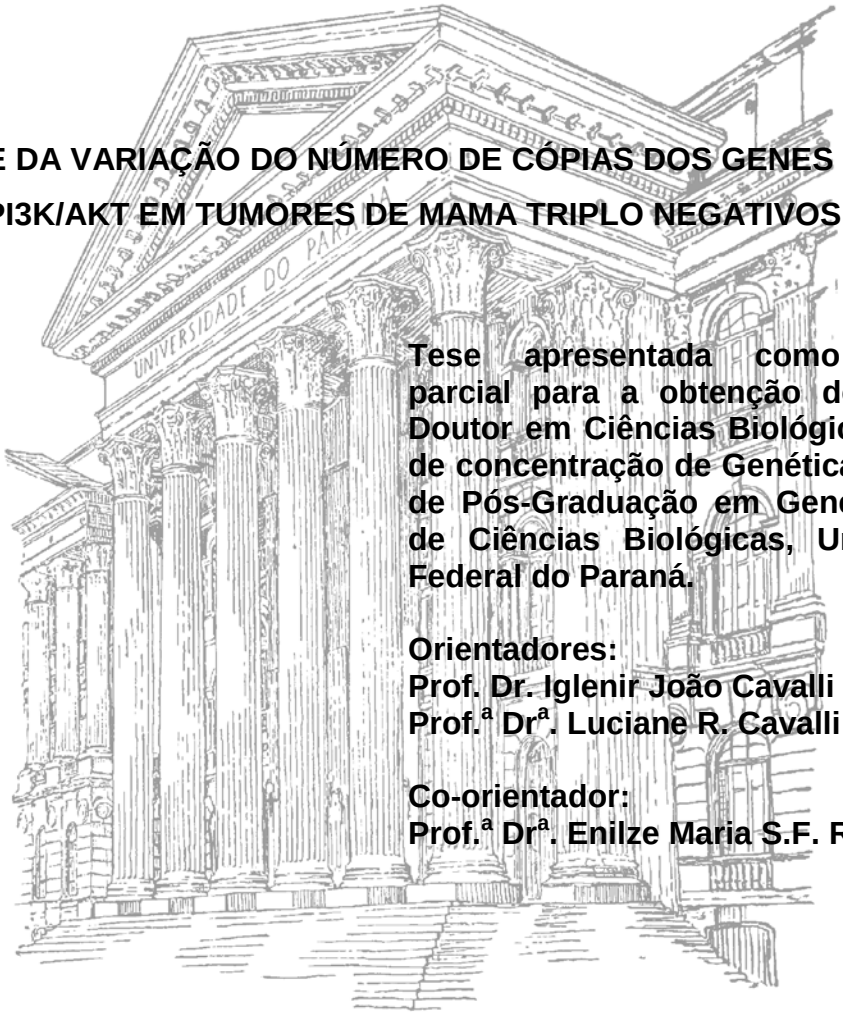


**MÁRCIA MARIA COSTA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DA VIA  
PI3K/AKT EM TUMORES DE MAMA TRIPLO NEGATIVOS**



Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de concentração de Genética, do Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Iglenir João Cavalli**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Luciane R. Cavalli**

**Co-orientador:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Enilze Maria S.F. Ribeiro**

**CURITIBA**

**2012**

**MÁRCIA MARIA COSTA DE OLIVEIRA**

**ANÁLISE DA VARIAÇÃO DO NÚMERO DE CÓPIAS DOS GENES DA VIA  
PI3K/AKT EM TUMORES DE MAMA TRIPLO NEGATIVOS**

**Tese apresentada como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas na área de concentração de Genética, do Curso de Pós-Graduação em Genética, Setor de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná.**

**Orientadores:**

**Prof. Dr. Iglenir João Cavalli**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Luciane R. Cavalli**

**Co-orientador:**

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Enilze Maria S.F. Ribeiro**

**CURITIBA**

**2012**

Dedico esta tese aos meus pais, Aparecida e Osvaldo, e ao meu marido Rafael, que me apoiaram, aconselharam e encorajaram durante toda a realização deste trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Iglénir João Cavalli e Profa. Dra. Enilze Ribeiro pela orientação durante esses oito anos em que estive no Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da UFPR, por toda a confiança e incentivo que recebi. Por todo o trabalho dedicado neste e em outros projetos, aulas, grupos de estudos, discussões. Esses anos de convivência foram muito importantes para minha formação e levo daqui muitos valores, ensinamentos e uma grande amizade.

À Profa. Dra. Luciane Regina Cavalli, por me receber e me dar a enorme oportunidade de trabalhar no seu laboratório e participar de seus projetos. Por toda a orientação e enorme dedicação durante todas as etapas da elaboração desta tese. Durante o tempo em que convivi na Georgetown University aprendi muito com sua experiência, ensinamentos e com seu entusiasmo pela pesquisa. Ganhei uma amiga, a quem tenho grande admiração e carinho.

À prof. Dra Silma Regina Pereira, uma grande professora e pesquisadora que tive a sorte de ter como amiga e colega de laboratório. Toda a sua ajuda foi fundamental na realização desse projeto. Além de ter compartilhado comigo suas experiências e seus conhecimentos, aprendi muito com sua força e determinação, e ganhei muito com sua amizade.

To all people at Georgetown University who cooperated with this study and for all the great moments together, in special:

Dr. Bassem Hadadd, whose expertise and understanding added considerably to this study, for receiving me in his lab and making me feel part of his team.

Dra. Janice for all the help with the chromosomes, sharing her big experience in great scientific discussions, and for all the special moments out of the lab.

Maryam Sharifi, Mandeep Gill and Luisa Matos for their help, friendship and for making the lab a pleasant and enjoyable place to work.

Dr. Catalin Marian and his team for their cooperation to the experiments performed in this study.

À toda equipe dos Hospitais Nossa Senhora das Graças e Hospital de Clínicas de Curitiba, que forneceram as amostras e informações das pacientes desse estudo, em especial ao Dr. Rubens Lima e Dr. Cícero Urban por sua grande contribuição a esse grupo de pesquisa.

A todos os amigos do Laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética, pela amizade, trabalho em equipe e cooperação durante este e outros projetos.

Aos amigos e professores do departamento de Genética da UFPR por tudo que me ensinaram nesses anos de convivência. Em especial aos professores, Elias Karam Jr, Eleidi Freire Maia, Maria da Graça Bicalho, Lígia Vitória Galli, Nina Pagnan, Lupe Furtado, Juarez Gabardo, Remy Lessnau, Erasto Villa Branco e Eni

Piccioni Bompeixe, pela amizade, discussões e troca de idéias que me trouxeram inspiração. Além da amizade guardo felizes lembranças dessa convivência.

As queridas amigas do Laboratório de Citogenética do Hospital de Clínicas de Curitiba: Tamara, Ana, Roseli, Aglaci, Miriam e Duca, que me apresentaram os cromossomos, e me transmitiram seus conhecimentos e experiência na citogenética.

As grandes amigas que se formaram na turma de mestrado de 2006 que foram muito importantes durante todos esses anos de convivência dentro e fora do departamento, que me deram todo o seu apoio e amizade na realização deste e de tantos outros projetos pessoais e profissionais, Patrícia França, Dellyana Boberg, Carolina Sens, Carolina Bernardi, Thaís Sczepanski e Renata Rodrigues Gomes.

Aos verdadeiros amigos, não vou mencionar a todos, mas cada um de vocês me ajudou a terminar este trabalho e a crescer como pessoa além de que sempre estão presentes na minha vida. Em especial à Desiree Soares, Michelle Hudson, Igor Kohiyama e Marcos Nakagawa, que foram muito importantes durante a realização desse projeto.

To all dear friends who made the period I lived in Arlington-VA, a very special moment, Barbara Riley, Pratik Pandey, Sanjay Sarma, Vujos Bulatovic, Alfonso Cortes, Lainie de Oliveira, Gabriela Fiuza and Márcio de Oliveira.

A mi marido, Rafael Vargas que amo con toda mi vida, por todo el amor y compañerismo, por ayudarme a superar los momentos más difíciles con determinación y coraje, y por traer la alegría y dulzura a mis días. También agradezco todo el cariño que he recibido de su familia, en especial a mi suegra Susana que en muchas veces me ha dado consejos de muy gran valor.

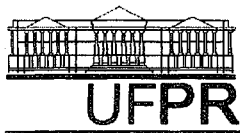
Aos meus pais com todo o amor, Aparecida Costa de Oliveira e Osvaldo de Oliveira, que fizeram um esforço incondicional para que eu pudesse realizar todos os meus sonhos e tivesse a possibilidade de aproveitar todas essas oportunidades, sem todos os seus esforços nada disso seria possível. Agradeço também aos meus irmãos, Marcos e Osvaldo, que junto com meus pais sempre me deram todo o apoio e motivação.

A todas as pacientes que participaram deste estudo, que matêm na ciência a esperança de uma expectativa de vida melhor em um futuro próximo.

E a Deus que me brindou com tantas amizades e oportunidades ao longo desse caminho.

*“Science can only ascertain what is, but not what should be, and outside of its domain value judgments of all kinds remain necessary.”*

Albert Einstein



## **PARECER**

Os abaixo-assinados, membros da Banca Examinadora da defesa de tese de Doutorado, a qual se submeteu **MÁRCIA MARIA COSTA DE OLIVEIRA**, para obtenção do título de Doutora em Genética pela Universidade Federal do Paraná, no Programa de Pós-Graduação em Genética, são de parecer que se confira à candidata o conceito "A".

Secretaria da Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética do Setor de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Paraná.

