-G expression		P value*
		Negative	Positive	
<i>ER</i>				
Negative	47	31 (65,9%)	16 (34%)	0.005
Positive	155	133 (85,8%)	22 (14,1%)	
<i>PR</i>				
Negative	79	58 (73,4%)	21 (26,5%)	0.028
Positive	123	106 (86,1%)	17 (13,8%)	
<i>HER2</i>				
Negative	169	137 (81%)	32 (18,9%)	1.0
Positive	33	27 (81,8%)	6 (18,1%)	
<i>Ki-67 proliferation index</i>				
≥ 14%	151	118 (78,1%)	33 (21,8%)	0.064
< 14%	51	46 (90,1%)	5 (9,8%)	

* Fisher's exact test

TABLE 3 HLA-G expression and breast cancer molecular classification

Molecular Classification	N	HLA-G expression		P value *
		Negative	Positive	
Luminal A				
ER+ and/or PR+, HER2-, and Ki-67 <14%	46	42 (91,3%)	4 (8,6%)	
Luminal B				
ER+ and/or PR+, HER2+	23	20 (86,9%)	3 (13%)	
ER+ and/or PR+, HER2-, and Ki-67 ≥14%	86	71 (82,5%)	15 (17,4%)	
HER2				
ER-, PR-, and HER2+	10	7 (70%)	3 (30%)	
TNBC				
ER-, PR-, and HER2-	37	24 (64,8%)	13 (35,1%)	0.032

* Fisher's exact test

TABLE 4 HLA-G expression and breast cancer molecular subtypes

Molecular Classification			P value*
Luminal A	x	Luminal B/HER2+	0.575
Luminal A	x	Luminal B/HER2-	0.181
Luminal A	x	HER2+	0.083
Luminal A	x	TNBC	0.006
Luminal B/HER2+	x	Luminal B/HER2-	0.615
Luminal B/HER2+	x	HER2+	0.258
Luminal B/HER2+	x	TNBC	0.070
Luminal B/HER2-	x	HER2+	0.343
Luminal B/HER2-	x	TNBC	0.035
HER2+	x	TNBC	0.761

*Chi-squared test

TABLE 5 HLA-G expression in non-TNBC and TNBC

HLA-G	MOLECULAR CLASSIFICATION		P value*
	Non-TNBC	TNBC	
Negative	140 84.85%	24 64.86%	
Positive	25 15.15%	13 35.14%	0.009
Total	165	37	

*Chi-squared test

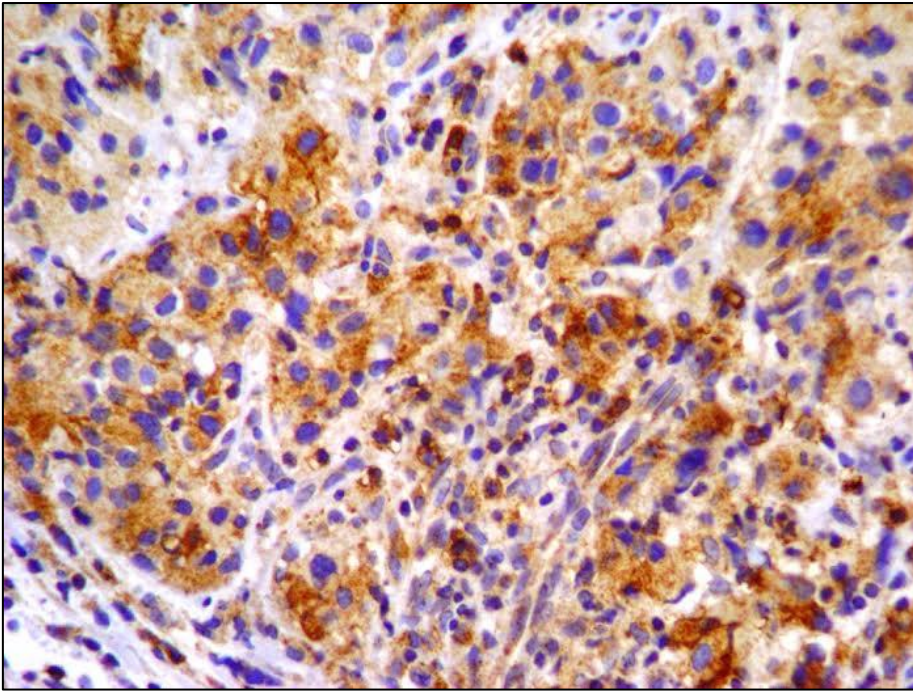


Figure 1 – HLA-G immunohistochemical staining of breast cancer tissue. Magnification 200x.

6 DISCUSSÃO

O sistema imune é capaz de reconhecer e destruir células tumorais, sendo crucial no controle do desenvolvimento e progressão tumoral (DUNN *et al.*, 2002; DUNN *et al.*, 2004). No entanto, as células tumorais possuem eficientes mecanismos de evasão desta regulação, sendo um destes através da molécula HLA-G (DUNN *et al.*, 2004; ROUAS-FREISS *et al.*, 2005; SAYED *et al.*, 2010; AMIOT *et al.*, 2011; MANJILI, 2011; ZIDI e BEN AMOR, 2011; DONG *et al.*, 2012). Este estudo, confirmando os achados de trabalhos previamente publicados, demonstra que a expressão de HLA-G encontra-se significativamente aumentada em tumores malignos de mama quando comparados a tecido mamário normal. Estudos anteriores demonstraram altos níveis de expressão proteica de HLA-G através de IHQ, onde esta variou entre 25 e 87% (SINGER *et al.*, 2003; YIE *et al.*, 2006; DE KRUIJF *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2010; SAYED *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2013). Diferenças na expressão proteica de HLA-G em amostras de câncer de mama podem resultar de questões inerentes à técnica de imunohistoquímica, assim como da fase pré-histológica, isto é, do processamento do material antes da confecção dos blocos histológicos propriamente ditos. A fixação dos tecidos é uma das maiores causas na variação da reprodução da IHQ (WERNER *et al.*, 2000).

Muito embora, vários estudos correlacionaram a expressão de HLA-G aos tumores de grau histológico mais elevados (G2 e G3), este estudo não obteve resultados significativos quanto a este quesito ($p=0,231$), apesar da grande maioria dos tumores em nosso grupo de amostras serem enquadrados como G2 ou G3. De forma semelhante a este estudo, He *et al.* também não conseguiram estabelecer uma relação entre o grau histológico tumoral e a expressão de HLA-G (HE *et al.*, 2010). A relação entre a expressão de HLA-G e o grau histológico sugere que tumores menos diferenciados e geralmente mais agressivos adquiriram a habilidade de escapar da resposta imune do hospedeiro, talvez através da expressão de HLA-G. Em apoio a esta suposição, a expressão de HLA-G também foi correlacionada positivamente a tumores de grau histológico elevado de outras topografias como em carcinomas de ovário e canceres de pulmão, colón e reto, gástrico além de

linfomas de células T (SINGER *et al.*, 2003; YIE *et al.*, 2007; UROSEVIC e DUMMER, 2008). O HLA-G tem ainda também se revelado como um fator prognóstico independente para pacientes com piores resultados, tanto em tumores mamários como em lesões colo retais (YE *et al.*, 2007; DE KRUIJF *et al.*, 2010; HE *et al.*, 2010). Várias pesquisas também indicaram um aumento na expressão de HLA-G através de linfócitos encontrados no infiltrado inflamatório tumoral em neoplasias malignas da mama, pulmão, ovário e melanoma (LEFEBVRE *et al.*, 2002). Tumores mamários menos diferenciados frequentemente apresentam aumento nos linfócitos infiltrantes de tumor (TIL), sendo encontrados níveis elevados de HLA-G nestes tumores. Ademais, estas neoplasias estão usualmente propensas a mutações e apresentam sistemas de reparo de DNA ineficientes, o que por sua vez poderia induzir a expressão de HLA-G (AMIOT *et al.*, 2011).

Outros estudos demonstraram que pacientes cujos tumores eram negativos ou apresentavam baixa expressão de HLA-G tinham tempo de sobrevida maior quando comparados àqueles que tinham tumores com expressão moderada ou forte deste mesmo marcador (HE *et al.*, 2010; SAYED *et al.*, 2010).

A associação da expressão de HLA-G a vários parâmetros clínico-histopatológicos, como o *status* linfonodal e tamanho tumoral têm sido um tanto quanto controversa. Enquanto alguns estudos encontraram uma correlação entre metástases linfonodal e expressão elevada de HLA-G, outros não constataram tal associação (HE *et al.*, 2010; SAYED *et al.*, 2010; DA SILVA *et al.*, 2013). Notadamente, tumores com *status* linfonodal positivos, indicativos de um estágio mais avançado da doença, deveriam exibir um aumento na expressão de HLA-G. Como é sabido o tamanho tumoral é também um fator prognóstico importante, sendo que tumores maiores usualmente estão associados a pior prognóstico. Sendo assim, estes tumores também deveriam estar associados a um aumento na expressão de HLA-G, contudo estudos que avaliaram este parâmetro não conseguiram associar o tamanho tumoral a elevada expressão de HLA-G (DA SILVA, *et al.*, 2013). Devido à falta de dados com relação ao *status* linfonodal e tamanho tumoral para a maioria dos casos neste estudo, não foi possível avaliar de forma adequada a possível relação ou não da expressão de HLA-G a estes parâmetros. Em consequência as análises

destes parâmetros não foram significativas ($p=0,722$ para *status* linfonodal e $p=0,246$ para tamanho tumoral). De modo similar, ao subdividir as amostras por tamanho tumoral, sendo um grupo formado pelos tumores $\geq 2\text{cm}$ e outro formado por tumores menores que 2 cm , não foram obtidos resultados significativos.

Corroborando os achados de outros estudos anteriores, a idade de diagnóstico também não revelou ser diferente em relação à expressão de HLA-G ($p=0,957$). Uma segunda análise das amostras subdivididas em subgrupos por idade também não revelou resultados significativos ($p=0,433$), apesar de este parâmetro ser um dos fatores de risco mais importantes no desenvolvimento do câncer de mama (HE *et al.*, 2010).

Atualmente vários marcadores IHQ são utilizados rotineiramente no auxílio ao diagnóstico, prognóstico e tratamento de tumores mamários. Um destes marcadores é a proteína nuclear, Ki-67, envolvida nas fases ativas do ciclo celular, atuando principalmente na proliferação celular. Conseqüentemente, este se tornou um índice de proliferação celular importante na avaliação do prognóstico, tempo livre de doença e sobrevida, não somente para o câncer de mama, mas como para outros tipos de canceres (INWALD *et al.*, 2013). Este é o primeiro estudo, até onde se tem conhecimento, que avaliou a correlação do Ki-67 à expressão de HLA-G em carcinomas mamários, onde a grande maioria dos tumores positivos para HLA-G apresentaram um índice proliferativo avaliado através de Ki-67, com média de 32%. Este parâmetro se revelou no limite da significância para ambas as análises realizadas. Na primeira testou-se a hipótese nula de que os resultados de Ki-67 eram iguais para casos HLA-G positivos e negativos, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. Esta primeira análise resultou em $p=0,067$. A segunda análise avaliou a expressão de HLA-G em dois grupos de Ki-67, um sendo tumores com índice proliferativo $\geq 14\%$, considerado alto, e outro sendo tumores com índice proliferativo menor que 14% , considerado baixo ($p=0,064$). Estes achados corroboram o fato de que tumores mais agressivos, de grau histológico maior, e que apresentam pior prognóstico tem um índice proliferativo aumentado, podendo sugerir a presença de HLA-G nestes tumores como protetores contra o sistema imune.

Além do Ki-67, RE, RP e HER2 constituem importantes marcadores preditivos

e prognósticos estratificando os carcinomas mamários. Estes têm papel fundamental no prognóstico e principalmente na escolha do tratamento do câncer de mama. Como anteriormente descrito, a maioria dos tumores invasivos de mama são RE+/RP+ e HER2 negativos (SCHMITT e REIS-FILHO, 2003). preditivos e prognósticos estratificando os carcinomas mamários. Estes têm papel fundamental no prognóstico e principalmente na escolha do tratamento do câncer de mama. Como anteriormente descrito, a maioria dos tumores invasivos de mama são RE+/RP+ e HER2 negativos (SCHMITT e REIS-FILHO, 2003). Neste estudo, a expressão de HLA-G foi significativamente associada ao *status* hormonal no câncer de mama, onde tumores negativos para RE e RP apresentaram relação à expressão de HLA-G. Este achado corrobora com o fato de que tumores negativos para os receptores hormonais são geralmente mais agressivos, apresentam grau histológico e índice proliferativo maior, sendo ainda de pior prognóstico, já que não respondem aos tratamentos convencionais. Quanto ao RE, este apresenta uma íntima relação com o RP, onde quase a totalidade de casos negativos para RE são também negativos para RP (HEFTI *et al.*, 2013). Já o HER2 quando avaliado de forma isolada não apresentou resultados significativos quanto à expressão de HLA-G ($p=1,0$).