Curitiba, 27 de julho de 2012

**Professora Doutora Deborah Afonso Cornélio**  
Universidade Federal do Rio Grande do Norte – Membro Titular

**Professora Doutora Cláudia Aparecida Rainho**  
UNESP-Botucatu – Membro Titular

**Professor Doutor Cicero de Andrade Urban**  
Universidade Positivo – Membro Titular

**Professora Doutora Iris Hass**  
Dep. Genética/UFPR – Membro Titular

**Professor Doutor Iglênir João Cavalli**  
Dep. Genética/UFPR – Orientador e Presidente da Banca

Visto

**Professora Doutora Enilze Maria de Souza Fonseca Ribeiro**  
Vice-Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Genética

## SUMÁRIO

|                                                                     |       |
|---------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>PARECER</b> .....                                                | xii   |
| <b>AGRADECIMENTOS</b> .....                                         | xiv   |
| <b>SUMÁRIO</b> .....                                                | xvii  |
| <b>LISTA DE TABELAS</b> .....                                       | xix   |
| <b>LISTA DE ILUSTRAÇÕES</b> .....                                   | xxi   |
| <b>LISTA DE ABREVIATURAS</b> .....                                  | xxii  |
| <b>RESUMO</b> .....                                                 | xxiii |
| <b>ABSTRACT</b> .....                                               | xxiv  |
| <b>1. INTRODUÇÃO</b> .....                                          | 1     |
| <b>2. REVISÃO DA LITERATURA</b> .....                               | 3     |
| 2.1. EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....                           | 3     |
| 2.2. ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER DE MAMA.....                      | 4     |
| 2.3. CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS TUMORES MAMÁRIOS.....  | 6     |
| 2.4. FATORES PROGNÓSTICOS CONVENCIONAIS.....                        | 9     |
| 2.5. CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MAMÁRIOS.....                        | 10    |
| 2.5.1. Classificação “Tradicional”.....                             | 10    |
| 2.5.2. Classificação Molecular.....                                 | 11    |
| 2.5.3. Implicações Prognósticas e Terapêuticas.....                 | 16    |
| 2.6 TUMORES DE MAMA TRIPLO NEGATIVOS.....                           | 17    |
| 2.6.1. Heterogeneidade Molecular dos Tumores TN.....                | 20    |
| 2.7 RECEPTOR EGFR E A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT.....              | 22    |
| 2.8 ESTUDOS DE VARIAÇÃO E ALTERAÇÃO DE NÚMERO DE CÓPIAS NO DNA..... | 26    |
| 2.8.1 Plataformas de aCGH.....                                      | 29    |
| <b>3. JUSTIFICATIVAS</b> .....                                      | 30    |
| <b>4. OBJETIVOS</b> .....                                           | 31    |
| <b>5. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                                  | 32    |
| 5.1. CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....                                 | 32    |
| 5.2. ANÁLISES MOLECULARES.....                                      | 34    |
| 5.2.1. Extração do DNA.....                                         | 34    |
| 5.2.2 Array-CGH (aCGH) .....                                        | 35    |
| 5.2.3 PCR Quantitativa em Tempo Real.....                           | 37    |
| 5.2.4 Hibridização <i>In Situ</i> Fluorescente (FISH) .....         | 39    |
| 5.2.4.1 Preparo das amostras.....                                   | 39    |
| 5.2.4.2 Construção das Sondas.....                                  | 40    |

|                                                                                                                         |            |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------|
| 5.2.4.3 Marcação das Sondas.....                                                                                        | 41         |
| 5.2.4.4 Hibridização.....                                                                                               | 41         |
| 5.2.4.5. Lavagem Pós Hibridização.....                                                                                  | 42         |
| 5.2.4.6 Detecção e Contagem de Sinais de Hibridização.....                                                              | 42         |
| 5.2.4.7 Confirmação da Localização Cromossômica das Sondas de BACs .....                                                | 43         |
| 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....                                                                                           | 43         |
| <b>6. RESULTADOS.....</b>                                                                                               | <b>44</b>  |
| 6.1 ANÁLISE EPIDEMIOLÓGICAS .....                                                                                       | 44         |
| 6.2 ANÁLISES DE ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA.....                                                              | 47         |
| 6.2.1 Tumores Triplo Negativos (TN) – Paciente do Sul do Brasil.....                                                    | 47         |
| 6.2.1.1 Análises pelos métodos de aCGH e PCR em Tempo Real.....                                                         | 47         |
| 6.2.1.2 Análises pelo método de FISH.....                                                                               | 52         |
| 6.2.1.3. Resultados totais de alterações de números de cópias dos tumores TN.....                                       | 56         |
| 6.2.1.4. Associações entre as alterações de cópias de DNA com dados clínicos nos tumores TN.....                        | 57         |
| 6.2.3 Tumores Não-Triplo Negativos (N-TN) – Pacientes da África do Sul.....                                             | 64         |
| 6.2.3.1 Análises pelo método de PCR em Tempo Real.....                                                                  | 64         |
| 6.2.3.4. Associações entre as alterações do número de cópias de DNA com dados clínico-patológicos nos tumores N-TN..... | 67         |
| 6.2.4. Comparações do número de cópias de DNA entre os tumores TN e N-TN.....                                           | 71         |
| 7. DISCUSSÃO.....                                                                                                       | 74         |
| 8. CONCLUSÃO.....                                                                                                       | 84         |
| <b>9. REFERÊNCIAS .....</b>                                                                                             | <b>86</b>  |
| <b>10. ANEXOS.....</b>                                                                                                  | <b>102</b> |
| 10.1. ANEXO I - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....                                                                  | 103        |
| 10.2. ANEXO II - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores TN do Brasil.....                                | 104        |
| 10.3. ANEXO III - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores TN/EGFR- do Brasil.....                         | 105        |
| 10.4. ANEXO IV - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores N-TN da África do Sul.....                       | 106        |
| 10.5. ANEXO V - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores N-TN do Brasil.....                               | 108        |

## LISTA DE TABELAS

|                                                                                                                                                                             |    |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| TABELA 1. CARACTERÍSTICAS DOS GRUPOS MOLECULARES DE CÂNCER DE MAMA.....                                                                                                     | 15 |
| TABELA 2. LOCALIZAÇÃO E MARCAÇÃO DAS SONDAS TAQMAN®, REAGENTES E CICLO DE AMPLIFICAÇÃO UTILIZADOS NOS ENSAIOS DE PCR EM TEMPO REAL.....                                     | 39 |
| TABELA 3. IDENTIFICAÇÃO DOS BACS, LOCALIZAÇÃO E MARCAÇÃO UTILIZADA.....                                                                                                     | 40 |
| TABELA 4. ANÁLISE DE PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE PACIENTES TN E N-TN DO BRASIL E ÁFRICA DO SUL, RESPECTIVAMENTE.....                                                  | 44 |
| TABELA 5. ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE PACIENTES TN E N-TN DO SUL DO BRASIL.....                                                                           | 45 |
| TABELA 6. ANÁLISE DOS PARÂMETROS CLÍNICO-PATOLÓGICOS DE PACIENTES N-TN DO BRASIL E ÁFRICA DO SUL. ....                                                                      | 46 |
| TABELA 7. RESULTADOS DAS ANÁLISES DE 23 TUMORES TN PELOS MÉTODOS DE ACGH E VALIDAÇÃO POR PCR EM TEMPO REAL.....                                                             | 48 |
| TABELA 8. RESULTADOS DAS ANÁLISES DE PCR EM TEMPO REAL DOS CINCO GENES DA VIA PI3K/AKT EM 36 AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS TN.....                                           | 50 |
| TABELA 9. RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS GENES DA VIA PI3K/AKT PELO MÉTODO DE FISH NAS AMOSTRAS DE TUMORES TN ANALISADAS NOS DOIS TMAS.....                                    | 53 |
| TABELA 10. RESULTADOS TOTAIS DE ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS OBTIDOS NAS 54 AMOSTRAS DE TUMORES TN PARA OS CINCO GENES DA VIA PIK3/AKT ANALISADOS NESTE ESTUDO.....       | 56 |
| TABELA 11. MÉDIAS DOS TAMANHOS DE TUMORES TN (CM) E NÚMERO DE PACIENTES DISTRIBUÍDAS DE ACORDO COM AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO CÓPIAS DOS GENES DA VIA PI3K/AKT ANALISADOS..... | 57 |
| TABELA 12. ANÁLISE DA VARIÂNCIA DO TAMANHO DOS TUMORES EM RELAÇÃO AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS NOS CINCO GENES ESTUDADOS.....                                          | 58 |
| TABELA 13. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT1</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                              | 59 |
| TABELA 14. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT2</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                              | 59 |
| TABELA 15. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PIK3CA</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                            | 60 |
| TABELA 16. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PTEN</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                              | 60 |
| TABELA 17. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FGFR2</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                             | 61 |
| TABELA 18. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT1</i> EM RELAÇÃO A PRESENÇA/AUSÊNCIA DE METÁSTASES NOS                  |    |

|                                                                                                                                                                                       |    |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| LINFONODOS AXILARES.....                                                                                                                                                              | 61 |
| TABELA 19. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT2</i> EM RELAÇÃO A PRESENÇA/AUSÊNCIA DE METÁSTASES NOS LINFONODOS AXILARES.....   | 62 |
| TABELA 20. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PIK3CA</i> EM RELAÇÃO A PRESENÇA/AUSÊNCIA DE METÁSTASES NOS LINFONODOS AXILARES..... | 62 |
| TABELA 21. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PTEN</i> EM RELAÇÃO A PRESENÇA/AUSÊNCIA DE METÁSTASES NOS LINFONODOS AXILARES.....   | 63 |
| TABELA 22. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PTEN</i> EM RELAÇÃO A PRESENÇA/AUSÊNCIA DE METÁSTASES NOS LINFONODOS AXILARES. ....  | 63 |
| TABELA 23. RESULTADOS DAS ANÁLISES DOS CINCO GENES DA VIA PI3K/AKT ANALISADOS PELO MÉTODO DE PCR EM TEMPO REAL EM 65 AMOSTRAS DE TUMORES MAMÁRIOS N-TN....                            | 64 |
| TABELA 24. MÉDIAS DOS TAMANHOS DE TUMORES N-TN (CM) E NÚMERO DE PACIENTES DISTRIBUÍDAS DE ACORDO COM AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO CÓPIAS DOS GENES DA VIA PI3K/AKT ANALISADOS. ....        | 67 |
| TABELA 25. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT1</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL. ....                                       | 68 |
| TABELA 26. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT2</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                                        | 69 |
| TABELA 27. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PIK3CA</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                                      | 69 |
| TABELA 28. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PTEN</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                                        | 70 |
| TABELA 29. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FGFR2</i> E GRAU DE DIFERENCIAÇÃO TUMORAL.....                                       | 70 |
| TABELA 30. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT1</i> NOS GRUPOS DE AMOSTRAS TN E N-TN.....                                       | 71 |
| TABELA 31. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>AKT2</i> NOS GRUPOS DE AMOSTRAS TN E N-TN.                                           | 72 |
| TABELA 32. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PIK3CA</i> NOS GRUPOS DE AMOSTRAS TN E N-TN.....                                     | 72 |
| TABELA 33. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>PTEN</i> NOS GRUPOS DE AMOSTRAS TN E N-TN.....                                       | 73 |
| TABELA 34. ANÁLISE PELO TESTE DE QUI-QUADRADO ENTRE AS ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DO GENE <i>FGFR2</i> NOS GRUPOS DE AMOSTRAS TN E N-TN.....                                      | 73 |

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

|                                                                                                                          |    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| FIGURA 1. ESTRUTURA INTERNA DA MAMA.....                                                                                 | 7  |
| FIGURA 2. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA.....                                                                 | 12 |
| FIGURA 3. PROGNÓSTICO PARA CADA SUBTIPO TUMORAL REPRESENTADO POR GRÁFICO DE SOBREVIVÊNCIA.....                           | 16 |
| FIGURA 4. ORIGEM E VIAS RELACIONADAS AOS DIFERENTES TIPOS DE TUMORES TRIPLO NEGATIVOS E BASAIS.....                      | 19 |
| FIGURA 5. VIAS DE SINALIZAÇÃO QUE SE ENCONTRAM FREQUENTEMENTE ALTERADAS EM TUMORES TRIPLO NEGATIVOS.....                 | 21 |
| FIGURA 6. VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT.....                                                                               | 24 |
| FIGURA 7. MECANISMOS DE ATIVAÇÃO DA VIA PI3K/AKT EM TUMORES DE MAMA.....                                                 | 25 |
| FIGURA 8. AÇÃO DO MEDICAMENTO TRASTUZUMAB NA VIA PI3K/AKT.....                                                           | 26 |
| FIGURA 9. FLUXOGRAMA REPRESENTANDO AS ETAPAS DA TÉCNICA DE ARRAY-CGH.....                                                | 37 |
| FIGURA 10. LOCALIZAÇÃO DA Sonda Cromossomos Normais.....                                                                 | 43 |
| FIGURA 11. RESULTADOS DE ACGH E PCR EM TEMPO REAL.....                                                                   | 49 |
| FIGURA 12. GENE <i>AKT1</i> (TN) .....                                                                                   | 50 |
| FIGURA 13. GENE <i>AKT2</i> (TN).....                                                                                    | 51 |
| FIGURA 14. GENE <i>PIK3CA</i> (TN).....                                                                                  | 51 |
| FIGURA 15. GENE <i>PTEN</i> (TN).....                                                                                    | 52 |
| FIGURA 16. GENE <i>FGFR2</i> (TN).....                                                                                   | 52 |
| FIGURA 17. RESULTADOS DA ANÁLISE DE FISH PARA OS GENES <i>AKT2</i> (SINAIS VERDES) E <i>AKT1</i> (SINAIS VERMELHO).....  | 54 |
| FIGURA 18. RESULTADOS DA ANÁLISE DE FISH PARA OS GENES <i>PTEN</i> (SINAIS VERDES) E <i>FGFR2</i> (SINAIS VERMELHO)..... | 55 |
| FIGURA 19. GENE <i>AKT1</i> (N-TN).....                                                                                  | 65 |
| FIGURA 20. GENE <i>AKT2</i> (N-TN).....                                                                                  | 65 |
| FIGURA 21. GENE <i>PIK3CA</i> (N-TN).....                                                                                | 66 |
| FIGURA 22. GENE <i>PTEN</i> (N-TN).....                                                                                  | 66 |
| FIGURA 23. GENE <i>FGFR2</i> (N-TN).....                                                                                 | 67 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

|      |                                                                                                             |
|------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TN   | Triplo Negativo                                                                                             |
| RE   | Receptor de Estrogênio                                                                                      |
| RP   | Receptor de Progesterona                                                                                    |
| HER2 | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor 2</i> ou receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano |
| N-TN | Não Triplo Negativo                                                                                         |
| CK   | Citokeratina                                                                                                |
| CD   | Carcinoma Ductal                                                                                            |
| CL   | Carcinoma Lobular                                                                                           |
| CIS  | Carcinoma <i>In Situ</i>                                                                                    |
| CDIS | Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>                                                                             |
| CLIS | Carcinoma Lobular <i>In Situ</i>                                                                            |
| CDI  | Carcinoma Ductal Invasor                                                                                    |
| CLI  | Carcinoma Lobular Invasor                                                                                   |
| DA   | Dissecção Axilar                                                                                            |
| BLS  | Biópsia do Linfonodo Sentinela                                                                              |
| LS   | Linfonodo Sentinela                                                                                         |
| RS   | <i>Recurrence Score</i> ou Razão de Recorrência                                                             |
| RH   | Receptor Hormonal                                                                                           |
| BL1  | <i>Basal Like 1</i> ou Semelhante ao Basal 1                                                                |
| BL2  | <i>Basal Like 2</i> ou Semelhante ao Basal 2                                                                |
| IM   | <i>Immunomodulatory</i> ou Imunomodulador                                                                   |
| M    | <i>Mesenchymal</i> ou Mesenquimal                                                                           |
| MSL  | <i>Mesenchymal stem like</i> ou Mesenquimal Tronco                                                          |
| LAR  | <i>Luminal Androgen Receptor</i> ou Luminal Receptor de Androgênio                                          |
| PI3K | Fosfatidilinositol 3-Quinase                                                                                |
| CNV  | <i>Copy Number Variation</i> ou Variação do Número de Cópias                                                |
| CNA  | <i>Copy Number Alteration</i> ou Alteração do Número de Cópias                                              |
| aCGH | Array Comparative Genomic Hybridization ou Array de Hibridização Genômica Comparativa                       |
| FISH | <i>Fluorescent In Situ Hybridization</i> ou Hibridização In Situ Fluorescente                               |
| BACs | <i>Bacterial Artificial Chromosomes</i> ou Cromossomos Artificiais Bacterianos                              |

## RESUMO

Tumores de mama triplo negativos (TN) formam um grupo biológico de tumores que possuem baixa ou nenhuma expressão dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e HER2. Esses tumores são associados com um pior prognóstico clínico e altas taxas de mortalidade quando comparados com outros subtipos de câncer de mama. Pacientes com tumores TN não se beneficiam de terapias endócrinas ou imunológicas (como o trastuzumab). A quimioterapia sistêmica é atualmente o tratamento adotado, embora essas pacientes apresentem pior prognóstico após a quimioterapia do que pacientes com outros subtipos de tumor.

A via de sinalização da *fosfatidilinositol 3-quinase* (PI3K/AKT) regula funções celulares importantes tais como crescimento, sobrevivência e proliferação. A desregulação dessa via é frequentemente associada ao desenvolvimento do câncer de mama e resistência à terapia. Assim, drogas que têm como alvo os componentes da via PI3K/AKT estão sendo desenvolvidas e testadas em monoterapia ou em combinação com outros agentes terapêuticos em inúmeros ensaios clínicos. Neste estudo, foram analisadas as alterações de número de cópias de cinco genes desta via, *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2*, *PTEN* e *FGFR2* através das técnicas de aCGH, PCR em tempo real e FISH em tumores de mama triplo negativos (TN) e não-triplo negativos (N-TN).

Um total de 54 amostras de tumores TN foram obtidos dos hospitais Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Brazil e 65 amostras de tumores N-TN do Laboratório Nacional de Ciências da Saúde, cidade do Cabo, África do Sul. Os resultados dos estudos epidemiológicos realizados com os dados clínico-patológicos dessas pacientes (idade, envolvimento de linfonodos, tamanho e grau tumoral) encontraram uma frequência significativamente maior de tumores de grau III e menor de tumores de grau I nas pacientes TN do Brasil quando comparado as pacientes N-TN da África do Sul. Essa associação também foi encontrada quando as informações das pacientes TN foram comparadas com dados de pacientes N-TN provenientes da mesma região do Brasil, eliminando influências étnicas e corroborando estudos prévios que associam o fenótipo triplo negativo com características de prognóstico clínico agressivo. Alterações de número de cópias foram observadas em todos os cinco genes analisados e a perda de *PTEN* foi a alteração mais frequente tanto em tumores TN quanto em tumores N-TN. Além disso a perda desse gene foi associada significativamente com grau tumoral avançado (grau III) nas pacientes do subtipo TN. A análise das alterações de número de cópias dos cinco genes entre tumores TN e N-TN demonstrou que somente o aumento do número de cópias do gene *FGFR2* foi significativamente associado com os tumores TN. Esses achados corroboram estudos prévios que associam a amplificação de *FGFR2* com o fenótipo triplo negativo, sugerindo este gene como importante fator prognóstico e possível alvo terapêutico para esse subtipo tumoral. As frequências de alterações dos genes *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA* e *PTEN* não diferiram entre os tumores TN e N-TN e podem estar envolvidos no desenvolvimentos de ambos os subtipos de tumores.

Em resumo, considerando o importante papel da via de sinalização PI3K/AKT na progressão tumoral e resistência à terapia nos tumores de mama triplo negativos, as informações das alterações de número de cópias dos genes dessa via são relevantes e podem ser utilizadas como marcadores moleculares no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos.

## ABSTRACT

Triple negative breast cancer is defined as a biological group of tumors that lack expression of estrogen (ER) and progesterone receptor (PR), and HER2. These tumors are associated with poor prognosis and a high mortality rate when compared to other breast cancer subtypes. Women with triple negative breast cancer do not benefit from endocrine therapy or trastuzumab. Chemotherapy is currently the systemic medical treatment, although patients with triple negative disease have a worse outcome after chemotherapy than patients with other breast cancer subtypes.

The phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K/AKT) signaling pathway mediates key cellular function such as cell growth, survival and proliferation. Frequent deregulation and aberrations of this pathway have been implicated in breast cancer development and in therapy resistance. Thus, multiple drugs targeting the PI3K/AKT pathway are in development and are being tested in clinical trials as monotherapy and in combination with other therapies in breast cancer patients. In this study, specific genes involved in PI3K/AKT pathway, *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2*, *PTEN* and *FGFR2*, were analyzed for DNA copy number changes in samples of Triple negative (TN) and non triple negative breast tumors (N-TN) by aCGH, real time PCR and FISH analysis.

A total of fifty-four samples of triple negative (TN) breast cancer were obtained from the Hospital Nossa Senhora das Graças and Clinical Hospital, Curitiba, PR, Brazil and sixty-five samples of non triple negative (N-TN) tumors from National Laboratory of Health Sciences, Cape Town, South Africa. Epidemiological studies performed with the clinical pathological data of these patients (age, tumor size, histological grade and lymph node status) showed a significantly higher frequency of grade III tumors and lower frequency of grade I in TN when comparing with N-TN patients. This association was also observed when data of TN Brazilian patients were compared with N-TN patients from the same region of Brazil, corroborating previous studies that associated the triple-negative phenotype with features of poor prognosis.

DNA copy number changes were observed in all the five genes studied and *PTEN* loss was the most frequent alteration in both TN and N-TN breast tumors. Besides, the analyzes between copy number alterations and clinic pathological parameters of patients showed that *PTEN* loss was significantly associated with advanced tumor grade (III) in the TN subtype. When the copy number changes of the five genes were compared between TN and N-TN, the high copy number of *FGFR2* gene was significantly associated with TN tumors. These findings corroborate previous studies that associate *FGFR2* gene amplification with triple-negative phenotype, suggesting this gene as an important prognostic factor and possible therapeutic target for triple negative tumors. The frequencies of *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA* and *PTEN* alterations did not differ significantly between the two subtypes of breast cancer and may play a role in the development of both tumor subtypes.

Considering the crucial role that PI3K/AKT pathway plays in tumor progression and drug resistance among triple negative breast cancer patients, a better understanding of the genomic alteration of these genes provides relevant information to the development of new therapeutic targets and for the interpretation of clinical trials.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a maior causa de morte por câncer na população feminina no mundo. No Brasil, as estimativas para o ano de 2012 são de 52.680 novos casos, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (INCA/MS, 2012).

Os tumores de mama triplo negativos (TN), subgrupo classificado pela imunohistoquímica pela ausência ou baixa expressão de receptores hormonais, de estrogênio (RE) e de progesterona (PR), e receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2), representam cerca de 10 a 17% de todos os tumores de mama. Estes tumores apresentam uma história clínica agressiva, e conferem as pacientes alto risco de recorrência e desenvolvimento de metástases cerebrais (RODRIGUEZ-PANILLA *et al.*, 2006; DENT *et al.*, 2007).

As opções de tratamento para as pacientes portadoras destes tumores são limitadas e tem pouco impacto para o aumento da taxa de sobrevida livre da doença e sobrevida geral (CAREY *et al.*, 2007). Devido ao fato dos tumores TN apresentarem baixa ou nenhuma expressão dos receptores moleculares descritos acima, estas pacientes não respondem de forma satisfatória as terapias alvo específicas direcionadas a estes marcadores, como a terapia endócrina (por exemplo o Tamoxifeno) e/ou a imunoterapia (por exemplo o Trastuzumab). Portanto é de grande relevância a identificação de novos marcadores moleculares para este subtipo tumoral para que novas terapias alvos sejam identificadas e possam ser adotadas com eficiência no tratamento destas pacientes. Para alcançar este objetivo há um grande esforço da comunidade científica e clínica para identificar novos marcadores moleculares e seus respectivos inibidores têm sido testados em ensaios clínicos. Entre os inúmeros agentes terapêuticos avaliados nestes ensaios, estão aqueles direcionados a marcadores moleculares que atuam principalmente nos processo de reparo de DNA e de sinalização celular envolvidos na proliferação e progressão tumoral (por exemplo a via de sinalização PI3K/AKT) (GELMON *et al.*, 2012).

A via PI3K/AKT, estudada no presente trabalho, é uma importante via de sinalização intracelular envolvida em funções como crescimento, proliferação, sobrevivência, angiogênese e motilidade (KRAUSS, 2008). Uma série de estudos têm

demonstrado que a desregulação de muitos dos componentes desta via resultam em importantes consequências no desenvolvimento de tumores mamários e na resistência a agentes quimioterápicos utilizados no tratamento dos mesmos (NAGATA *et al.*, 2004; HU *et al.*, 2009; KIRKEGAARD *et al.*, 2010). No entanto existem poucos estudos na literatura sobre o envolvimento desta via na carcinogênese de tumores exclusivamente do subtipo TN.

Neste estudo temos como objetivo analisar a variação do número de cópias de cinco genes (*PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2*, *PTEN*, *FGFR2*) envolvidos na via de sinalização PI3K/AKT em uma amostra de 54 pacientes portadoras de tumor de mama TN. A frequências destas alterações foram comparadas com as de uma amostra de 65 casos de câncer de mama do subtipo não-tríplo negativo (N-TN), e com parâmetros clínico-patológicos das pacientes. Dados epidemiológicos previamente coletados (OLIVEIRA *et al.*, 2009) de 189 pacientes com tumores de mama N-TN foram também comparados aos das pacientes portadoras de tumores TN, para a identificação de marcadores clínico-patológicos que apresentem valor prognóstico independente para estes tumores. Estas análises, além de contribuírem para um melhor entendimento dos mecanismos genéticos envolvidos na etiologia deste subtipo tumoral, auxilia na potencial aplicação prognóstica e terapêutica destes marcadores para as pacientes portadoras de tumores TN.

Além disto, considerando-se que as taxas de incidência e mortalidade devida a estes tumores variam de acordo com o grupo étnico, sendo a população Latina uma das com maior prevalência (HINES *et al.*, 2011; CHUANG *et al.*, 2012), este trabalho proporcionará informações biológicas em relação aos marcadores da via PIK3/AKT diretamente relacionadas com o perfil biológico/genético desta população. Considerando que a investigação de marcadores prognósticos em subtipos tumorais mamários num grupo étnico/racial específico é pouco explorada, este tipo de análise é essencial para a avaliação dos marcadores estudados em relação ao seu potencial prognóstico e futura aplicação em ensaios clínicos e terapias alvo específicas destas populações.

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer da mama é o tipo de câncer que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países em desenvolvimento quanto em países desenvolvidos (American Cancer Society - ACS, 2010).

Em 2012, estima-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer de mama, com um risco de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Com exceção do carcinoma de pele do tipo não melanoma, esse tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (69/100 mil), Centro-Oeste (48/100 mil), Nordeste (32/100 mil) e Norte (19/100mil) (INCA/MS, 2012).

Na região sul do país, o câncer de mama apresenta uma das mais altas taxas de incidência do Brasil, com uma estimativa de 65 novos casos a cada 100.000 mulheres. No estado do Paraná especificamente, são esperados 3.110 novos casos de câncer de mama, sendo 730 na cidade de Curitiba (cidade de onde as amostras deste estudo foram obtidas) (INCA/MS, 2012).

Entre os fatores de risco para o câncer de mama a idade avançada continua sendo o principal fator. Outros importantes fatores de risco estão relacionados com o histórico hormonal e reprodutivo da mulher (menarca precoce, menopausa tardia, terapia de reposição hormonal, uso de contraceptivos orais, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo, história familiar de câncer de mama e a alta densidade do tecido mamário (INCA/MS, 2012).

Entre os fatores ambientais, a exposição a hidrocarbonetos aromáticos policíclicos presentes em grande quantidade na fumaça do cigarro, a ingestão de dieta gordurosa e o consumo elevado de álcool são considerados há décadas como os principais fatores de risco (PARKIN *et al*, 2000).

## 2.2 ASPECTOS GENÉTICOS DO CÂNCER DE MAMA

De acordo com a teoria monoclonal do câncer, o desenvolvimento do câncer de mama é consequência de um processo de múltiplas etapas, resultado do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem originalmente a partir de uma única célula (NUSSBAUM, 2008). As células tronco são alvos potenciais para o acúmulo dessas alterações. Acredita-se que um grupo de células com características semelhantes a células tronco normais, com capacidade para se diferenciar em células tumorais proliferativas, resistentes à quimio ou radioterapia, e que frequentemente expressam marcadores de superfície semelhantes as células tronco normais seriam as responsáveis pelo crescimento, progressão e recorrência tumoral (CLARKE e FULLER, 2006; POLYAK e HAHN, 2006, NEUZIL *et al.*, 2007).

Duas classes principais de genes estão envolvidos no desenvolvimento do câncer: os proto-oncogenes e os genes supressores de tumor. Enquanto os primeiros promovem a proliferação celular ordenada, a atuação dos genes supressores de tumor mantém essa proliferação sob controle, restringindo o crescimento celular.

Os proto-oncogenes são genes conservados evolutivamente e seus produtos são, em geral, reguladores da cascata de eventos que mantém a progressão ordenada do ciclo celular, divisão, crescimento e diferenciação celular. Essa cascata de eventos ativa uma cadeia intracelular de sinais bioquímicos que resulta na ativação e repressão alternada de diversos genes (LOURO *et al.*, 2002). Quando mutado, um proto-oncogene se transforma em um oncogene, ocorrendo a perda do seu controle normal na regulação do crescimento, o que contribui para a proliferação aumentada de certos produtos protéicos e desregulação da divisão celular.

Numerosos oncogenes são associados a diversos tipos de neoplasias, como *HRAS*, *MYC*, *SRC*, *EGFR*, *ERBB2*, *BCL2*, *ABL1* e *MDM2* (KOPNIN, 2000). No câncer de mama em específico, os componentes oncogênicos do sistema de sinalização celular da cascata *ERBB2* (*do inglês*: v-erb-b erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2) também conhecido como *HER2* (*do inglês*: Human Epidermal Growth Factor Receptor-Type 2) estão frequentemente envolvidos.