Até o momento, este estudo é o primeiro a investigar a expressão de HLA-G em relação aos tumores triplo negativos (TNBC). Reforçando os achados de que a expressão de HLA-G está associada a tumores negativos para RE e/ou RP, a expressão de HLA-G também foi positivamente relacionada aos TNBC ($p=0,009$). Conceitualmente os TNBC são negativos para os receptores hormonais e HER2, compondo um grupo de tumores heterogêneo e distinto sob o ponto de vista histológico, patológico e molecular. Os TNBC são ainda, estratificados nos subtipos Basalóides, *claudin-low* podendo ainda compor os tumores apócrinos (PEROU, 2010). A grande maioria dos TNBC encontram-se dentro dos subtipos Basalóides e *claudin-low* (PEROU, 2010; CHOI *et al.*, 2012). Os TNBC representam aproximadamente 10-20% de todos os casos de câncer de mama, sendo na sua maior parte tumores de alto grau histológico, caracterizados por terem pior prognóstico e menor tempo-livre de doença. Além do mais, estes tumores frequentemente são mais agressivos, de progressão mais rápida devido ao alto índice de proliferação (Ki-67),

apresentando metástases precocemente e sendo resistentes à terapia (ONITILLO *et al.*, 2009; PESHKIN *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2012; SUBA, 2014). Pacientes diagnosticadas com este tipo de câncer de mama são usualmente mais jovens e apresentam história familiar da doença. Em relação às suas características moleculares estes tumores apresentam mutações de *BRCA1* e *TP53*, além da perda do gene *retinoblastoma-1 (RB-1)*, todos com papel importante na regulação do ciclo celular (PEROU, 2010; SUBA, 2014). Estes fatores podem consequentemente contribuir para a ativação do *HLA-G* e evasão da resposta imune. Ainda, o *HLA-G* pode ser induzido nos TNBC pela ativação de outras vias assim como fatores presentes no microambiente tumoral tais como hipóxia, isquemia e citocinas inflamatórias (PICCINNI *et al.*, 1995; YIE *et al.*, 2006; AMIOT *et al.*, 2011). Através da comparação da expressão de *HLA-G* entre os subtipos moleculares de câncer de mama, pode-se observar diferença significativa entre os tumores Luminal A e B/HER2- e os TNBC. Este resultado pode ser devido às características clínico-histopatológicas dos tumores Luminal A e B/HER2-. Os tumores Luminal A são geralmente tumores menos agressivos, com excelente prognóstico e tempo livre de doença, além de apresentarem maior tempo de sobrevida e menores taxas de recorrência. Estes tumores também respondem melhor a tratamento, apresentem baixo grau histológico e geralmente tem baixo índice proliferativo (PEROU, 2010; CHOI *et al.*, 2012). Estas características por si só, podem relacionar os tumores Luminal A com a baixa expressão de *HLA-G*. Depois dos tumores Luminal A, os Luminal B são o segundo tipo menos agressivo e com melhor prognóstico quando comparados aos HER2-enriquecidos, TNBC, *claudin-low*, apócrinos e Basalóides. Mais ainda, estes tumores são usualmente G2 e G3, contudo apresentam índices proliferativos maiores que 14%, caracterizando-os como os Luminal B/HER2- (ONITILLO *et al.*, 2009; PESHKIN *et al.*, 2010; CHOI *et al.*, 2012; SUBA, 2014).

Quanto às análises de expressão gênica através de RT-qPCR (não incluídas no Capítulo I), foram avaliadas 78 amostras, sendo 14 de tecido mamário não-tumoral e 64 de tecido mamário tumoral com o objetivo de quantificar a expressão do gene *HLA-G* fazendo uma análise comparativa entre os dois tecidos (tumoral e normal). Em uma primeira análise, utilizando-se um protocolo padrão (descrito em Material e Métodos – Apêndice 1), não se obteve

amplificação das amostras para o gene *HLA-G*, apesar do gene de referência *ACTB* e do controle positivo (placenta de primeiro trimestre) terem sido amplificados de forma adequada, demonstrando o correto funcionamento do ensaio. Conseqüentemente pode-se inferir algumas hipóteses quanto a não amplificação do *HLA-G* no tecido mamário tumoral. A primeira hipótese seria a de que a baixa expressão no tecido mamário inviabilizaria a detecção do *HLA-G* RNAm no método adotado e a segunda de que a não amplificação do *HLA-G* fosse resultante da baixa quantidade e qualidade do RNA obtido durante a extração de material parafinado. Como uma terceira hipótese, poderíamos somar as duas situações: baixa expressão associada às dificuldades metodológicas de obtenção de RNA. Em consequência, em uma segunda fase, foi realizada uma reação de reamplificação para aumentarmos a quantidade do RNA inicial na reação. Devido à limitação de reagentes, foram utilizadas somente as amostras positivas para HLA-G na IHQ, assim como os devidos controles. Dentre as 64 amostras tumorais, somente 11 eram positivas para HLA-G na IHQ e todas foram incluídas neste ensaio. Destas, nove apresentaram expressão positiva de *HLA-G*, demonstrando o sucesso da modificação metodológica. Contudo, não foi possível realizar a análise da quantificação relativa através do método de $2^{-\Delta\Delta Ct}$ devido principalmente ao número reduzido de amostras utilizadas. Todavia, em comparação a uma amostra padrão pré-estabelecida, as nove amostras apresentaram um *Fold Change* variando entre 0.20 a 8.63. Dentre as amostras, a que demonstrou o maior *Fold Change*, foi coincidentemente a amostra CA029 que apresentou coloração fortemente positiva para HLA-G. Mais ainda, esta mesma amostra representa tumor G3, triplo negativo. Obviamente este é um resultado isolado e não pode ser incluído em nossos resultados, porém é estimulante para a continuidade deste ou de outros estudos. Mesmo não obtendo resultados significativos neste quesito é válido apontar que este é o primeiro estudo a utilizar blocos histológicos no estudo do RNAm para o gene *HLA-G* em tecido mamário e a padronização do método já é de grande interesse. Assim sendo, devemos perseverar nesta linha de pesquisa no intuito de melhor avaliar a utilização de blocos histológicos no estudo de expressão gênica para o gene em questão em relação ao câncer de mama.

7 CONCLUSÕES

Através deste estudo pode-se concluir que:

- A proteína HLA-G é expressa de forma significativamente aumentada em tecidos tumorais de mama quando comparados a tecidos não tumorais;
- Tumores triplo negativos (TNBC) e tumores que apresentam RE- e RP- apresentam maior expressão de HLA-G quando comparados com outros subtipos de câncer de mama.
- Tumores com índice proliferativo (Ki-67) $\geq 14\%$ apresentam uma tendência em terem maior expressão de HLA-G quando comparados aos tumores com índice proliferativo menor.
- Não houve diferença estatisticamente significativa quando se avaliou a expressão de HLA-G e parâmetros clínico-histopatológicos, como a idade, o grau histológico e a presença de metástases em linfonodos e o tamanho do tumor.
- Blocos histológicos apresentam potencial para serem utilizados na avaliação da expressão do gene *HLA-G* em tecidos mamários através de RT-qPCR.

Como pode ser visto vários fatores podem estar envolvidos na modulação da expressão do gene *HLA-G*, tanto através de mecanismos diretos como indiretos que ativariam o *HLA-G* em microambientes e micronichos específicos, onde por sua vez, estes antígenos inibiriam as atividades de células imunocompetentes como as NK e linfócitos T contra o tumor. Sendo assim, mais uma vez o *HLA-G* revela-se como um potencial marcador de malignidade em tecidos mamários, assim como um importante marcador de tumores mais agressivos e de pior prognóstico, em específico nos TNBC. Devido à limitada gama de terapias direcionadas aos TNBC, o *HLA-G* pode ainda se tornar um potencial alvo terapêutico, possivelmente através de terapias monoclonais, através do bloqueio do HLA-G, o que poderia por ventura, resultar na reativação das NK e linfócitos T. Esta estratégia poderia ser associada a outros regimes terapêuticos já utilizados, possivelmente levando a um tratamento mais eficaz e específico. Diante destas suposições

são necessários mais estudos nesta área com a finalidade de melhor esclarecer os mecanismos intrínsecos subjacentes ao *HLA-G* e sua relação com o desenvolvimento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS

ADLY, S.; HEWEDI, I. H.; MOKHTAR, N. M. Clinicopathologic significance of molecular classification of breast cancer: relation to nottingham prognosis index. **J Egypt Natl Canc Inst**, v. 22, n. 4, p. 209-15, 2010. ISSN 1110-0362. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21863072> >.

AMBS, S. Prognostic significance of subtype classification for short- and long-term survival in breast cancer: survival time holds the key. **PLoS Med**, v. 7, n. 5, p. e1000281, May 2010. ISSN 1549-1676. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20520798> >.

AMIOT, L.; FERRONE, S.; GROSSE-WILDE, H.; SELIGER, B. Biology of HLA-G in cancer: a candidate molecule for therapeutic intervention? **Cell Mol Life Sci**, v. 68, n. 3, p. 417-31, 2011. ISSN 1420-9071. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21063893> >.

ASSI, H. A.; KHOURY, K. E.; DBOUK, H.; KHALIL, L. E.; MOUHIEDDINE, T. H.; EL SAGHIR, N. S. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. **J Thorac Dis**, v. 5, n. Suppl 1, p. S2-8, 2013. ISSN 2072-1439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23819024> >.

BADRISING, U. A.; SCHREUDER, G. M.; GIPHART, M. J.; GELEIJNS, K.; VERSCHUUREN, J. J.; WINTZEN, A. R.; MAAT-SCHIEMAN, M. L.; VAN DOORN, P.; VAN ENGELEN, B. G.; FABER, C. G.; HOOGENDIJK, J. E.; DE JAGER, A. E.; KOEHLER, P. J.; DE VISSER, M.; VAN DUINEN, S. G.; GROUP, D. I. S. Associations with autoimmune disorders and HLA class I and II antigens in inclusion body myositis. **Neurology**, v. 63, n. 12, p. 2396-8, 2004. ISSN 1526-632X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15623710>>.

BISHARA, A.; BRAUTBAR, C.; NAGLER, A. HLA and graft-versus-host disease: a population-based study of HLA phenotypes of Jewish and Arabic bone marrow transplanted patients in Israel. **Leuk Res**, v. 21, n. 2, p. 111-8, 1997. ISSN 0145-2126. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9112427>>.

BODMER, W. F. The HLA system: structure and function. **J Clin Pathol**, v. 40, n. 9, p. 948-58, 1987. ISSN 0021-9746. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3312304> >.

BOTTLEY, G.; WATHERSTON, O. G.; HIEW, Y. L.; NORRILD, B.; COOK, G. P.; BLAIR, G. E. High-risk human papillomavirus E7 expression reduces cell-surface MHC class I molecules and increases susceptibility to natural killer cells. **Oncogene**, v. 27, n. 12, p. 1794-9, 2008. ISSN 1476-5594. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17828295> >.

BOYD, N. F.; MARTIN, L. J.; BRONSKILL, M.; YAFFE, M. J.; DURIC, N.;

MINKIN, S. Breast tissue composition and susceptibility to breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 102, n. 16, p. 1224-37, 2010. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20616353> >.

BRENOL, C. V.; VEIT, T. D.; CHIES, J. A.; XAVIER, R. M. The role of the HLA-G gene and molecule on the clinical expression of rheumatologic diseases. **Rev Bras Reumatol**, v. 52, n. 1, p. 82-91, 2012. ISSN 1809-4570. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286648> >.

BUCHHOLZ, T. A.; WAZER, D. E. Molecular biology and genetics of breast cancer development: a clinical perspective. **Semin Radiat Oncol**, v. 12, n. 4, p. 285-95, 2002. ISSN 1053-4296. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12382187> >.

CARIATI, M.; PURUSHOTHAM, A. D. Stem cells and breast cancer. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 99-107, 2008. ISSN 1365-2559. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18171421> >.

CAROSELLA, E. D.; HOWANGYIN, K. Y.; FAVIER, B.; LEMAOULT, J. HLA-G-dependent suppressor cells: Diverse by nature, function, and significance. **Hum Immunol**, v. 69, n. 11, p. 700-7, 2008. ISSN 0198-8859. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18817832> >.

CAROSELLA, E. D.; MOREAU, P.; LE MAOULT, J.; LE DISCORDE, M.; DAUSSET, J.; ROUAS-FREISS, N. HLA-G molecules: from maternal-fetal tolerance to tissue acceptance. **Adv Immunol**, v. 81, p. 199-252, 2003. ISSN 0065-2776. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14711057>>.

CARRAWAY, H.; HIDALGO, M. New targets for therapy in breast cancer: mammalian target of rapamycin (mTOR) antagonists. **Breast Cancer Res**, v. 6, n. 5, p. 219-24, 2004. ISSN 1465-542X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15318929>>.

CHANG, C. C.; MURPHY, S. P.; FERRONE, S. Differential in vivo and in vitro HLA-G expression in melanoma cells: potential mechanisms. **Hum Immunol**, v. 64, n. 11, p. 1057-63, 2003. ISSN 0198-8859. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14602236>>.

CHEN, C.; CHANG, Y. C.; LIU, C. L.; CHANG, K. J.; GUO, I. C. Leptin-induced growth of human ZR-75-1 breast cancer cells is associated with up-regulation of cyclin D1 and c-Myc and down-regulation of tumor suppressor p53 and p21WAF1/CIP1. **Breast Cancer Res Treat**, v. 98, n. 2, p. 121-32, 2006. ISSN 0167-6806. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16752079>>.

CHEN, H. X.; LIN, A.; SHEN, C. J.; ZHEN, R.; CHEN, B. G.; ZHANG, X.; CAO, F. L.; ZHANG, J. G.; YAN, W. H. Upregulation of human leukocyte antigen-G expression and its clinical significance in ductal breast cancer. **Hum Immunol**, v. 71, n. 9, p. 892-8, 2010. ISSN 1879-1166. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20547193> >.

CHOI, J.; JUNG, W. H.; KOO, J. S. Clinicopathologic features of molecular subtypes of triple negative breast cancer based on immunohistochemical markers. **Histol Histopathol**, v. 27, n. 11, p. 1481-93, 2012. ISSN 1699-5848. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23018247> >.

CHOO, S. Y. The HLA system: genetics, immunology, clinical testing, and clinical implications. **Yonsei Med J**, v. 48, n. 1, p. 11-23, 2007. ISSN 0513-5796. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17326240> >.

CLEMENTS, C. S.; KJER-NIELSEN, L.; KOSTENKO, L.; HOARE, H. L.; DUNSTONE, M. A.; MOSES, E.; FREED, K.; BROOKS, A. G.; ROSSJOHN, J.; MCCLUSKEY, J. Crystal structure of HLA-G: a nonclassical MHC class I molecule expressed at the fetal-maternal interface. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 9, p. 3360-5, 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15718280>>.

COLEMAN, M. P.; QUARESMA, M.; BERRINO, F.; LUTZ, J. M.; DE ANGELIS, R.; CAPOCACCIA, R.; BAILI, P.; RACHET, B.; GATTA, G.; HAKULINEN, T.; MICHELI, A.; SANT, M.; WEIR, H. K.; ELWOOD, J. M.; TSUKUMA, H.; KOIFMAN, S.; E SILVA, G. A.; FRANCISCI, S.; SANTAQUILANI, M.; VERDECCHIA, A.; STORM, H. H.; YOUNG, J. L.; GROUP, C. W. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). **Lancet Oncol**, v. 9, n. 8, p. 730-56, 2008. ISSN 1474-5488. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18639491>>.

COLEY, H. M. Mechanisms and strategies to overcome chemotherapy resistance in metastatic breast cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 34, n. 4, p. 378-90, 2008. ISSN 0305-7372. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18367336>>.

DA SILVA, G. B.; SILVA, T. G.; DUARTE, R. A.; NETO, N. L.; CARRARA, H. H.; DONADI, E. A.; GONÇALVES, M. A.; SOARES, E. G.; SOARES, C. P. Expression of the Classical and Nonclassical HLA Molecules in Breast Cancer. **Int J Breast Cancer**, v. 2013, p. 250435, 2013. ISSN 2090-3170. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24363939> >.

DAUSSET, J. The major histocompatibility complex in man. **Science**, v. 213, n. 4515, p. 1469-74, 1981. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6792704>>.

DE KRUIJF, E. M.; SAJET, A.; VAN NES, J. G.; NATANOV, R.; PUTTER, H.; SMIT, V. T.; LIEFERS, G. J.; VAN DEN ELSEN, P. J.; VAN DE VELDE, C. J.; KUPPEN, P. J. HLA-E and HLA-G expression in classical HLA class I-negative tumors is of prognostic value for clinical outcome of early breast cancer patients. **J Immunol**, v. 185, n. 12, p. 7452-9, 2010. ISSN 1550-6606. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21057081> >.

DE MOURA GALLO, C. V.; AZEVEDO, E. S. M. G.; DE MORAES, E.; OLIVIER, M.; HAINAUT, P. TP53 mutations as biomarkers for cancer epidemiology in Latin America: current knowledge and perspectives. **Mutat Res**, v. 589, n. 3, p.

192-207, 2005. ISSN 0027-5107/0027-5107. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15878142> >.

DEAN-COLOMB, W.; ESTEVA, F. J. Her2-positive breast cancer: herceptin and beyond. **Eur J Cancer**, v. 44, n. 18, p. 2806-12, 2008. ISSN 1879-0852. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19022660> >.

DIMRI, G.; BAND, H.; BAND, V. Mammary epithelial cell transformation: insights from cell culture and mouse models. **Breast Cancer Res**, v. 7, n. 4, p. 171-9, 2005. ISSN 1465-542X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15987472>>.

DONG, D. D.; YIE, S. M.; LI, K.; LI, F.; XU, Y.; XU, G.; SONG, L.; YANG, H. Importance of HLA-G expression and tumor infiltrating lymphocytes in molecular subtypes of breast cancer. **Hum Immunol**, v. 73, n. 10, p. 998-1004, 2012. ISSN 1879-1166. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22841927>>.

DUNN, G. P.; BRUCE, A. T.; IKEDA, H.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. Cancer immunoediting: from immunosurveillance to tumor escape. **Nat Immunol**, v. 3, n. 11, p. 991-8, 2002. ISSN 1529-2908. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12407406> >.

DUNN, G. P.; OLD, L. J.; SCHREIBER, R. D. The three Es of cancer immunoediting. **Annu Rev Immunol**, v. 22, p. 329-60, 2004. ISSN 0732-0582. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15032581> >.

EASTON, D. F.; BISHOP, D. T.; FORD, D.; CROCKFORD, G. P. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. **Am J Hum Genet**, v. 52, n. 4, p. 678-701, 1993. ISSN 0002-9297. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8460634>>.

ECCLES, D.; GERTY, S.; SIMMONDS, P.; HAMMOND, V.; ENNIS, S.; ALTMAN, D. G.; GROUP, P. S. Prospective study of Outcomes in Sporadic versus Hereditary breast cancer (POSH): study protocol. **BMC Cancer**, v. 7, p. 160, 2007. ISSN 1471-2407. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17697367> >.

ELLIOTT, R. L.; JIANG, X. P.; PHILLIPS, J. T.; BARNETT, B. G.; HEAD, J. F. Human leukocyte antigen G expression in breast cancer: role in immunosuppression. **Cancer Biother Radiopharm**, v. 26, n. 2, p. 153-7, 2011. ISSN 1557-8852. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21510769>>.

ELLIS, M. Overcoming endocrine therapy resistance by signal transduction inhibition. **Oncologist**, v. 9 Suppl 3, p. 20-6, 2004. ISSN 1083-7159. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15163844> >.

FARMER, P.; BONNEFOI, H.; BECETTE, V.; TUBIANA-HULIN, M.;

FUMOLEAU, P.; LARSIMONT, D.; MACGROGAN, G.; BERGH, J.; CAMERON, D.; GOLDSTEIN, D.; DUSS, S.; NICOULAZ, A. L.; BRISKEN, C.; FICHE, M.; DELORENZI, M.; IGGO, R. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene**, v. 24, n. 29, p. 4660-71, 2005. ISSN 0950-9232 Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15897907>>.

FENG, Z.; ZHANG, H.; LEVINE, A. J.; JIN, S. The coordinate regulation of the p53 and mTOR pathways in cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 23, p. 8204-9, 2005. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15928081>>.

FONS, P.; CHABOT, S.; CARTWRIGHT, J. E.; LENFANT, F.; L'FAQIHI, F.; GIUSTINIANI, J.; HERAULT, J. P.; GUEGUEN, G.; BONO, F.; SAVI, P.; AGUERRE-GIRR, M.; FOURNEL, S.; MALECAZE, F.; BENSUSSAN, A.; PLOUËT, J.; LE BOUTEILLER, P. Soluble HLA-G1 inhibits angiogenesis through an apoptotic pathway and by direct binding to CD160 receptor expressed by endothelial cells. **Blood**, v. 108, n. 8, p. 2608-15, 2006. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16809620>>.

FOSTER, J. S.; HENLEY, D. C.; BUKOVSKY, A.; SETH, P.; WIMALASENA, J. Multifaceted regulation of cell cycle progression by estrogen: regulation of Cdk inhibitors and Cdc25A independent of cyclin D1-Cdk4 function. **Mol Cell Biol**, v. 21, n. 3, p. 794-810, 2001. ISSN 0270-7306. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11154267>>.

GOMES, A. Q.; CORREIA, D. V.; SILVA-SANTOS, B. Non-classical major histocompatibility complex proteins as determinants of tumour immunosurveillance. **EMBO Rep**, v. 8, n. 11, p. 1024-30, 2007. ISSN 1469-221X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17972902>>.

GOMEZ, B. P.; RIGGINS, R. B.; SHAJAHAN, A. N.; KLIMACH, U.; WANG, A.; CRAWFORD, A. C.; ZHU, Y.; ZWART, A.; WANG, M.; CLARKE, R. Human X-box binding protein-1 confers both estrogen independence and antiestrogen resistance in breast cancer cell lines. **FASEB J**, v. 21, n. 14, p. 4013-27, 2007. ISSN 1530-6860. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17660348>>.

HAMMOND, M. E.; HAYES, D. F.; WOLFF, A. C.; MANGU, P. B.; TEMIN, S. American society of clinical oncology/college of american pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Oncol Pract**, v. 6, n. 4, p. 195-7, 2010. ISSN 1935-469X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21037871>>.

HE, X.; DONG, D. D.; YIE, S. M.; YANG, H.; CAO, M.; YE, S. R.; LI, K.; LIU, J.; CHEN, J. HLA-G expression in human breast cancer: implications for diagnosis and prognosis, and effect on alloctotoxic lymphocyte response after hormone treatment in vitro. **Ann Surg Oncol**, v. 17, n. 5, p. 1459-69, 2010. ISSN 1534-4681. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20052552>>.

HEFTI, M. M.; HU, R.; KNOBLAUCH, N. W.; COLLINS, L. C.; HAIBE-KAINS, B.; TAMIMI, R. M.; BECK, A. H. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. **Breast Cancer Res**, v. 15, n. 4, p. R68, 2013. ISSN 1465-542X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/239719473>>.

HENNESSY, B. T.; GONZALEZ-ANGULO, A. M.; STEMKE-HALE, K.; GILCREASE, M. Z.; KRISHNAMURTHY, S.; LEE, J. S.; FRIDLAND, J.; SAHIN, A.; AGARWAL, R.; JOY, C.; LIU, W.; STIVERS, D.; BAGGERLY, K.; CAREY, M.; LLUCH, A.; MONTEAGUDO, C.; HE, X.; WEIGMAN, V.; FAN, C.; PALAZZO, J.; HORTOBAGYI, G. N.; NOLDEN, L. K.; WANG, N. J.; VALERO, V.; GRAY, J. W.; PEROU, C. M.; MILLS, G. B. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. **Cancer Res**, v. 69, n. 10, p. 4116-24, 2009. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19435916>>.

HERSCHKOWITZ, J. I.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V. J.; MIKAEIAN, I.; USARY, J.; HU, Z.; RASMUSSEN, K. E.; JONES, L. P.; ASSEFNIA, S.; CHANDRASEKHARAN, S.; BACKLUND, M. G.; YIN, Y.; KHRAMTSOV, A. I.; BASTEIN, R.; QUACKENBUSH, J.; GLAZER, R. I.; BROWN, P. H.; GREEN, J. E.; KOPELOVICH, L.; FURTH, P. A.; PALAZZO, J. P.; OLOPADE, O. I.; BERNARD, P. S.; CHURCHILL, G. A.; VAN DYKE, T.; PEROU, C. M. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007. ISSN 1465-6914. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17493263>>.

HLA Nomenclature Database. Disponível em: <<http://hla.alleles.org/nomenclature/stats.html>>, acesso em Fevereiro de 2014.

HOWANGYIN, K. Y.; LOUSTAU, M.; WU, J.; ALEGRE, E.; DAOUYA, M.; CAUMARTIN, J.; SOUSA, S.; HORUZSKO, A.; CAROSELLA, E. D.; LEMAULT, J. Multimeric structures of HLA-G isoforms function through differential binding to LILRB receptors. **Cell Mol Life Sci**, 2012. ISSN 1420-9071. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22802125>>.

HOWE, L. R.; BROWN, P. H. Targeting the HER/EGFR/ErbB family to prevent breast cancer. **Cancer Prev Res (Phila)**, v. 4, n. 8, p. 1149-57, 2011. ISSN 1940-6215. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816844>>.

HU, Z.; FAN, C.; OH, D. S.; MARRON, J. S.; HE, X.; QAQISH, B. F.; LIVASY, C.; CAREY, L. A.; REYNOLDS, E.; DRESSLER, L.; NOBEL, A.; PARKER, J.; EWEND, M. G.; SAWYER, L. R.; WU, J.; LIU, Y.; NANDA, R.; TRETIAKOVA, M.; RUIZ ORRICO, A.; DREHER, D.; PALAZZO, J. P.; PERREARD, L.; NELSON, E.; MONE, M.; HANSEN, H.; MULLINS, M.; QUACKENBUSH, J. F.; ELLIS, M. J.; OLOPADE, O. I.; BERNARD, P. S.; PEROU, C. M. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, v. 7, p. 96, 2006. ISSN 1471-2164. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16643655>>.