A família gênica *ERBB* é composta por quatro tipos de genes que codificam os receptores de fator de crescimento epidermal: *EGFR (HER1)*, *ERBB2 (HER2)*, *ERBB3 (HER3)* e *ERBB4 (HER4)*. Cada um destes receptores é composto por um domínio extracelular, em que o ligante se associa a um segmento transmembrana  $\alpha$ -hélice e um domínio intracelular tirosina quinase. A dimerização dos receptores é um requisito essencial para que ocorra a sinalização normal destes receptores. Esta associação pode ocorrer entre dois receptores *ERBB* diferentes (heterodímeros) ou entre duas moléculas do mesmo receptor (homodímeros) (BASELGA & SWAIN, 2009).

A amplificação ou expressão aumentada do gene *HER2* é um dos mecanismos que pode causar o aumento da transdução de sinal, através de processos de fosforilação e desfosforilação de proteínas transmembranas intermediárias e intracelulares, que dirigem a proliferação e sobrevivência da célula (ROSS *et al.*, 2009). O heterodímero formado entre os receptores HER2/HER3 é considerado o mais ativo para a sinalização em tumores com amplificações de *HER2*. Em outra situação, *HER2* pode apresentar mutações pontuais ou pequenas deleções que originam receptores constitutivamente ativos, disponível para dimerização sem que haja associação a um ligante específico (BASELGA & SWAIN, 2009).

Ao contrário dos proto-oncogenes, os genes supressores de tumor atuam regulando negativamente a proliferação celular ou positivamente a morte celular programada (apoptose), codificando proteínas que atuam na manutenção da integridade do genoma e protegendo as células de um crescimento desordenado. Essa classe de genes pode ser dividida em dois grupos de acordo com a função celular: *Gatekeepers* e *Caretakers*. *Gatekeepers* ou genes protetores (exemplos: *RB1*, *APC*, *TP53*) regulam diretamente o ciclo celular, enquanto *Caretakers* ou genes de manutenção (exemplos: *MLH1*, *MSH2*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*) atuam reparando danos no DNA, mantendo a integridade genômica (OLDENBURG *et al.*, 2007).

Alterações nos genes supressores de tumor determinam a perda de função e são consideradas recessivas no nível celular, uma vez que a função destes genes somente é perdida quando ambos os alelos são inativados (BIÈCHE *et al.*, 1993). De acordo com a hipótese de KNUDSON (1971) dois eventos mutacionais são necessários para a inativação de um gene supressor de tumor. No caso dos cânceres hereditários a

primeira mutação é transmitida pela linhagem germinativa e a segunda é somática. No caso dos cânceres esporádicos as duas mutações ocorrem no tecido somático como eventos independentes.

Existem numerosos genes supressores de tumor identificados com a capacidade de, quando mutados, predispor ao câncer. Dentre eles estão o *RB1*, *APC*, *TP53*, *ATM*, *PTEN*, *VHL*, *WT1*, *MLH1*, *MSH2*, *NF1*, *NF2*, *PMS1*, *PMS2* e *MSH6*, além dos genes *BRCA1* e *BRCA2* considerados como os principais na predisposição ao câncer de mama e/ou ovário hereditário (KOPNIN, 2000; BUNZ, 2008).

Além das alterações no nível genético, alterações epigenéticas também podem alterar a expressão de genes críticos levando ao desenvolvimento do câncer (RODENHISER e MANN, 2006). Estas alterações compreendem mudanças na estrutura da cromatina que influenciam a expressão gênica e podem ocorrer por dois mecanismos principais: metilação do DNA e acetilação de histonas. Alterações no padrão de metilação de ilhas CpG que ocorrem em regiões promotoras de genes supressores de tumor e de outros genes associados ao câncer podem contribuir para o silenciamento transcricional e, de modo geral, estar envolvidas na progressão de neoplasias (READ & DONNAI, 2007).

## 2.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS TUMORES MAMÁRIOS

Estruturalmente a mama é formada pelo parênquima e pelo estroma mamário. O estroma é constituído por tecido conjuntivo, colágeno e tecido adiposo, e tem a função de sustentação da mama. O parênquima é constituído pela porção secretora (ácinos ou alvéolos), e é formado por 15 a 20 lobos mamários, cada um dos quais é constituído por um número variável de pequenos lóbulos. Estes consistem numa rede de ductos e de pequenos alvéolos, que são revestidos internamente por células luminais glandulares, e externamente por uma camada de células mioepiteliais basais (BIRNBAUM *et al.*, 2004).

As células luminais são responsáveis pela síntese e passagem do leite, enquanto que as células mioepiteliais formam os elementos contrácteis que permitem a ejeção do leite. Em menor número, também estão presentes células tronco epiteliais

mamárias, capazes de originar células luminais e mioepiteliais e formar novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (STINGL & CALDAS, 2007) (Figura 1). Essas células tronco estão situadas predominantemente nos ductos (VILLADSEN *et al.*, 2007) e são responsáveis pela formação de novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (DONTU *et al.*, 2003; ALLRED *et al.*, 2004).

Acredita-se que essas células tronco bipotentes são possivelmente o sítio de origem das neoplasias, podendo seguir duas vias de evolução: a luminal-glandular que dá origem aos tumores de subtipo luminal, e a mioepitelial que dá origem aos tumores de subtipo basal (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

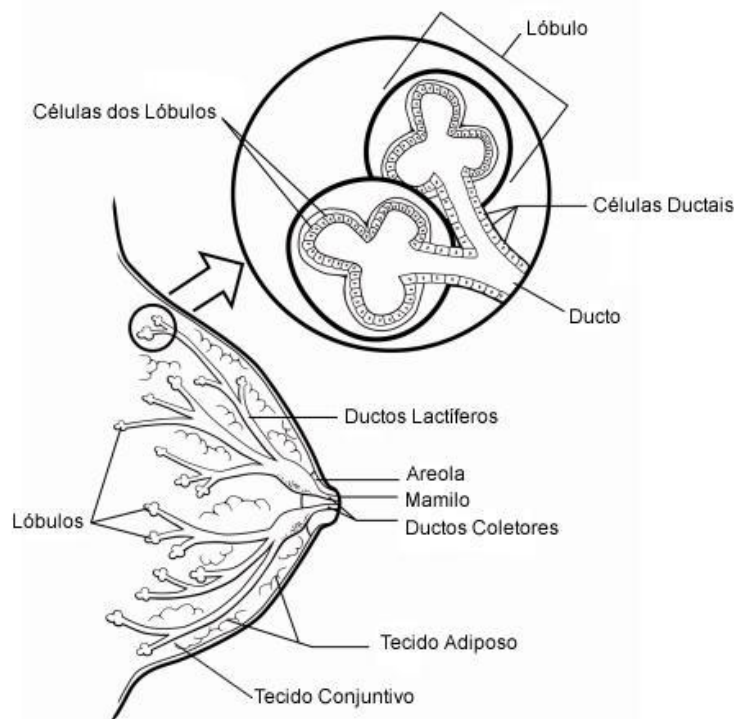


**Figura 1. Estrutura interna da Mama.** Estão identificados lóbulos, ductos, aréola, mamilo, tecido adiposo e tecido conjuntivo. Ampliado: lóbulos e ductos, e suas respectivas células constituintes. Fonte: modificado de ACS, 2010, disponível em: [http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/ OverviewGuide/breast-cancer-overview](http://www.cancer.org/Cancer/BreastCancer/OverviewGuide/breast-cancer-overview).

As células luminais e mioepiteliais podem ser distinguidas de acordo com o perfil de citoqueratinas (CKs) que expressam. Essas proteínas são constituintes do citoesqueleto das células epiteliais e sua distribuição é específica para cada subtipo de epitélio permitindo que sejam utilizadas como marcadores de sua diferenciação.

Assim, os diferentes tipos celulares juntamente com a porção estromal formam o microambiente mamário. Este é controlado por um complexo sistema de fatores como hormônios, que agem através de seus receptores. As respostas aos estímulos hormonais produzem as vias de sinalização que são responsáveis pela regulação e estimulação celular do tecido mamário (COURTILLOT *et al.*, 2005). Um desequilíbrio nesse microambiente pode resultar em anomalias no desenvolvimento da glândula, doenças inflamatórias, alterações fibrocísticas ou neoplasias malignas (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007).

Na maior parte dos casos de neoplasias mamárias a proliferação celular desordenada se inicia em células de revestimento dos ductos e lóbulos mamários, sendo os carcinomas correspondentes denominados de ductais (CD) e lobulares (CL), respectivamente. Outras doenças da mama ocorrem em outros tipos celulares menos comuns e causam os carcinomas do tipo mucinosos, inflamatórios, medulares, tubulares, papilares e filóides (GUIMARÃES, 2008).

As primeiras lesões aparentes no tumor constituem as hiperplasias, onde as células epiteliais apresentam alterações morfológicas (no entanto, sem atipia citológica) e podem apresentar alterações genéticas. Com a progressão da doença para a forma de carcinoma *in situ* (CIS), a atipia citológica torna-se proeminente, com aumento significativo no índice mitótico e nas alterações genéticas. Os carcinomas *in situ* são caracterizados por apresentarem proliferação de células que permanecem restritas aos ductos ou lóbulos mamários. Dentro deste grupo, os carcinomas ductais *in situ* (CDIS) podem ser subclassificados seguindo padrões histomorfológicos do tecido, com os tipos mais freqüentes designados comedo, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido (BATEMAN, 2007).

O CDIS apresenta uma incidência de cerca de 23% nos tumores de mama identificados, enquanto os carcinomas lobulares *in situ* (CLIS) ocorrem em aproximadamente 3% das pacientes. A evolução destas neoplasias pode ser muito

variável e nem todos os CIS evoluem para o perfil invasor. O risco de invasividade, no entanto, é maior em mulheres que apresentam um CIS primário (EHEMAN *et al.*, 2009).

O diagnóstico de um carcinoma invasivo, ao contrário do *in situ*, é determinado pela capacidade de invadir a membrana basal e metastatizar para sítios distantes (BATEMAN, 2007). Os carcinomas ductais invasivos (CDI) são os mais freqüentes e compreendem 65 a 80% dos casos de câncer de mama. Estes podem variar em tamanho, aparência e consistência, dependendo da composição da lesão. O carcinoma lobular invasor (CLI) abrange cerca de 10% de todos os carcinomas de mama diagnosticados. Algumas neoplasias mistas, ductal/lobular, também são observadas na população com taxas variadas de incidência (EHEMAN *et al.*, 2009).