HVIID, T. V. HLA-G in human reproduction: aspects of genetics, function and pregnancy complications. **Hum Reprod Update**, v. 12, n. 3, p. 209-32, 2006. ISSN 1355-4786. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16280356>>.

IARC. Latest world cancer statistics Global cancer burden rises to 14.1 million new cases in 2012: Marked increase in breast cancers must be addressed. Disponível em: <<http://www.ncrj.ie/news/article/iarc-release-globocan-2012-global-cancer-burden-rises-141-million-new-cases-2012-and>>.

IBRAHIM, E. C.; MORANGE, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. Heat shock and arsenite induce expression of the nonclassical class I histocompatibility HLA-G gene in tumor cell lines. **Cell Stress Chaperones**, v. 5, n. 3, p. 207-18, 2000. ISSN 1355-8145. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11005379>>.

INCA. Instituto Nacional do Câncer - Estimativas e Incidência de Câncer no Brasil 2010. Rio de Janeiro, 2010. Disponível em: <<http://www1.inca.gov.br/cancernobrasil/2010/>>.

INCA. Instituto Nacional do Câncer - Estimativas e Incidência de Câncer no Brasil 2012. Rio de Janeiro, 2012. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_57/v04/pdf/13_resenha_estimativa2012_incidencia_de_cancer_no_brasil.pdf>.

INCA. Instituto Nacional do Câncer - Estimativas e Incidência de Câncer no Brasil 2014. Rio de Janeiro, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/>>.

INWALD, E. C.; KLINKHAMMER-SCHALKE, M.; HOFSTÄDTER, F.; ZEMAN, F.; KOLLER, M.; GERSTENHAUER, M.; ORTMANN, O. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer Res Treat**, v. 139, n. 2, p. 539-52, 2013. ISSN 1573-7217. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674192>>.

KETROUSSI, F.; GIULIANI, M.; BAHRI, R.; AZZARONE, B.; CHARPENTIER, B.; DURRBACH, A. Lymphocyte cell-cycle inhibition by HLA-G is mediated by phosphatase SHP-2 and acts on the mTOR pathway. **PLoS One**, v. 6, n. 8, p. e22776, 2011. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21887223>>.

KIRSZENBAUM, M.; MOREAU, P.; GLUCKMAN, E.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. An alternatively spliced form of HLA-G mRNA in human trophoblasts and evidence for the presence of HLA-G transcript in adult lymphocytes. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 10, p. 4209-13, 1994. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8183892>>.

KLEIN, J.; SATO, A. The HLA System. **New England Journal of Medicine**, v. 343, n. 10, p. 702-709, 2000. Disponível em:

<<http://www.nejm.org/doi/full/10.1056/NEJM200009073431006>>.

KOCHAN, G.; ESCORS, D.; BRECKPOT, K.; GUERRERO-SETAS, D. Role of non-classical MHC class I molecules in cancer immunosuppression. **Oncoimmunology**, v. 2, n. 11, p. e26491, 2013. ISSN 2162-4011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482746>>.

KOVATS, S.; MAIN, E. K.; LIBRACH, C.; STUBBLEBINE, M.; FISHER, S. J.; DEMARS, R. A class I antigen, HLA-G, expressed in human trophoblasts. **Science**, v. 248, n. 4952, p. 220-3, 1990. ISSN 0036-8075. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2326636>>.

LEFEBVRE, S.; ANTOINE, M.; UZAN, S.; MCMASTER, M.; DAUSSET, J.; CAROSELLA, E. D.; PAUL, P. Specific activation of the non-classical class I histocompatibility HLA-G antigen and expression of the ILT2 inhibitory receptor in human breast cancer. **J Pathol**, v. 196, n. 3, p. 266-74, 2002. ISSN 0022-3417. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11857488>>.

LEHMANN-CHE, J.; HAMY, A. S.; PORCHER, R.; BARRITAU, M.; BOUHIDEL, F.; HABUELLELAH, H.; LEMAN-DETOURS, S.; DE ROQUANCOURT, A.; CAHEN-DOIDY, L.; BOURSTYN, E.; DE CREMOUX, P.; DE BAZELAIRE, C.; ALBITER, M.; GIACCHETTI, S.; CUVIER, C.; JANIN, A.; ESPIE, M.; DE THE, H.; BERTHEAU, P. Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER2 or GCDPF15. **Breast Cancer Res**, v. 15, n. 3, p. R37, 2013. ISSN 1465-542X 1465-5411. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23663520>>.

LEMAOULT, J.; CAUMARTIN, J.; DAOUYA, M.; FAVIER, B.; LE ROND, S.; GONZALEZ, A.; CAROSELLA, E. D. Immune regulation by pretenders: cell-to-cell transfers of HLA-G make effector T cells act as regulatory cells. **Blood**, v. 109, n. 5, p. 2040-8, 2007. ISSN 0006-4971. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17077329>>.

ALI, C. I.; URIBE, D. J.; DALING, J. R. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. **Br J Cancer**, v. 93, n. 9, p. 1046-52, 2005. ISSN 0007-0920. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16175185>>.

LI, W.; RAY, R. M.; LAMPE, J. W.; LIN, M. G.; GAO, D. L.; WU, C.; NELSON, Z. C.; FITZGIBBONS, E. D.; HORNER, N.; HU, Y. W.; SHANNON, J.; SATIA, J. A.; PATTERSON, R. E.; STALSBERG, H.; THOMAS, D. B. Dietary and other risk factors in women having fibrocystic breast conditions with and without concurrent breast cancer: a nested case-control study in Shanghai, China. **Int J Cancer**, v. 115, n. 6, p. 981-93, 2005. ISSN 0020-7136. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15723298>>.

LIAO, D. J.; DICKSON, R. B. c-Myc in breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 7, n. 3, p. 143-64, 2000. ISSN 1351-0088. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11021963>>.

LIU, R.; LI, Z.; BAI, S.; ZHANG, H.; TANG, M.; LEI, Y.; CHEN, L.; LIANG, S.; ZHAO, Y. L.; WEI, Y.; HUANG, C. Mechanism of cancer cell adaptation to metabolic stress: proteomics identification of a novel thyroid hormone-mediated gastric carcinogenic signaling pathway. **Mol Cell Proteomics**, v. 8, n. 1, p. 70-85, 2009. ISSN 1535-9484. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18723843>>.

LIVAK, K. J.; SCHMITTGEN, T. D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n. 4, p. 402-8, 2001. ISSN 1046-2023. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11846609>>.

LORINCZ, A. M.; SUKUMAR, S. Molecular links between obesity and breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 13, n. 2, p. 279-92, 2006. ISSN 1351-0088. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16728564> >.

MANJILI, M. H. Revisiting cancer immunoediting by understanding cancer immune complexity. **J Pathol**, v. 224, n. 1, p. 5-9, 2011. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21480229> >.

MCMASTER, M.; ZHOU, Y.; SHORTER, S.; KAPASI, K.; GERAGHTY, D.; LIM, K. H.; FISHER, S. HLA-G isoforms produced by placental cytotrophoblasts and found in amniotic fluid are due to unusual glycosylation. **J Immunol**, v. 160, n. 12, p. 5922-8, 1998. ISSN 0022-1767. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9637505> >.

MEHRA, N. K. The HLA genes and their diverse polymorphism. **Indian J Clin Biochem**, v. 15, n. Suppl 1, p. 65-77, 2000. ISSN 0970-1915. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23105270> >.

MENG, S.; TRIPATHY, D.; SHETE, S.; ASHFAQ, R.; HALEY, B.; PERKINS, S.; BEITSCH, P.; KHAN, A.; EUHUS, D.; OSBORNE, C.; FRENKEL, E.; HOOVER, S.; LEITCH, M.; CLIFFORD, E.; VITETTA, E.; MORRISON, L.; HERLYN, D.; TERSTAPPEN, L. W.; FLEMING, T.; FEHM, T.; TUCKER, T.; LANE, N.; WANG, J.; UHR, J. HER-2 gene amplification can be acquired as breast cancer progresses. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 101, n. 25, p. 9393-8, 2004. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15194824>>.

MENIER, C.; ROUAS-FREISS, N.; CAROSELLA, E. The HLA-G non classical MHC class I molecule is expressed in cancer with poor prognosis. Implications in tumour escape from immune system and clinical applications. **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**, 2008. Disponível em: < <http://AtlasGeneticsOncology.org/Deep/HLAinCancerID20070.html> >.

METCALFE, K. A.; FINCH, A.; POLL, A.; HORSMAN, D.; KIM-SING, C.; SCOTT, J.; ROYER, R.; SUN, P.; NAROD, S. A. Breast cancer risks in women with a family history of breast or ovarian cancer who have tested negative for a BRCA1 or BRCA2 mutation. **Br J Cancer**, v. 100, n. 2, p. 421-5, 2009. ISSN 1532-1827. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19088722>>.

MORANDI, F.; FERRETTI, E.; BOCCA, P.; PRIGIONE, I.; RAFFAGHELLO, L.; PISTOIA, V. A novel mechanism of soluble HLA-G mediated immune modulation: downregulation of T cell chemokine receptor expression and impairment of chemotaxis. **PLoS One**, v. 5, n. 7, p. e11763, 2010. ISSN 1932-6203. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20668702>>.

MOREAU, P.; FLAJOLLET, S.; CAROSELLA, E. D. Non-classical transcriptional regulation of HLA-G: an update. **J Cell Mol Med**, v. 13, n. 9B, p. 2973-89, 2009. ISSN 1582-4934. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19508383>>.

NAROD, S. A.; FOULKES, W. D. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 9, p. 665-76, 2004. ISSN 1474-175X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15343273>>.

NAROD, S. A.; OFFIT, K. Prevention and management of hereditary breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 23, n. 8, p. 1656-63, 2005. ISSN 0732-183X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15755973>>.

OH, D. S.; TROESTER, M. A.; USARY, J.; HU, Z.; HE, X.; FAN, C.; WU, J.; CAREY, L. A.; PEROU, C. M. Estrogen-regulated genes predict survival in hormone receptor-positive breast cancers. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 11, p. 1656-64, 2006. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16505416>>.

OLIVEIRA, N.; GOMIG, T.; MILIOLI, H.; URBAN, C.; LIMA, R.; CAVALLI, I.; RIBEIRO, E. Comparative proteomics between ductal and lobular primary breast carcinomas., 57o Congresso da Sociedade Brasileira de Genética, 2011, Águas de Lindoia. Anais do 57o Congresso da SBG.

OMS. GLOBOCAN 2000:Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide. 2010. Disponível em: <<http://www.who.int/cancer/resources/incidences/en/>>.

ONITILLO, A. A.; ENGEL, J. M.; GREENLEE, R. T.; MUKESH, B. N. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. **Clin Med Res**, v. 7, n. 1-2, p. 4-13, 2009. ISSN 1554-6179. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19574486>>.

OSBORNE, C.; WILSON, P.; TRIPATHY, D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. **Oncologist**, v. 9, n. 4, p. 361-77, 2004. ISSN 1083-7159. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15266090>>.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005. ISSN 0007-9235. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15761078>>.

PAUL, P.; ROUAS-FREISS, N.; KHALIL-DAHER, I.; MOREAU, P.; RITEAU, B.;

LE GAL, F. A.; AVRIL, M. F.; DAUSSET, J.; GUILLET, J. G.; CAROSELLA, E. D. HLA-G expression in melanoma: a way for tumor cells to escape from immunosurveillance. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, n. 8, p. 4510-5, 1998. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9539768>>.

PAULINELLI, R. R.; FREITAS-JUNIOR, R.; MOREIRA, M. A.; MORAES, V. A.; BERNARDES-JUNIOR, J. R.; VIDAL CDA, S.; RUIZ, A. N.; LUCATO, M. T. Risk of malignancy in solid breast nodules according to their sonographic features. **J Ultrasound Med**, v. 24, n. 5, p. 635-41, 2005. ISSN 0278-4297 0278-4297. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15840795>>.

PEROU, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. **Oncologist**, v. 15 Suppl 5, p. 39-48, 2010. ISSN 1549-490X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21138954>>.

PEROU, C. M.; SØRLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A.; POLLACK, J. R.; ROSS, D. T.; JOHNSEN, H.; AKSLEN, L. A.; FLUGE, O.; PERGAMENSCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.; ZHU, S. X.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602>>.

PESHKIN, B. N.; ALABEK, M. L.; ISAACS, C. BRCA1/2 mutations and triple negative breast cancers. **Breast Dis**, v. 32, n. 1-2, p. 25-33, 2010. ISSN 1558-1551. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21778580>>.

PICCINNI, M. P.; GIUDIZI, M. G.; BIAGIOTTI, R.; BELONI, L.; GIANNARINI, L.; SAMPOGNARO, S.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; ANNUNZIATO, F.; LIVI, C. Progesterone favors the development of human T helper cells producing Th2-type cytokines and promotes both IL-4 production and membrane CD30 expression in established Th1 cell clones. **J Immunol**, v. 155, n. 1, p. 128-33, Jul 1995. ISSN 0022-1767. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7541410>>.