## 2.4 FATORES PROGNÓSTICOS CONVENCIONAIS

Os fatores prognósticos para o câncer de mama são principalmente os: anatômicos (tamanho do tumor, comprometimento de linfonodos e subtipos histológicos); características patológicas quantitativas (grau histológico, necrose tumoral e índice mitótico); responsividade endócrina (receptores hormonais de estrogênio e progesterona); fatores moleculares específicos reguladores do crescimento tumoral (oncogenes e genes supressores tumorais); e os fatores preditivos de metástases específicos para os diferentes órgãos (revisado em OLIVEIRA *et al.*, 2009).

Dentre estes a presença de metástases nos linfonodos axilares é um dos fatores prognósticos mais importante para pacientes com câncer de mama em estágios iniciais (VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007). De acordo com o relatório publicado pelo grupo colaborativo “*Early Breast Cancer trialists*” (SAUTTER-BIHL *et al.*, 2012) 50% das pacientes com envolvimento de linfonodos no momento do diagnóstico desenvolverão metástases à distância num período de até 5 anos. No entanto, mais de 30% das pacientes linfonodo negativas e 15 a 25% das que apresentam pequeno tamanho tumoral e linfonodos negativos no diagnóstico apresentam chance de desenvolvimento metastático (HEIMAN & HELLMAN, 2000; HEIMANN, MCBRIDE & HELLMAN, 2000).

A idade da paciente, tamanho e grau do tumor estão entre os parâmetros clínico-patológicos que mais se relacionam com o desenvolvimento metastático (BOLLET *et al.*, 2007). Tradicionalmente a identificação de metástases era realizada através da completa dissecação axilar (DA), uma técnica que apresentava grande morbidade e diminuição da qualidade de vida das pacientes. No final dos anos 90, a introdução da biópsia do linfonodo sentinela (BLS) trouxe um grande avanço para a cirurgia de estadiamento axilar do câncer de mama (MABRY & GIULIANO, 2007).

O linfonodo sentinela (LS) é considerado o primeiro linfonodo acometido pelas células metastáticas e quando isto ocorre há indicação para a dissecação axilar completa (QUAN & MCCREADY, 2009). Se o exame histológico desse linfonodo não revela células tumorais assume-se que o tumor está limitado ao seu sítio primário na mama. Este procedimento técnico diminui consideravelmente a morbidade das pacientes e elimina os sintomas causados pela técnica tradicional, como linfodema, inchaço, dor e diminuição da mobilidade do braço (CANAVESE *et al.*, 2009)

Um grande número de pacientes tem sido submetidos a biópsia do LS nos últimos anos como parte de ensaios clínicos para determinar a sua viabilidade, precisão e segurança (FANT *et al.*, 2003; STEEGERS *et al.*, 2008). Os resultados desses ensaios demonstram que essa técnica é altamente precisa podendo detectar células tumorais com sensibilidade de 95% e especificidade em torno de 100% (STEEGERS *et al.*, 2008).

## 2.5 CLASSIFICAÇÃO DOS TUMORES MAMÁRIOS

### 2.5.1 Classificação “Tradicional”

Tradicionalmente, a classificação dos tumores mamários é realizada através do sistema TNM, onde T se refere à extensão do tumor primário, N à ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais, e M à ausência ou presença de metástase à distância. Este sistema baseia-se, de forma geral, na extensão anatômica da doença, que é determinada clínica e histologicamente (quando possível), e segue padrões estabelecidos pela União Internacional de Combate ao Câncer (UICC, 2010).

O grau de diferenciação histológico do tumor também é utilizado na classificação tumoral, e representa a correlação das estruturas morfológicas dos tumores com seu grau de malignidade. Avalia principalmente três características morfológicas: formação tubular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica. Estes critérios de graduação são aplicados a todos os tipos de tumores invasivos, exceto o carcinoma medular. O grau histológico reflete o potencial de malignidade do tumor indicando a sua maior ou menor capacidade de metastatização. Considera-se:

- grau I (baixo) – bem diferenciado e com melhor prognóstico
- grau II (intermediário) – moderadamente diferenciado
- grau III (alto) – pouco diferenciado e com pior prognóstico

Outros fatores clínico-histopatológicos, como idade da paciente, tamanho do tumor, análise de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e HER2 também são considerados.

A combinação desses fatores tem sido utilizada na prática clínica para classificar as pacientes dentro das categorias de risco atualmente aceitas, entre elas estão as diretrizes da National Comprehensive Cancer Network (NCCN) (LANDERCASPER, DIETRICH e JOHNSON, 2006), as recomendações do consenso de St. Gallen (GOLDHIRSCH *et al.*, 2007) e o prognóstico Nottingham (LUNDIN *et al.*, 2007). No entanto, a heterogeneidade dos tumores de mama combinado à baixa sensibilidade de alguns dos fatores preditivos convencionais, limitam a capacidade de distinguir diferenças fenotípicas que podem apresentar importantes implicações terapêuticas.

### 2.5.2 Classificação Molecular

Os inúmeros estudos de análises de expressão gênica realizados nos últimos anos, através das técnicas de microarranjos, têm fornecido novas perspectivas na clínica e na pesquisa do câncer de mama. Estas metodologias têm revelado, principalmente ao nível molecular, a notável complexidade e heterogeneidade genética

entre os tumores mamários, como claramente demonstrado pela alta variação de padrões da expressão gênica tumoral (revisado em REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011).

Estes estudos demonstram que os padrões de expressão gênica podem redefinir a classificação tradicional dos tumores de mama em diferentes subtipos, o que representa uma melhora significativa nos métodos tradicionais de classificação dos tumores. A partir deles foram traçadas assinaturas de genes com significado prognóstico que permitem o redirecionamento e customização de terapias (REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011).

O estudo pioneiro realizado por PEROU e colaboradores (2000) estabeleceu a base para a atual classificação molecular. Neste estudo os tumores mamários foram classificados em quatro subtipos moleculares de acordo com o perfil de expressão gênica que apresentavam: luminal, semelhante ao normal, HER2 e basal. Subsequentemente estudos realizados pelo mesmo grupo demonstraram a divisão do subtipo luminal em pelo menos outros dois subgrupos (Luminal A e B) (PEROU *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2001; REIS-FILHO *et al*, 2006, MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008) (Figura 2).

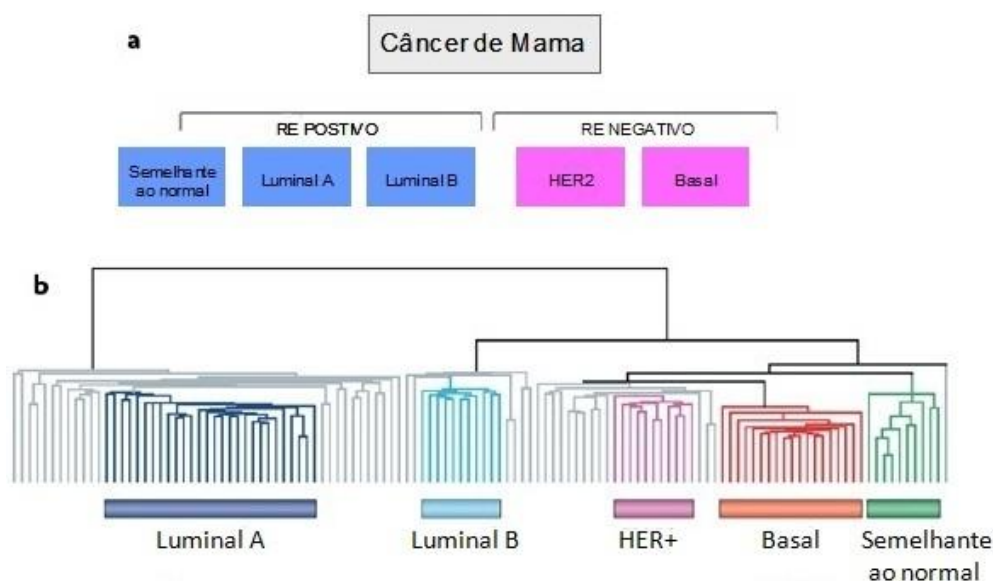


**Figura 2. Classificação Molecular do Câncer de Mama.** **a)** Classificação dos tumores de acordo com o status do receptor de estrogênio (RE) **b)** Dendrograma que mostra a classificação em cluster dos tumores mamários em 5 subtipos tumorais. Ramos em cinza indicam tumores que não se correlacionam com nenhum dos subgrupos. Fonte: modificado de REIS-FILHO *et al*, 2006.

As principais características destes cinco subtipos moleculares são:

*Tumores RE positivos:*

**Tumores luminais.** Possuem perfil semelhante ao das células luminais do epitélio mamário normal. Expressam citoqueratinas (CKs) de baixo peso molecular incluindo CK7, CK8, CK18 e CK19 e moléculas de adesão celular epitelial (RAKHA, REIS-FILHO e ELLIS, 2008). Este subgrupo foi estratificado em luminal A e B por apresentarem expressão gênica distinta e diferentes comportamentos clínicos. Os tumores luminais A apresentam alta expressão de RE e genes relacionados ao RE, enquanto os tumores luminais B apresentam alta expressão de genes relacionados ao ciclo celular e proliferação e expressam a proteína HER2 (SORLIE *et al*, 2001, MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

**Tumores “semelhante ao normal”.** O perfil de expressão gênica é similar ao do parênquima mamário normal e fibroadenomas. Estes tumores podem sobreexpressar genes de células basais e subexpressar genes luminais epiteliais. Os carcinomas lobulares invasores podem apresentar este perfil (MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

*Tumores RE negativos:*

**Tumores HER2 positivos.** São caracterizados pela alta expressão de genes relacionados à amplificação do *HER2* (MARCHIÒ & REISFILHO, 2008).