PRAT, A.; PARKER, J. S.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J. I.; HE, X.; PEROU, C. M. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010. ISSN 1465-542X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20813035>>.

PROVATOPOULOU, X.; KALOGERA, E.; SAGKRIOTIS, A.; ZAGOURI, F.; NONNI, A.; ZOGRAFOS, G. C.; GOUNARIS, A. Soluble human leukocyte antigen-G expression in patients with ductal and lobular breast malignancy. **Anticancer Res**, v. 32, n. 3, p. 1021-6, 2012. ISSN 1791-7530. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22399626>>.

RIGGINS, R. B.; SCHRECENGOST, R. S.; GUERRERO, M. S.; BOUTON, A. H. Pathways to tamoxifen resistance. **Cancer Lett**, v. 256, n. 1, p. 1-24, 2007.

ISSN 0304-3835. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17475399>>.

RING, A.; DOWSETT, M. Mechanisms of tamoxifen resistance. **Endocr Relat Cancer**, v. 11, n. 4, p. 643-58, 2004. ISSN 1351-0088. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15613444>>.

ROBBINS, S.; KUMAR, V.; COTRAN, R. **Robbins and Cotran pathologic basis of disease**. 8 ed. Philadelphia, PA: Saunder/Elsevier, 2010.

ROLFSEN, G. B.; CASTELLI, E. C.; DONADI, E. A.; DUARTE, R. A.; SOARES, C. P. HLA-G polymorphism and breast cancer. **Int J Immunogenet**, 2013. ISSN 1744-313X. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24164707>>.

ROUAS-FREISS, N.; MOREAU, P.; FERRONE, S.; CAROSELLA, E. D. HLA-G proteins in cancer: do they provide tumor cells with an escape mechanism? **Cancer Res**, v. 65, n. 22, p. 10139-44, 2005. ISSN 0008-5472. Disponível em:
< <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16287995> >.

SASCO, A. J. Epidemiology of breast cancer: an environmental disease? **APMIS**, v. 109, n. 5, p. 321-32, 2001. ISSN 0903-4641. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11478680>>.

SAYED, D.; BADR, G.; MAXIMOUS, D.; MIKHAIL, N. N.; ABU-TARBOUSH, F.; ALHAZZA, I. M. HLA-G and its relation to proliferation index in detection and monitoring breast cancer patients. **Tissue Antigens**, v. 75, n. 1, p. 40-7, 2010. ISSN 1399-0039. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20196818>>.

SCHMITT, F. C.; REIS-FILHO, J. S. c-myc, not her-2/neu, can predict the prognosis of breast cancer patients: how novel, how accurate, and how significant? **Breast Cancer Res**, v. 5, n. 4, p. 188-91, 2003. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12817989> >.

SCHNITT, S. J. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol**, v. 23 Suppl 2, p. S60-4, 2010. ISSN 1530-0285. Disponível em:
<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20436504>>.

SHANKARKUMAR, U. The Human Leukocyte Antigen (HLA) System. **Int J Hum Genet**. v. 4, n. 2, p. 91-103, 2004.

SHIH, I. M. Application of human leukocyte antigen-G expression in the diagnosis of human cancer. **Hum Immunol**, v. 68, n. 4, p. 272-6, 2007. ISSN 0198-8859. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17400063>>.

SINGER, G.; REBMANN, V.; CHEN, Y. C.; LIU, H. T.; ALI, S. Z.; REINSBERG, J.; MCMASTER, M. T.; PFEIFFER, K.; CHAN, D. W.; WARDELMANN, E.; GROSSE-WILDE, H.; CHENG, C. C.; KURMAN, R. J.; SHIH, I. M. HLA-G is a

potential tumor marker in malignant ascites. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 12, p. 4460-4, 2003. ISSN 1078-0432. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14555519>>.

SØRLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H.; HASTIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; THORSEN, T.; QUIST, H.; MATESE, J. C.; BROWN, P. O.; BOTSTEIN, D.; LØNNING, P. E.; BØRRESEN-DALE, A. L. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, 2001. ISSN 0027-8424. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11553815>>.

SUBA, Z. Triple-negative breast cancer risk in women is defined by the defect of estrogen signaling: preventive and therapeutic implications. **Onco Targets Ther**, v. 7, p. 147-164, 2014. ISSN 1178-6930. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24482576>>.

THORSBY, E. A short history of HLA. **Tissue Antigens**, v. 74, n. 2, p. 101-16, 2009. ISSN 1399-0039. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19523022>>.

UROSEVIC, M.; DUMMER, R. Human leukocyte antigen-G and cancer immunoediting. **Cancer Res**, v. 68, n. 3, p. 627-30, 2008. ISSN 1538-7445. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18245459>>.

VAN LITH, M.; MCEWEN-SMITH, R. M.; BENHAM, A. M. HLA-DP, HLA-DQ, and HLA-DR have different requirements for invariant chain and HLA-DM. **J Biol Chem**, v. 285, n. 52, p. 40800-8, 2010. ISSN 1083-351X. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20959457>>.

VENKITARAMAN, A. R. Cancer susceptibility and the functions of BRCA1 and BRCA2. **Cell**, v. 108, n. 2, p. 171-82, 2002. ISSN 0092-8674. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11832208>>.

VIEIRA, D. S.; DUFLOTH, R. M.; SCHMITT, F. C.; ZEFERINO, L. C. [Breast cancer: new concepts in classification]. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 30, n. 1, p. 42-7, 2008. ISSN 1806-9339. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19142542>>.

WANG, J. M.; ZHAO, H. X.; WANG, L.; GAO, Z. Y.; YAO, Y. Q. The human leukocyte antigen G promotes trophoblast fusion and β -hCG production through the Erk1/2 pathway in human choriocarcinoma cell lines. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 434, n. 3, p. 460-5, 2013. ISSN 1090-2104. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23583402>>.

WEIGELT, B.; HORLINGS, H. M.; KREIKE, B.; HAYES, M. M.; HAUPTMANN, M.; WESSELS, L. F.; DE JONG, D.; VAN DE VIJVER, M. J.; VAN'T VEER, L. J.; PETERSE, J. L. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. **J Pathol**, v. 216, n. 2, p. 141-50, 2008. ISSN 1096-9896. Disponível em:

<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18720457>>.

WERNER, M.; CHOTT, A.; FABIANO, A.; BATTIFORA, H. Effect of formalin tissue fixation and processing on immunohistochemistry. **Am J Surg Pathol**, v. 24, n. 7, p. 1016-9, 2000. ISSN 0147-5185. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10895825> >.

WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E.; SCHWARTZ, J. N.; HAGERTY, K. L.; ALLRED, D. C.; COTE, R. J.; DOWSETT, M.; FITZGIBBONS, P. L.; HANNA, W. M.; LANGER, A.; MCSHANE, L. M.; PAIK, S.; PEGRAM, M. D.; PEREZ, E. A.; PRESS, M. F.; RHODES, A.; STURGEON, C.; TAUBE, S. E.; TUBBS, R.; VANCE, G. H.; VAN DE VIJVER, M.; WHEELER, T. M.; HAYES, D. F.; ONCOLOGY, A. S. O. C.; PATHOLOGISTS, C. O. A. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 1, p. 118-45, 2007. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17159189> >.

YAMASHITA, H. Current research topics in endocrine therapy for breast cancer. **Int J Clin Oncol**, v. 13, n. 5, p. 380-3, 2008. ISSN 1341-9625. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18946747> >.

YE, S. R.; YANG, H.; LI, K.; DONG, D. D.; LIN, X. M.; YIE, S. M. Human leukocyte antigen G expression: as a significant prognostic indicator for patients with colorectal cancer. **Mod Pathol**, v. 20, n. 3, p. 375-83, 2007. ISSN 0893-3952. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17277760>>.

YERUSHALMI, R.; HAYES, M. M.; GELMON, K. A. Breast carcinoma--rare types: review of the literature. **Ann Oncol**, v. 20, n. 11, p. 1763-70, 2009. ISSN 1569-8041. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19602565>>.

YIE, S. HLA-G (major histocompatibility complex, class I, G). **Atlas Genet Cytogenet Oncol Haematol**, 2012. Disponível em: <<http://AtlasGeneticsOncology.org/Genes/HLA-GID43744ch6p22.html>>

YIE, S. M.; XIAO, R.; LIBRACH, C. L. Progesterone regulates HLA-G gene expression through a novel progesterone response element. **Hum Reprod**, v. 21, n. 10, p. 2538-44, 2006. ISSN 0268-1161. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16684846>>.

YIE, S. M.; YANG, H.; YE, S. R.; LI, K.; DONG, D. D.; LIN, X. M. Expression of HLA-G is associated with prognosis in esophageal squamous cell carcinoma. **Am J Clin Pathol**, v. 128, n. 6, p. 1002-9, Dec 2007. ISSN 0002-9173. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18024326> >.

ZIDI, I.; BEN AMOR, N. HLA-G regulators in cancer medicine: an outline of key requirements. **Tumour Biol**, v. 32, n. 6, p. 1071-86, 2011. ISSN 1423-0380. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21792710> >

APÊNDICES

1 MATERIAL E MÉTODOS.....	91
1.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	91
1.2 CORTES HISTOLÓGICOS E CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS.....	97
1.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL	100
1.5 RT-qPCR	101
1.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	105
2 RESULTADOS ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	106
2.1 ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS GERAIS DA AMOSTRA	106
2.1.1 Variáveis quantitativas	106
2.1.2 Variáveis qualitativas.....	107
2.2 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE IDADE, PARÂMETROS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS, EXPRESSÃO DE RE, RP E HER2 E EXPRESSÃO DE HLA-G.....	109
2.2.1 Variáveis quantitativas	109
2.2.2 Variáveis qualitativas.....	111

1 MATERIAL E MÉTODOS

1.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Foram coletadas amostras de tecido mamário tumoral e não-tumoral em vários hospitais e clínicas da região de Curitiba - PR, entre 2007 e 2012, durante procedimentos cirúrgicos e de biópsias pelos médicos patologistas do Citolab - Laboratório de Citopatologia e Histopatologia. O material obtido foi processado e a partir destes foram confeccionados blocos de parafina e lâminas histológicas para a realização de análise anátomo-patológica.

A utilização destas amostras foram aprovadas, assim como o projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética da UFPR em 26 de Setembro de 2012 conforme parecer do CEP n° 107.701.

Através do banco de dados, laudos e blocário do Laboratório Citolab, foram selecionados blocos histológicos de parafina de um total de 202 mulheres portadoras de câncer de mama do tipo ductal infiltrante e ductal infiltrante com componente *in situ*, dentro da faixa etária de 35 a 65 anos de idade, compondo o grupo de tecido mamário tumoral (QUADRO 01). O mesmo foi feito para o grupo controle, composto de 104 amostras de tecido mamário não-tumoral, obtidos de mulheres submetidas à mamoplastia.

Os blocos histológicos de parafina foram processados no Laboratório Citolab, no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética e no Laboratório de Imunogenética e Histocompatibilidade (LIGH) da Universidade Federal do Paraná (UFPR).

	CÓD.	IDADE	DIAGNÓSTICO	G	SL	T	HER-2	RE	RP	KI-67	FISH HER-2/neu
1	CA176	36	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	3	30%	
2	CA177	62	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			2	2 A 3	1	25-30%	
3	CA178	40	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	2	1	30%	
4	CA179	56	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	3	1		
5	CA180	54	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1			0	3	2 A 3	4-5%	
6	CA181	36	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	3	0		
7	CA182	48	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	2	1	6%	
8	CA183	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1			0	3	3	10-12%	
9	CA185	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2				2	1 A 2	8-10%	
10	CA186	47	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	1 A 2	12%	
11	CA187	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2 A 3	10-12%	
12	CA188	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	1	40-45%	
13	CA189	49	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	1	0	30-35%	
14	CA190	47	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	2 A 3	2	5%	
15	CA191	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	1	45%	
16	CA192	63	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1			1	3	1 A 2	50-60%	
17	CA193	60	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0		
18	CA194	52	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0	35%	
19	CA195	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	0	0	70%	
20	CA196	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	0	0		
21	CA197	47	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1			0	0	0		
22	CA198	62	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	0	0	30%	
23	CA199	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0	80%	
24	CA200	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	0	0	65%	
25	CA201	49	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	0	0	30%	
26	CA202	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	0	0	40%	
27	CA203	36	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			3	0	0	18-20%	
28	CA204	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	0	0	20%	
29	CA205	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			3	0	0	25%	
30	CA001	47	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3							
31	CA002	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	2	2	10%	
32	CA003	41	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0	90%	
33	CA004	35	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			3	1 A 2	2	20%	
34	CA005	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	P	4	3	1 A 2	2	45%	

35	CA006	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1								
36	CA007	56	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	P	3,5	0	2	0			
37	CA008	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2 / 3								
38	CA009	41	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			1	0	0	70%		
39	CA010	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	P	2,5	1	2	2 A 3	10%		
40	CA011	60	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	A	1,6	1	3	3	12%		
41	CA012	48	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	2,8	1	2 A 3	0			
42	CA013	59	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			1	3	3	15%		
43	CA014	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	1 A 2	10%		
44	CA015	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			1	0	0	70%		
45	CA016	41	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	A	1,8	0	2 A 3	2	40%		
46	CA017	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1			0	3	2	5%		
47	CA018	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3								
48	CA019	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	1	A	1,5	0	3	1 A 2	10%		
49	CA020	57	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	3	40%		
50	CA021	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	3	1 A 2	20-22%		
51	CA022	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3		3,2						
52	CA023	60	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	1,2	1	3	2	80%		
53	CA024	37	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	3	20%		
54	CA025	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	3	3	30%		
55	CA026	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	P	1,5	1	0	0	40%		
56	CA027	61	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2								
57	CA028	54	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	P	0,5	3	3	0	20%		
58	CA029	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	2,2	0	0	0	45%		
59	CA030	47	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	1,9	0	3	2	12%		
60	CA031	35	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	A	1,2	3	1	1	18%		
61	CA032	60	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	P	2,3	1	3	3	20%		
62	CA033	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	2	18%		
63	CA034	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	1 A 2	0	60%		
64	CA035	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	1	0	70%		
65	CA036	48	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	1,5	3	1	0	20%		
66	CA037	60	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	P	1,7	0	3	2	18-20%		
67	CA038	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	2			
68	CA039	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	A	1,2	0	3	3	12%		
69	CA040	56	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	1,5	3	3	1 A 2	20%		
70	CA041	54	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	A	0,4	3	0	0	30%		
71	CA042	61	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			2	3	0	25%	NEGATIVO	

72	CA043	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	2 A 3	0	20%	
73	CA044	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	0	35%	
74	CA045	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0		
75	CA046	38	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	3	1	30%	
76	CA047	48	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	2	2		
77	CA048	61	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			2	3	3	12%	
78	CA049	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
79	CA050	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3			3	1	0	25%	
80	CA051	62	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			2	3	3	30%	NEGATIVO
81	CA052	61	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	3	2 A 3	20%	
82	CA053	62	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			1	3	3		
83	CA054	57	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	2 A 3	2	14%	
84	CA055	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
85	CA056	60	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
86	CA057	63	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
87	CA058	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			2	3	2	25%	NEGATIVO
88	CA059	52	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3							
89	CA060	38	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1 / 2			0	3	2	20%	
90	CA061	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			3	2	1	40%	
91	CA062	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2	20%	
92	CA063	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	3	1	29%	
93	CA064	35	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0	75%	
94	CA065	64	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			1	0	0	40%	
95	CA066	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1 / 2			0	3	3	26%	
96	CA067	59	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	1	0	43%	
97	CA068	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	0	45-50%	
98	CA069	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2							
99	CA070	37	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	3	28%	
100	CA071	64	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
101	CA072	63	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2	18%	
102	CA073	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	3	1	18%	
103	CA074	41	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	2	25%	
104	CA075	61	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	1,5	1	2 A 3	2	50%	
105	CA076	49	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1	P	2	0	3	0		
106	CA077	49	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	1	50%	
107	CA078	43	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2	50%	
108	CA079	52	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1							

109	CA080	39	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2								
110	CA081	61	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1 / 2			1	3	1 A 2	10%		
111	CA082	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0	65%		
112	CA083	35	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	2	30%		
113	CA084	35	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	1	0	70%		
114	CA085	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	A	0,7	0	3	3	25%		
115	CA086	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1 / 2			1	3	3	10%		
116	CA087	54	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	1,2	0	0	0	8%		
117	CA088	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3			1	3	2	10%		
118	CA089	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	P	2,2	2	1	0	25%	NEGATIVO	
119	CA090	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	1,4	1	3	2	12%		
120	CA091	59	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	2,1	3	2	0	19%		
121	CA092	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	0	0	80%		
122	CA093	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	2,5	0	3	2	25%		
123	CA094	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	3	1	10%		
124	CA095	63	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2								
125	CA096	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	1,7	3	3	0	30%		
126	CA097	41	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3			1	3	3	15%		
127	CA098	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			3	3	2	18%		
128	CA099	64	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	0	30%		
129	CA100	38	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	1,7	1	3	3	30%		
130	CA101	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	A	2,2	3	2	2 A 3	40%		
131	CA102	39	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	P	4						
132	CA103	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1 / 2			1	3	3	20%		
133	CA104	61	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	1,8						
134	CA105	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	3	20%		
135	CA106	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	P	4						
136	CA107	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	P	5						
137	CA108	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2 A 3	26%		
138	CA109	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	2,1	0	0	0	25%		
139	CA110	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2	25%		
140	CA111	54	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	P	2,1	0	3	3	22%		
141	CA112	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2	A	4,5	3	0	0	20%		
142	CA113	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	4,5	0	3	2	10%		
143	CA114	52	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3								
144	CA115	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	3,5	0	0	0	90%		
145	CA116	39	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			1	3	1	22%		

146	CA117	39	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	1,2	0	3	1 A 2	30%	
147	CA118	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	A	0,3	3	1	0	20%	
148	CA119	64	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	2,5	0	3	2	16%	
149	CA120	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	3	3	30%	
150	CA121	38	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	3	2	35%	
151	CA122	52	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	1,2	1	0	0	80%	
152	CA123	36	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			0	0	0	60%	
153	CA124	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			1	0	0	22%	
154	CA125	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	2					
155	CA126	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2							
156	CA127	40	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2	10%	
157	CA128	48	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	2,1	0	0	0	80%	
158	CA129	57	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	P	2					
159	CA130	37	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3			0	1	0	80%	
160	CA131	49	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2		0,7	1	3	3	22%	
161	CA132	59	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3							
162	CA133	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2		2,8	0	3	3	27%	
163	CA134	56	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2		0,8	0	0	0		
164	CA135	64	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
165	CA136	49	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	1 / 2			2	3	2	10%	NEGATIVO
166	CA137	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3			3	0	0	35%	
167	CA138	59	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	A	1,1	3	0	0	50%	
168	CA139	43	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	P	3,7					
169	CA140	57	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	3	23%	
170	CA141	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2	A	0,7	0	2	1		
171	CA142	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	0	0	45%	
172	CA143	47	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3			3	1	0	45%	
173	CA144	48	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2		2,1	0	3	3	35%	
174	CA145	59	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	2	14%	
175	CA146	43	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	1	P	4,5					
176	CA147	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	3	3	10%	
177	CA148	56	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			0	2 A 3	2	12%	
178	CA149	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
179	CA150	56	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	A	4	0	0	0	80%	
180	CA151	51	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	2			2	3	2 A 3	10%	NEGATIVO
181	CA152	62	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	P	1,1	2	3	1	45%	NEGATIVO
182	CA153	57	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	0	0	12%	

183	CA154	55	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	2,1	0	3	2	50%	
184	CA155	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	1	0	0	0	80%	
185	CA156	52	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3							
186	CA157	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2				3	3	11%	
187	CA158	44	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3				2 A 3	2 A 3	28%	
188	CA159	65	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2				3	3	16%	
189	CA160	34	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3			3	0	0	45-50%	
190	CA161	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3							
191	CA162	63	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			0	3	3	12%	
192	CA163	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	P	2,5					
193	CA164	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2		2	0	3	3	20%	
194	CA165	49	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2 / 3			0	2 A 3	1 A 2	70%	
195	CA166	42	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE + DUCTAL <i>IN SITU</i>	3	P	1					
196	CA167	36	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2							
197	CA168	46	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2				3	2	24%	
198	CA169	50	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1				3	2 A 3	25%	
199	CA170	45	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3				0	0		
200	CA171	39	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2		2,2		3	3	10%	
201	CA172	58	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)								
202	CA173	38	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	3	A	2,9	0	1	0	65%	
203	CA174	47	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	2			1	3	0	18%	
204	CA175	53	CARCINOMA DUCTAL INFILTRANTE (SOE)	1			0	0	0	80-90%	

QUADRO 1 – CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA, GRUPO DE AMOSTRAS DE TECIDO MAMÁRIO TUMORAL.

FONTE: O autor, 2013.

LEGENDA: **IDADE**, idade da paciente em anos no momento do diagnóstico; **SL**, *status* linfonodal com presença ou ausência de metástases em linfonodos axilares; **P**, presença de metástases; **A**, ausência de metástases; **G**, grau histológico do tumor classificado de 1 a 3; **T**, tamanho do tumor em cm; **HER2**, expressão protéica de HER2 através de imunoistoquímica (IHQ); **RE**, expressão proteica de receptor de estrógeno através de IHQ; **RP**, expressão proteica de receptor de progesterona através de IHQ; **KI-67**, expressão proteica de índice proliferativo de Ki-67 através de IHQ; **FISH HER2**, amplificação ou não do gene *HER2*.

1.2 CORTES HISTOLÓGICOS E CONFECÇÃO DE LÂMINAS HISTOLÓGICAS

Após a seleção dos casos através do banco de dados do Laboratório Citolab, foi realizada microtomia dos blocos histológicos de ambos os grupos de tecido mamário tumoral e não-tumoral, sendo confeccionados seis cortes de

4µm e três cortes de 5µm dispostos em lâminas normais e silanizadas respectivamente, para cada um dos casos.

1.3 ANÁLISE IMUNOISTOQUÍMICA

Através da técnica de imunistoquímica, que utiliza anticorpos monoclonais específicos na detecção de antígenos em tecidos, foi realizada a análise da expressão proteica do HLA-G, receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 e Ki-67 nas amostras de tecido mamário tumoral, cujos receptores ainda não haviam sido corados e analisados. Para o grupo controle foi realizada somente a análise da expressão proteica para o HLA-G. Juntamente a cada bateria de imunistoquímica foram utilizados controles internos para cada um dos quatro anticorpos acima e um controle específico para o anticorpo HLA-G, realizado em tecido de placenta de primeiro trimestre.

O processamento das lâminas de anti-HER2 foi realizado através do uso de kit comercial *HerceptTest*TM (DAKO), seguindo o protocolo do fabricante. As demais lâminas para os outros anticorpos foram desparafinizadas e submetidas a banhos em xilol, álcool 100% e 70% e água destilada. Após a desparafinização, as lâminas sofreram recuperação antigênica com tampão citrato aquecido a aproximadamente 97°C por 20 a 30 minutos e depois lavadas em tampão fosfato salino (PBS). Subsequentemente, foi realizado bloqueio da peroxidase endógena utilizando banhos com solução de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 3%. Em seguida, os anticorpos primários foram diluídos em diluente de anticorpo (DAKO) conforme abaixo (QUADRO 02). Após a colocação dos respectivos anticorpos nas lâminas, estas foram incubadas em câmara úmida a 4°C por cerca de 18 horas.

ANTICORPO	CLONE	DILUIÇÃO	FABRICANTE
RE	Sp1	1:2000 µl	Labvision
RP	PGR636	1:2000 µl	DAKO
Ki-67	MIB-1	1:1000 µl	DAKO
HER2	-	Conforme fabricante <i>HerceptTest™</i>	DAKO
HLA-G	4H84	1:100 µl	BD Pharmingen

QUADRO 2 - CLONES, DILUIÇÕES E FABRICANTE DOS ANTICORPOS UTILIZADOS.
FONTE: O autor, 2013.

Após incubação com anticorpo primário as lâminas foram lavadas em água destilada e colocadas em tampão PBS, seguindo a incubação com anticorpo secundário utilizando o sistema biotina-streptoavidina (*Advance HRP Link e Enzyme – DAKO*) por aproximadamente 1 hora. Após incubação as lâminas foram submetidas a banho com tampão PBS, e subsequentemente coradas com cromógeno diaminobenzidina (DAB) e hematoxilina.

As lâminas correspondentes aos anticorpos HLA-G, RE, RP, Ki-67 e HER2 foram analisadas por dois patologistas através de microscopia comum. As análises basearam-se na porcentagem de células tumorais coradas e na intensidade de imunocoloração nuclear (RE, RP, Ki-67), de membrana (HER2 e HLA-G) e citoplasma (HLA-G).

Resultados para os anticorpos HLA-G, RE, RP foram classificados como negativos, fracamente, moderadamente ou fortemente reatores. Para fins de análise estes resultados foram representados de acordo com: (-) amostras não coradas / não reatoras - 0; (+) amostras com menos de 25% de tecido tumoral corado e/ou fracamente reator - 1; (++) amostras com 25-50% de tecido tumoral corado e/ou moderadamente reator - 2; e (+++) amostras com mais de 50% de tecido tumoral corado e/ou fortemente reator - 3 (CHEN *et al.*, 2010). Foram consideradas positivas amostras com mais de 1% de células tumorais invasivas com expressão para RE, RP e HLA-G (HAMMOND *et al.*, 2010). O Ki-67 foi avaliado através de contagem de núcleos corados, sendo este relatado em porcentagem do número total de células tumorais.