**Tumores de fenótipo basal.** São caracterizados pela presença de células mioepiteliais que expressam CK5/6, CK14, CK17, vimentina, EGFR (receptor do fator de crescimento epidermal; *do inglês*: epidermal growth factor receptor) e possuem alta taxa proliferativa, medida principalmente pela expressão da proteína Ki67, um marcador de proliferação celular. Este subgrupo normalmente apresenta perda das citoqueratinas observadas no subgrupo luminal e frequentemente apresentam perda de RP e HER2 (RAKHA e ELLIS, 2009).

Os tumores basais possuem o maior grau de heterogeneidade molecular dentre os demais subgrupos, apresentando também pior prognóstico clínico: frequentemente apresentam alto grau histológico e associações com mutações nos genes *BRCA1* e *TP53* (ROUZIER *et al*, 2005, SEAL & CHIA, 2010).

Dois novos subtipos tumorais têm sido recentemente incluídos na classificação molecular: claudina baixa (do inglês: claudin low), e apócrino molecular (do inglês: molecular apocrine).

**Tumores claudina baixa.** As claudinas são proteínas de junção intercelular. Estes tumores caracterizam-se pela baixa expressão das claudinas 3, 4 e 7 e e-caderina, uma glico-proteína de adesão celular dependente de cálcio. Além disso, recentes estudos demonstram que este subtipo tumoral apresenta perda de características comuns das células epiteliais e apresenta muitas características das chamadas células tronco iniciadores de tumor. Comparado aos demais subgrupos, os tumores claudina baixa apresentam baixa expressão de HER2 e marcadores luminais (RE, RP, GATA3, CK18 e CK19), e cerca de 61 a 71% apresentam fenótipo triplo negativo.

Apesar da aparente similaridade com os tumores basais, esse subtipo não expressa altos níveis de genes de proliferação e são tumores de ciclo proliferativo mais lento (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007; PRAT *et al.*, 2010).

**Tumores apócrino molecular.** São tumores RE negativos, receptor de androgênio (RA) positivo e que compartilham algumas características com o grupo HER2. Possuem alta frequência de amplificação do gene *HER2* e características apócrinas em exame histológico, porém apresentam-se como um grupo que possui sua própria assinatura gênica, daí o nome: apócrino molecular. (MACGROGAN *et al.*, 2005).

A tabela 1 resume as principais características dos sete grupos de câncer de mama acima apresentados.

**Tabela 1.** Características dos grupos moleculares de câncer de mama.

|                             | <b>Marcadores Imunohistoquímicos</b>                                                          | <b>Grau Histológico</b>       | <b>Índice Proliferativo</b> | <b>Outros marcadores</b>                                                            | <b>Prognóstico</b> |
|-----------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|-------------------------------|-----------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------|--------------------|
| <b>Luminal A</b>            | RE+: 91–100%<br>RP+: 70–74%<br>HER2+: 8–11%<br>Ki67: baixa expressão<br>Marcadores basais: -  | GI/II: 70–87%<br>GIII: 13–30% | Baixo                       | <i>FOXA1</i>                                                                        | Bom                |
| <b>Luminal B</b>            | RE+: 91–100%<br>RP+: 41–53%<br>HER2+: 15–24%<br>Ki67: alta expressão<br>Marcadores basais: -  | GI/II: 38–59%<br>GIII: 41–62% | Alto                        | Amplificação de <i>FGFR1</i> e <i>ZIC3</i>                                          | Pobre              |
| <b>Basal</b>                | RE+: 0–19%<br>RP+: 6–13%<br>HER2+: 9–13%<br>Ki67: alta expressão<br>Marcadores basais: +      | GI/II: 7–12%<br>GIII: 88–93%  | Alto                        | RB1: baixa/–<br>CDKN2A: alta<br>BRCA1: baixa/–<br>Amplificação do gene <i>FGFR2</i> | Pobre              |
| <b>HER2</b>                 | RE+: 29–59%<br>RP+: 25–30%<br>HER2+: 66–71%<br>Ki67: alta expressão<br>Basal markers: –/+     | GI/II: 11–45%<br>GIII: 55–89% | Alto                        | GRB7: alta                                                                          | Pobre              |
| <b>Semelhante ao Normal</b> | RE+: 44–100%<br>RP+: 22–63%<br>HER2+: 0–13%<br>Ki67: baixa/média<br>Marcadores basais: –/+    | GI/II: 37–80%<br>GIII: 20–63% | Baixo/ Médio                |                                                                                     | Intermediário      |
| <b>Claudina Baixa</b>       | RE+: 12–33%<br>RP+: 22–23%<br>HER2+: 6–22%<br>Ki67: expressão média<br>Marcadores Basais: +/- | GI/II: 62–23%<br>GIII: 38–77% | Médio/alto                  | CDH1: baixa/–<br>Claudinas: baixa/–                                                 | Intermediário      |
| <b>Apócrino molecular</b>   | RE–<br>RP–<br>HER2 +/-<br>Ki67: alta expressão<br>Marcadores basais: –/+                      | Predomina GII/GIII            | Alto                        | Receptor de androgênio: +                                                           | Pobre              |

Legenda. Os termos baixa, média e alta referem-se a expressão das proteínas.

Fonte: Modificado de REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011.

### 2.5.3 Implicações Prognósticas e Terapêuticas

Como resultado dos estudos moleculares acima descritos, uma série de perfis de expressão gênica ou alterações moleculares específicas foram identificados e diretamente relacionados a determinação de um prognóstico e resposta ao tratamento diferencial (Figura 3) (REIS-FILHO & PUSZTAI, 2011).

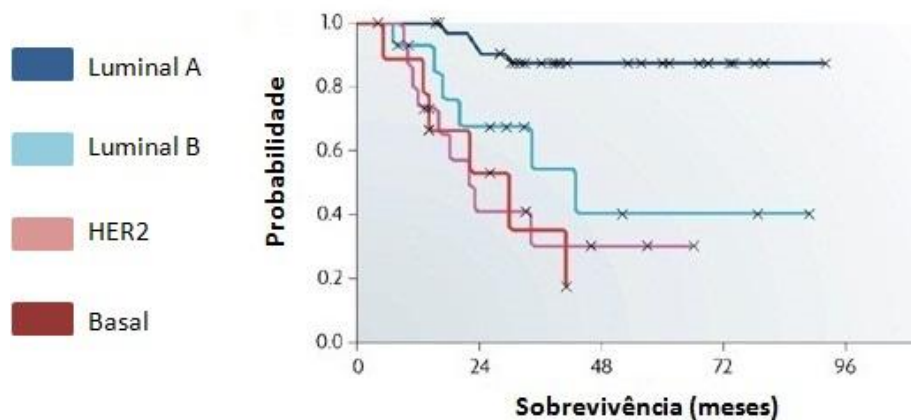


**Figura 3. Prognóstico para cada subtipo tumoral representado por gráfico de sobrevivência.** Os subtipos HER2 e basal conferem um pior prognóstico, enquanto que o subtipo luminal A confere um prognóstico mais favorável. Fonte: modificado de VARGO-GOGOLA e ROSEN, 2007.

O trabalho de Vant'veer *et al* (2002) propôs uma análise de assinatura gênica capaz de identificar grupos de pacientes com bom prognóstico e baixo risco de desenvolvimento de metástase em cinco anos após o diagnóstico. Baseado na assinatura de 70 genes com perfis de expressão diferencial, estes autores separaram as pacientes em 2 grupos de acordo com o prognóstico: bom e desfavorável. Entre os genes que se apresentaram positivamente regulados no grupo de pacientes com prognóstico desfavorável encontram-se genes envolvidos com o ciclo celular, angiogênese, invasão, metástase e transdução de sinal, como *CYCLIN E2*, *MCM6*, *MMP9*, *MP1*, *RAB6B*, *PK428*, *ESM1* e *VEGF*. Estudos subsequentes confirmaram a reprodutibilidade deste painel de 70 genes como preditor de prognóstico independente

dos marcadores tradicionais clínico-patológicos (Krag & Weaver, 2002; Backus *et al.*, 2005).

Esta análise de validação levou ao desenvolvimento do teste comercial *MammaPrint* desenvolvido pela companhia Agendia (Amsterdam, the Netherlands) (GLAS *et al.*, 2006). Este teste foi aprovado pela agência de regulamentação sanitária dos EUA, o FDA (*do inglês*: Food and Drug Administration) para uso em pacientes com menos de 61 anos de idade, linfonodo negativas e que apresentam tamanho tumoral menor que 5cm.

Outro painel prognóstico disponível comercialmente é o *OncotypeDx* (Genomic Health Inc, Ca). Este ensaio foi baseado nos resultados de 250 genes diferencialmente expressos (PAIK *et al.*, 2004) e testado inicialmente em pacientes do Projeto Nacional de Cirurgias Adjuvantes de Mama e Cólon (NSABP B-20) (NSABP, 2006). Depois de análises estatísticas e validações clínicas, 21 genes (16 relacionados ao câncer e 5 genes de referência) foram selecionados e seu perfil de expressão foram traduzidos em um valor denominado razão de recorrência - RS (*do inglês*: Recurrence Score). Este valor é usado para classificar as pacientes em três grupos, de acordo com o risco de desenvolvimento de metástases: risco baixo (RS <18), intermediário (RS ≥18 and <31), e alto (RS ≥31) (PAIK *et al.*, 2004). O estudo de validação foi realizado em pacientes linfonodo negativas, RE positivas, e que foram tratadas com tamoxifen (HABEL *et al.*, 2006). Estudos subsequentes têm demonstrado a utilidade clínica deste ensaio como parâmetro prognóstico independente em pacientes RE positivas e linfonodo positivas que receberam quimioterapia adjuvante e pacientes pós menopausa com tumores RE positivo tratadas com inibidores de aromatase (DOWSETT *et al.*, 2010).

## 2.6 TUMORES DE MAMA TRIPLO NEGATIVOS

O termo triplo negativo (TN) define um grupo biológico de tumores caracterizados pela ausência ou baixa expressão dos receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e HER2. Representam cerca de 10-17% de todos os cânceres de mama e são mais comumente observados em mulheres jovens (< 50 anos), de

ascendência africana e hispânica e em portadoras de mutações no gene *BRCA1* (BAUER *et al.*, 2007; MORRIS *et al.*, 2007).