O HER2 foi avaliado de acordo com as regras (2007) estabelecidas pela *American Society of Clinical Oncology (ASCO)* e *College of American Pathologists (CAP)* seguindo as categorias: 0, amostras não coradas; 1+,

amostras fracamente coradas (coloração de membrana incompleta) em qualquer proporção de células tumorais; 2+, amostras moderadamente coradas (coloração completa da membrana, podendo ser não uniforme ou fraca) em pelo menos 10% de células tumorais; e 3+, amostras fortemente coradas (coloração uniforme e intensa da membrana) em mais de 30% de células tumorais (WOLFF *et al.*, 2007). Amostras com resultados de 0 a 1+ foram consideradas negativas e 3+ positivas. Resultados HER2 2+ são usualmente considerados inconclusivos e conseqüentemente são submetidos à técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (Vysis PathVysion HER2 kit), que detecta a presença ou ausência da amplificação do gene *HER2*. De acordo com os *guidelines* da ASCO e CAP, um número de cópias de *HER2/neu* menor que quatro ou proporção mediana de *HER2/cromossomo 17* (*HER2/CEP17*) menor que 1,8, considera-se a amostra negativa para *HER2*. Um número de cópias de *HER2* entre quatro e seis ou proporção *HER2/CEP17* entre 1,8 e 2,2, considera-se a amostra inconclusiva para *HER2*. Amostras são consideradas positivas para *HER2*, quando o número de cópias é maior que seis ou a proporção *HER2/CEP17* maior que 2,2.

1.4 EXTRAÇÃO DE RNA TOTAL

A extração de RNA total dos cortes de 5µm dos blocos histológicos foi realizada através do *High Pure RNA Paraffin Kit* (Roche), específico para extração de RNA de blocos histológicos de parafina.

Previamente à extração propriamente dita, foi realizada a desparafinização de duas lâminas histológicas contendo cortes de 5µm de cada uma das amostras dos tecidos tumorais e não-tumorais. A desparafinização foi realizada através de banhos em xilol e álcool 100%, seguidos de raspagem dos cortes em microtubos 1,5 ml livres de RNase e DNase (Axygen) por bisturis estéreis. Estes foram colocados em banho-seco a 55°C por 10 minutos, seguidos de congelamento em freezer -80°C por 24 horas.

A extração de RNA total dos raspados foi realizada conforme protocolo do fabricante para o *High Pure RNA Paraffin Kit* (Roche), obtendo-se 30 µl de RNA eluído.

O RNA obtido de cada amostra foi quantificado e avaliado quanto à pureza através do espectrofotômetro *NanoDrop*® 2000 (Thermo Fischer Scientific Inc.) e armazenado em freezer -80°C. Soluções de trabalho a 30ng/μl foram preparadas a partir dos RNA extraídos para utilização nas reações de retrotranscrição.

Obtenção de DNA complementar (cDNA)

A síntese de cDNA foi feita através da reação de retrotranscrição de 300ng de RNA de cada amostra como *template* inicial.

Foram realizadas reações de retrotranscrição do tipo *two-step* com utilização de iniciadores (*primers*) randômicos em termociclador convencional (Mastercycler Eppendorf) seguindo o protocolo do kit comercial *Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit* (Roche). Reações de retrotranscrição negativa foram realizadas com a finalidade de avaliar a qualidade do RNA extraído.

Durante o processo de extração, 228 amostras geraram quantidade insuficiente de RNA, sendo somente 78 amostras submetidas à retrotranscrição e posterior PCR em tempo real (RT-qPCR). Destas 78 amostras, 14 eram tecido mamário não tumoral e o restante tecido mamário tumoral (64).

1.5 RT-QPCR

Para a reação de q-PCR utilizou-se o *mix* comercial *FastStart TaqMan Probe Master* (Roche) em instrumento *Mastercycler® ep realplex* (Eppendorf) juntamente a ensaios comerciais customizados para o exon 5 do gene *HLA-G* (FIGURA 12) e *β-actina (ACTB)* (FIGURA 13) *Real Time Ready Assay* (cat. n° 05 583 055 001 - Roche), contendo *primers (forward e reverse)* e sonda fluorescente TaqMan-FAM. Estes ensaios são específicos para os genes *HLA-G (exon 5)* e *β-actina (ACTB)* e assim dispensam a utilização de curva padrão para otimização dos mesmos (QUADRO 3). Assim sendo, foi seguido protocolo do fabricante referente aos ensaios *Real Time Ready Assay* com a padronização das reações (QUADRO 4).

Como as amostras testadas nesta primeira rodada de RT-qPCR não apresentaram amplificação alguma para *HLA-G*, as amostras positivas para IHQ foram então reamplificadas. A reamplificação foi realizada através da

utilização de 2 µl de cDNA já amplificado, diluído em água ultrapura 1:50 µl, seguindo o mesmo protocolo da amplificação anterior.

GENE	SIGLA	ID ENSAIOS	TAMANHO AMPLICON (pb)
<i>HLA-G</i>	<i>HLA-G</i>	135876	107
<i>β-actina</i>	<i>ACTB</i>	143636	127

QUADRO 3 – IDENTIFICAÇÃO DOS ENSAIOS *REAL TIME READY ASSAY* (CAT. N° 05 583 055 001 – ROCHE)

FONTE: O autor, 2013.

REAGENTES	VOLUME NA REAÇÃO (µl)	CONC. FINAL NA REAÇÃO
<i>FastStart TaqMan® Probe Master</i>	5 µl	1 x
<i>RealTime Ready Assay</i>	0,5 µl	<i>Primers 8 pmol cada sonda UPL 4 pmol</i>
<i>cDNA</i>	2 µl	15ng/µl
<i>Água Ultrapura</i>	2,5 µl	
Total	10 µl	

QUADRO 4 – PADRONIZAÇÃO DA REAÇÃO DE RT-qPCR PARA VOLUME FINAL DE 10µl.

FONTE: O autor, 2013.

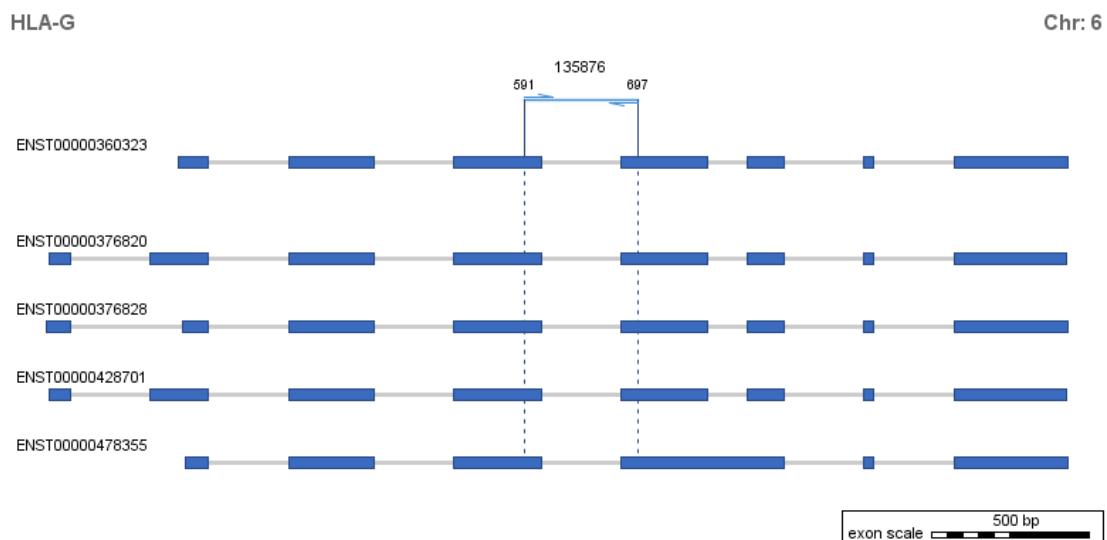


FIGURA 01 – DETALHAMENTO DE ENSAIO CUSTOMIZADO *REAL TIME READY* ASSAY ID N° 135876 (ENST00000360323) PARA *HLA-G*, REPRESENTANDO A ABRANGÊNCIA DO ENSAIO EM CINCO TRANSCRITOS DO GENE *HLA-G*.

FONTE: *Real Time Ready Assay* n°135876, ROCHE.

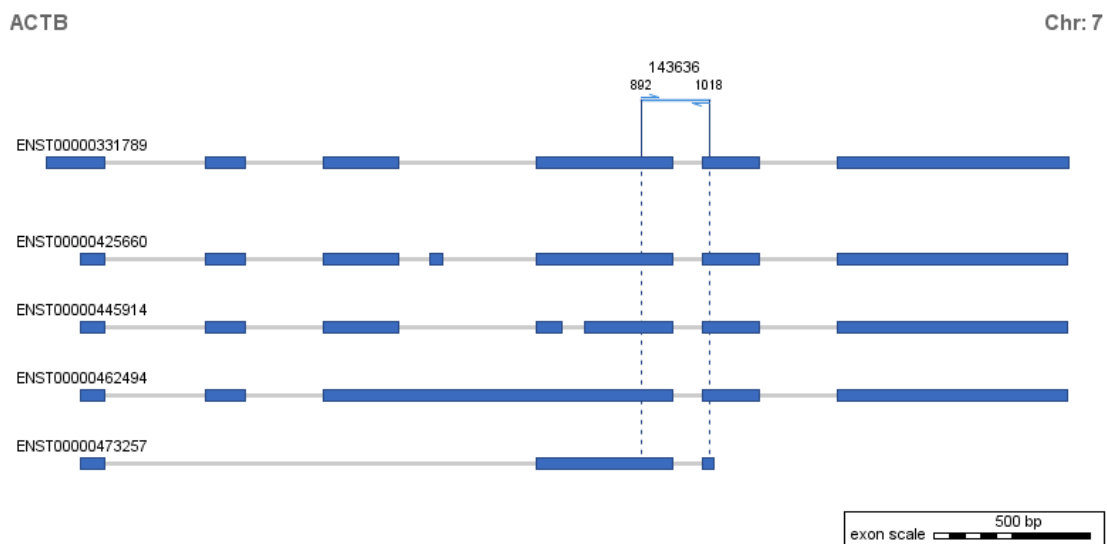


FIGURA 02 – DETALHAMENTO DE ENSAIO CUSTOMIZADO *REAL TIME READY* ASSAY ID N° 143636 (ENST00000331789) PARA *ACTB*, REPRESENTANDO A ABRANGÊNCIA DO ENSAIO EM CINCO TRANSCRITOS DO GENE *ACTB*.

FONTE: *Real Time Ready Assay* n°143636, ROCHE.

Os ensaios de expressão apresentam as reações de amplificação do gene alvo (*HLA-G*), controles negativos, controles endógenos representados pelo gene de referência *ACTB* e controles positivos, todos em triplicata.

Como controle positivo para *HLA-G* foi utilizado material de bloco histológico contendo tecido de placenta de primeiro trimestre, processado igualmente às demais amostras.

A análise comparativa (quantificação relativa) foi realizada em função da expressão do gene de referência, β -actina (*ACTB*). Inicialmente foi planejada a utilização de um gene de referência adicional, β -2-microglobulina (*B2M*), porém este não pôde ser usado devido a problemas metodológicos.

A seleção e validação de genes de referência adequados que apresentam expressão estável para um determinado sistema experimental é o primeiro passo a ser tomado em estudos de expressão gênica, garantindo maior confiabilidade nas diferenças de expressão encontradas. Assim sendo, os genes de referência devem ser selecionados e validados para cada tipo de experimento conduzido e tecido/amostra utilizada.

A escolha do gene de referência deu-se a partir de trabalhos anteriores do grupo do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética quanto à expressão constitutiva destes genes em tecido mamário. Para tal foi realizado um experimento teste com cartão microfluídico *Taq Man Low Density Endogenous Control Panel* (TLDA – *Taq Man Low Density 38 Array*) (Applied Biosystems) contendo ensaios para 16 genes referência com expressão constitutiva, mais comumente utilizados. Para realização destas reações utilizou-se o mix de PCR *TaqMan® Universal PCR Master Mix* (Applied Biosystems), sendo a leitura realizada no aparelho *ABI Prism 7900HT Fast Real time PCR System* (Applied Biosystems). Os resultados foram analisados através do *DataAssist™ v3.0 Software* (Applied Biosystems) que gera um *score* de estabilidade para cada gene candidato baseado nos valores de desvio padrão, sendo os genes mais estáveis aqueles que apresentam os menores *scores*. Dentre os 16 genes mais comumente utilizados, os genes *B2M*, *PPIA*, *IPO8* e *ACTB* apresentaram expressão estável tanto em amostras de tecido mamário não-tumoral quanto tumoral (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

1.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para avaliação da associação entre variáveis foi considerado o teste exato de Fisher ou o teste de Qui-quadrado. A comparação entre dois grupos em relação a variáveis quantitativas foi feita usando-se o teste t de Student para amostras independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney. A condição de normalidade das variáveis foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. Para a avaliação da associação entre as classificações moleculares e a expressão do HLA-G, foi ajustado um modelo de Regressão Logística e usado o teste de Wald para as comparações das classificações. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional SPSS v.20.0.

A análise de expressão gênica foi realizada por quantificação relativa pelo método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de acordo com as fórmulas abaixo (LIVAK e SCHMITTGEN, 2001):

$$\Delta Ct = Ct \text{ gene alvo} - Ct \text{ gene de referência}$$

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct \text{ amostra calibradora}$$

As médias de expressão não puderem ser analisadas devido ao baixo número amostral.

2 RESULTADOS ANÁLISE ESTATÍSTICA

2.1 ESTATÍSTICAS DESCRITIVAS GERAIS DA AMOSTRA

Nas tabelas abaixo são apresentadas estatísticas descritivas das variáveis avaliadas no estudo considerando-se as amostras de tecido mamário tumoral composta de 202 casos.

2.1.1 Variáveis quantitativas

Quanto às variáveis quantitativas foram avaliadas a idade, tamanho do tumor e percentagem do índice de proliferação celular (Ki-67) nas amostras de tecido mamário tumoral.

	<i>n</i>	<i>Média</i>	<i>Mediana</i>	<i>Mínimo</i>	<i>Máximo</i>	<i>Desvio padrão</i>
IDADE	202	50,7	51,0	34,0	65,0	8,4
KI-67	202	29,4%	23,0%	2,0%	90,0%	20,5%
TAMANHO TUMOR	64	2,11	2,00	0,30	5,00	1,12

QUADRO 5 – Variáveis quantitativas avaliadas como idade, marcador Ki-67 e tamanho tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

As amostras de tecido mamário tumoral foram também subdivididas em grupos quanto à idade, índice de proliferação celular (Ki-67) e tamanho tumoral com a finalidade de avaliar a expressão de HLA-G nestes subgrupos, conforme os quadros abaixo.

<i>Idade</i>	<i>Frequência</i>	<i>Percentual</i>
< 40	24	11,9
40 a 50	75	37,1
51 a 60	73	36,1
>60	30	14,9
Total	202	100

QUADRO 6 – Frequência de amostras tecido mamário tumoral dentro dos subgrupos de idade.

FONTE: O autor, 2014.

Ki-67	Frequência	Percentual
< 14%	53	26,3
≥ 14%	149	73,8
Total	202	100,0

QUADRO 7 – Frequência de amostras tecido mamário tumoral quanto ao índice de proliferação celular, Ki-67.

FONTE: O autor, 2014.

Tamanho tumoral (cm)	Frequência	Percentual
< 2	30	46,9
≥ 2	34	53,1
Total	64	100,0

QUADRO 8 – Frequência de amostras tecido mamário tumoral quanto ao tamanho tumoral em cm.

FONTE: O autor, 2014.

2.1.2 Variáveis qualitativas

Quanto às variáveis qualitativas foi avaliada a expressão de HLA-G nas amostras de tecido mamário tumoral e não tumoral, o subtipo molecular das amostras de tecido mamário tumoral, o grau histológico do tumor, *status* linfonodal e a expressão de marcadores imunoistoquímicos como RE, RP e HER2. O percentual de casos com positividade para HLA-G está estimado em 18,81% com intervalo de confiança de 95% dado por: 13,42% - 24,2%.

HLA-G	Frequência	Percentual
Negativo	164	81,2
Positivo	38	18,8
Total	202	100,0

QUADRO 9 – Frequência de amostras positivas e negativas para HLA-G nas amostras de tecido mamário tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

HLA-G	Frequência	Percentual
Negativo	103	99,04
Positivo	1	0,96
Total	104	100,0

QUADRO 10 – Frequência de amostras positivas e negativas para HLA-G nas amostras de tecido mamário não tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR	Frequência	Percentual
LUMINAL B/HER2-	86	42,6
LUMINAL B/HER2+	23	11,4
LUMINAL A	46	22,8
TNBC	37	18,3
HER2+	10	5,0
Total	202	100,0

QUADRO 11 – Frequência de amostras em cada subtipo de tumor de câncer de mama de acordo com a classificação molecular.

FONTE: O autor, 2014.

GRAU HISTOLÓGICO	Frequência	Percentual
1	12	5,9
2	133	65,8
3	57	28,2
Total	202	100,0

QUADRO 12 – Frequência de amostras quanto ao grau histológico tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

METÁSTASE EM LINFONODO	Frequência	Percentual
Presente	27	47,4
Ausente	30	52,6
Total	57	100,0

QUADRO 13 – Frequência de amostras quanto a ausência ou presença de metástases em linfonodo axilar.

FONTE: O autor, 2014.

RE	Frequência	Percentual
Negativo	47	23,3
Positivo	155	76,7
Total	202	100,0

QUADRO 14 – Frequência de amostras positivas e negativas para RE nas amostras de tecido mamário não tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

RP	Frequência	Percentual
Negativo	79	39,1
Positivo	123	60,9
Total	202	100,0

QUADRO 15 – Frequência de amostras positivas e negativas para RP nas amostras de tecido mamário não tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

HER2	Frequência	Percentual
Negativo	169	83,7
Positivo	33	16,3
Total	202	100,0

QUADRO 16 – Frequência de amostras positivas e negativas para HER2 nas amostras de tecido mamário não tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

2.2 AVALIAÇÃO DA ASSOCIAÇÃO ENTRE IDADE, PARÂMETROS CLÍNICO-HISTOPATOLÓGICOS, EXPRESSÃO DE RE, RP E HER2 E EXPRESSÃO DE HLA-G

2.2.1 Variáveis quantitativas

Idade

Testou-se a hipótese nula de que a média de idade é igual para casos HLA-G positivos e casos HLA-G negativos, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. No quadro abaixo são apresentadas estatísticas descritivas de idade de acordo com o HLA-G e o valor de p do teste estatístico.

HLA-G	n	IDADE					Valor de p*
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Negativo	164	50,7	51,0	35,0	65,0	8,1	0,957
Positivo	38	50,8	50,5	34,0	65,0	9,7	

QUADRO 17 – Frequência de amostras positivas e negativas para HLA-G quanto a idade.

FONTE: O autor, 2014.

LEGENDA: *Teste t de *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Além desta análise, também foi avaliada a expressão de HLA-G dentro dos subgrupos de idade.

HLA-G	Idade				Valor de p
	< 40	> 60	40 a 50	51 a 60	
Negativo	17 70,83%	23 76,67%	63 84,00%	61 83,56%	0,433
Positivo	7 29,17%	7 23,33%	12 16,00%	12 16,44%	
Total	24	30	75	73	

QUADRO 18 – Comparação de expressão de HLA-G entre os subgrupos de idade.

FONTE: O autor, 2014.

Ki-67

Testou-se a hipótese nula de que os resultados de Ki-67 são iguais para casos HLA-G positivos e casos HLA-G negativos, versus a hipótese alternativa de resultados diferentes. No quadro abaixo são apresentadas estatísticas descritivas de Ki-67 de acordo com o HLA-G e o valor de p do teste estatístico.

HLA-G	n	Ki-67					Valor de p*
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Negativo	164	0,29	0,21	0,05	0,90	0,21	0,067
Positivo	38	0,32	0,30	0,02	0,80	0,18	

QUADRO 19 – Frequência de amostras positivas e negativas para HLA-G quanto ao índice proliferativo, Ki-67.

FONTE: O autor, 2014.

LEGENDA: *Teste não-paramétrico de Mann-Whitney, $p < 0,05$.

Além desta análise, também foi avaliada a expressão de HLA-G quanto ao índice proliferativo (Ki-67), sendo $\geq 14\%$, considerado alto grau proliferativo ou $< 14\%$, baixo grau proliferativo.

HLA-G	Ki67		Valor de p
	$\geq 14\%$	$< 14\%$	
Negativo	118 78,15%	46 90,20%	0,064
Positivo	33 21,85%	5 9,80%	
Total	151	51	

QUADRO 20 – Comparação entre amostras positivas e negativas para HLA-G quanto ao índice proliferativo, Ki-67.

FONTE: O autor, 2014.

Tamanho tumoral

Testou-se a hipótese nula de que a média de tamanho tumoral é igual para casos HLA-G positivo e casos HLA-G negativo, versus a hipótese alternativa de médias diferentes. No quadro abaixo são apresentadas estatísticas descritivas do tamanho de acordo com o HLA-G e o valor de p do teste estatístico.

HLA-G	n	TAMANHO TUMORAL					Valor de p*
		Média	Mediana	Mínimo	Máximo	Desvio padrão	
Negativo	53	2,17	2,00	0,30	5,00	1,18	
Positivo	11	1,85	2,00	0,40	3,20	0,72	0,246

QUADRO 21 – Frequência de amostras positivas e negativas para HLA-G quanto ao tamanho tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

LEGENDA: *Teste t de *Student* para amostras independentes, $p < 0,05$.

Além desta análise, também foi avaliada a expressão de HLA-G quanto ao tamanho tumoral, sendo ≥ 2 cm ou < 2 cm.

HLA-G	Tamanho tumoral (cm)		Valor de p
	≥ 2	< 2	
Negativo	27	26	
	79,41%	86,67%	
Positivo	7	4	
	20,59%	13,33%	0,520
Total	34	30	

QUADRO 22 – Comparação entre amostras positivas e negativas para HLA-G quanto ao tamanho tumoral em cm.

FONTE: O autor, 2014.

2.2.2 Variáveis qualitativas

Classificação molecular (considerando as cinco classificações)

Para cada uma das variáveis qualitativas do estudo, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de resultado positivo para HLA-G é igual para todas as classificações moleculares da variável, versus a hipótese alternativa de que as probabilidades não são iguais. Nos quadros abaixo são

apresentados os resultados obtidos.

HLA-G	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR				
	Luminal A	Luminal B/HER2+	Luminal B/HER2-	HER2	TNBC
Negativo	42 91,30%	20 86,96%	71 82,56%	7 70,00%	24 64,86%
Positivo	4 8,70%	3 13,04%	15 17,44%	3 30,00%	13 35,14%
Total	46	23	86	10	37

QUADRO 23 – Frequência de amostras positivas e negativas para HLA-G quanto a classificação molecular dos tumores.

FONTE: O autor, 2014.

O resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula (**p=0,032**). Sendo assim, as classificações moleculares foram comparadas duas a duas. No quadro abaixo são apresentados os valores de p dessas comparações.

Classificação molecular			Valor de p
Luminal A	x	Luminal B/HER2+	0,575
Luminal A	x	Luminal B/HER2-	0,181
Luminal A	x	HER2+	0,083
Luminal A	x	TNBC	0,006
Luminal B/HER2+	x	Luminal B/HER2-	0,615
Luminal B/HER2+	x	HER2+	0,258
Luminal B/HER2+	x	TNBC	0,070
Luminal B/HER2-	x	HER2+	0,343
Luminal B/HER2-	x	TNBC	0,035
HER2+	x	TNBC	0,761

QUADRO 24 – Comparação entre os valores de p das classificações moleculares duas a duas quanto a expressão de HLA-G.

FONTE: O autor, 2014.

Classificação molecular (considerando duas classificações)

O resultado do teste estatístico indicou a rejeição da hipótese nula

($p=0,009$) quando comparados os tumores não TNBC com tumores TNBC.

HLA-G	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR		Valor de p
	Não TNBC	TNBC	
Negativo	140 84,85%	24 64,86%	
Positivo	25 15,15%	13 35,14%	0,009
Total	165	37	

QUADRO 25 – Comparação de expressão de HLA-G entre tumores não TNBC e tumores TNBC.

FONTE: O autor, 2014.

HLA-G	GRAU HISTOLÓGICO			Valor de p
	1	2	3	
Negativo	10 83,33%	112 84,21%	42 73,68%	
Positivo	2 16,67%	21 15,79%	15 26,32%	0,231
Total	12	133	57	

QUADRO 26 – Comparação de expressão de HLA-G quanto ao grau histológico tumoral.

FONTE: O autor, 2014.

HLA-G	METÁSTASE EM LINFONODO		Valor de p
	Presente	Ausente	
Negativo	22 81,48%	26 86,67%	
Positivo	5 18,52%	4 13,33%	0,722
Total	27	30	

QUADRO 27 – Comparação de expressão de HLA-G quanto ao status linfonodal.

FONTE: O autor, 2014.

HLA-G	RE		Valor de p
	Negativo	Positivo	
Negativo	31 65,96%	133 85,81%	
Positivo	16 34,04%	22 14,19%	0,005
Total	47	155	

QUADRO 28 – Comparação de expressão de HLA-G quanto a expressão de RE.

FONTE: O autor, 2014.

<i>HLA-G</i>	<i>RP</i>		<i>Valor de p</i>
	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	
Negativo	58 73,42%	106 86,18%	
Positivo	21 26,58%	17 13,82%	0,028
Total	79	123	

QUADRO 29 – Comparação de expressão de HLA-G quanto a expressão de RP.
 FONTE: O autor, 2014.

<i>HLA-G</i>	<i>HER2</i>		<i>Valor de p</i>
	<i>Negativo</i>	<i>Positivo</i>	
Negativo	137 81,07%	27 81,82%	
Positivo	32 18,93%	6 18,18%	1
Total	169	33	

QUADRO 30 – Comparação de expressão de HLA-G quanto a expressão de HER2.
 FONTE: O autor, 2014.