Tumores triplo negativos são caracterizados por uma história clínica agressiva e conferem um prognóstico desfavorável as pacientes, as quais apresentam risco maior de recorrência e óbito em comparação com mulheres com outros tipos de câncer de mama (DENT *et al.*, 2007; REIS-FILHO *et al.*, 2008). Pacientes com fenótipo TN apresentam elevada taxa de desenvolvimento de metástases visceral e cerebral (TSUDA *et al.*, 2000; RODRIGUEZ-PANILLA *et al.*, 2006). A recorrência desses tumores ocorre principalmente no período de 1 a 4 anos após o diagnóstico, diminuindo rapidamente após esse período, não sendo observada após 8 anos de seguimento (DENT *et al.*, 2007).

Tumores triplo negativos assim como os basais são freqüentes em mulheres portadoras de mutação no gene *BRCA1* (LAKHANI *et al.*, 2002; FOULKES *et al.*, 2003), compartilhando algumas características patológicas e moleculares associadas à perda deste gene como: alto grau histológico, ausência de receptores para RE e HER2, alta expressão das proteínas EGFR e CK5/6, elevada taxa de mutações no gene *TP53*, amplificações no oncogene *C-MYC* (em 53% dos casos) e alta freqüência de alterações citogenéticas (CROOK *et al.*, 1997; 1998; GRUSHKO *et al.*, 2004; TURNER *et al.*, 2006; 2007).

Considerava-se que os tumores TN e basais seriam sinônimos (KREIKE *et al.*, 2007). No entanto, o diagnóstico triplo negativo depende dos resultados de expressão de apenas 3 genes obtidos principalmente através de técnicas de imunohistoquímica, enquanto que a definição rigorosa de tumor basal depende dos resultados de expressão de cerca de 500 genes através de análises de RNAm.

Esta classificação dos tumores basais é inviável para a prática clínica, assim têm sido proposto que o seu diagnóstico seja baseado nos resultados das análises de cinco marcadores: além dos resultados de RE, RP e HER2 inclui-se a análise de EGFR e das citoqueratinas 5/6. Segundo NIELSEN *et al.* (2004) a determinação da positividade dos marcadores EGFR e CK5/6 juntamente com o fenótipo TN determinaria a identificação dos tumores basais com 100% de especificidade e 76% de sensibilidade.

Assim, o que se observa é que apesar de uma parcela significativa dos tumores TN serem do subtipo basal, até 44% deles podem ser completamente negativos para todos os marcadores basais apresentando comportamento biológico distinto. Similarmente, até 45% dos tumores classificados como basais são não-triplo negativos (RUIJTER *et al.*, 2011).

Evidências indicam que os tumores triplo negativos e basais se desenvolvem principalmente através de vias relacionadas ao gene *BRCA1*. Mutações somáticas que contribuem para o desenvolvimento dos tumores basais não-TN e TN-não basais possivelmente não estão relacionados à esta via, mas podem se originar aleatoriamente devido ao aumento de instabilidade genômica característica desses tumores. Segundo esta hipótese, apenas os tumores TN-basais podem ser considerados um grupo homogêneo (Figura 4) (RUIJTER *et al.*, 2011).

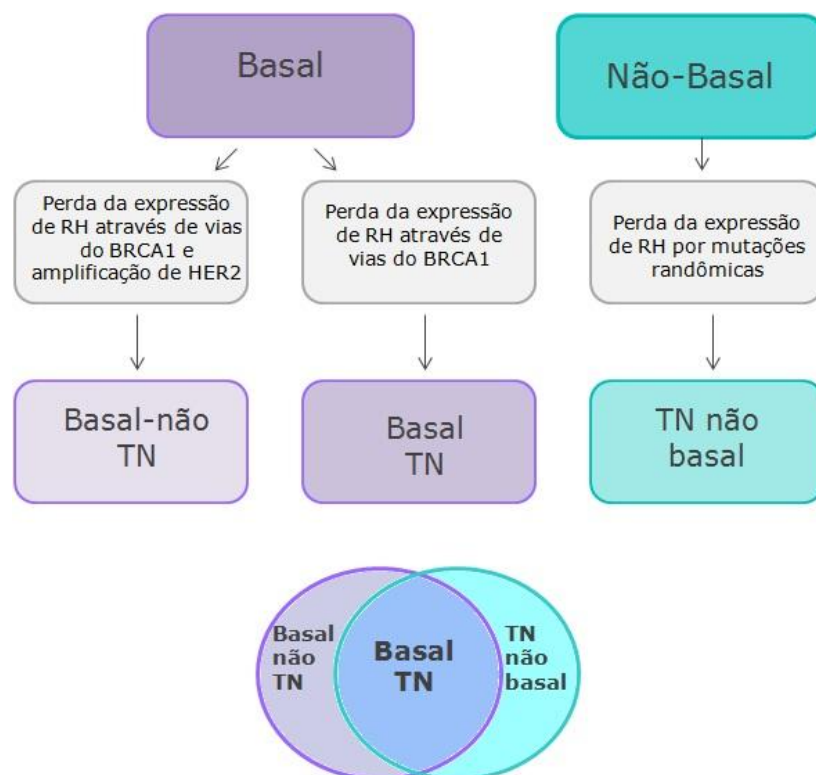


**Figura 4. Origem e vias relacionadas aos diferentes tipos de tumores triplo negativos e basais.** Legenda: RH: receptor hormonal, TN: triplo negativo. Fonte: modificado de RUIJTER *et al.*, 2011.

### 2.6.1 Heterogeneidade Molecular dos Tumores TN

LEHMANN *et al.* (2011) analisando a expressão gênica de 21 bancos de dados de câncer de mama reforçaram a hipótese de que os tumores TN são um grupo heterogêneo formado por vários subtipos moleculares. Análises de agrupamentos gênicos revelaram que os triplo negativos são compostos por seis subtipos estáveis que possuem diferentes padrões de expressão gênica. São eles:

**BL1.** Semelhante ao basal 1 (*do inglês*: Basal Like 1): expressam genes envolvidos no ciclo celular, replicação do DNA e resposta a danos. A natureza proliferativa deste subtipo é evidenciada pela alta expressão de MK167 e Ki-67, sugerindo que as pacientes se beneficiariam de agentes, como os anti-mitóticos, que têm como alvo preferencial tumores altamente proliferativos.

**BL2.** Semelhante ao basal 2 (*do inglês*: Basal Like 2): também expressa genes de proliferação celular e resposta a danos no DNA mas, exclusivamente, apresenta a expressão dos receptores de fatores de crescimento como EGFR e EPHA2 (receptor de célula epitelial tirosina quinase).

**IM.** Imunomodulador (*do inglês*: Immunomodulatory): expressa genes relacionados aos processos imunes como as vias TH1/TH2, via de sinalização das células natural Killer (NK), das células dendríticas, e dos receptores de células B (BCR) e T (TCR), entre outras.

**M.** Mesenquimal (*do inglês*: Mesenchymal): apresenta a expressão de genes de vias de sinalização envolvidas na motilidade celular e diferenciação celular, como as vias Wnt e TGF-Beta.

**MSL.** Mesenquimal tronco (*do inglês*: Mesenchymal stem-like): apresenta expressão de genes com funções biológicas semelhantes ao subtipo M, incluindo motilidade, diferenciação e crescimento celular. Entretanto, exclusivo a este subgrupo, é a expressão de genes componentes e relacionados à via de sinalização do fator de crescimento que inclui: metabolismo do inositol fosfato, EGFR, PDGF entre outros. Outra diferença é que o subgrupo MSL, ao contrário do subgrupo M, expressa baixos níveis de genes de proliferação.

**LAR.** Luminal receptor de androgênio (do inglês: Luminal androgen receptor): este subtipo tumoral é o que apresenta maior diferença entre os demais subgrupos. Caracteriza-se por ser RE negativo, porém seu perfil de expressão gênica está muito relacionada a vias reguladas por hormônios, incluindo síntese de esteróides e metabolismo de androgênio e estrogênio.

Os subtipos BL1, BL2 e M apresentam altos níveis de expressão de citoqueratinas basais, enquanto o subtipo LAR possui alta expressão de citoqueratinas e outros marcadores luminais. LEHMANN *et al.* (2011) também demonstraram que a sobrevida livre da doença e o surgimento de metástases a distância diferem entre esses subtipos de tumores TN ressaltando a importância desta subclassificação.

Em resumo, a desregulação de importantes vias de sinalização celular possivelmente está envolvida na etiologia dos tumores triplo negativos (Figura 5). O entendimento desses mecanismos bem como dos efeitos biológicos da heterogeneidade molecular que abrange estes tumores é de fundamental importância para o desenvolvimento de novas terapias efetivas.



**Figura 5. Vias de sinalização que se encontram frequentemente alteradas em tumores triplo negativos.** Fonte: modificado de IRSHAD, ELLIS e TUTT, 2011.

## 2.7 RECEPTOR EGFR E A VIA DE SINALIZAÇÃO PI3K/AKT

O receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) também conhecido como ERBB-1/HER1 é um receptor de superfície celular membro da família dos receptores ERBB que inclui HER2 (ERBB-2), HER3 (ERBB3) e HER4 (ERBB4). EGFR é ativado por ligantes específicos, entre eles o fator de crescimento epidermal, anfiregulina e fator  $\alpha$  transformante de crescimento (TGF $\alpha$ ) e atua direta ou indiretamente na transdução de sinais que regulam a expressão de genes envolvidos em sobrevivência, proliferação, migração e diferenciação celular (NYATI *et al.*, 2006).

A desregulação de EGFR e suas vias de sinalização apresenta função central na etiologia e progressão de tumores sólidos, entre eles o câncer de mama (ARTEAGA *et al.*, 2002; MILANEZI *et al.* 2008), tendo sido caracterizado nos últimos anos como um importante alvo terapêutico.

Estudos têm mostrado que os efeitos do EGFR são mediados principalmente através da via de sinalização PI3K/AKT. Uma vez ativado por seus ligantes específicos, EGFR desencadeia a cascata de sinalização que ativa a enzima PI3K, importante componente desta via (NYATI *et al.*, 2006; ZHOU *et al.*, 2006).

A enzima fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) (*do inglês*: phosphatidylinositol 3-kinase) pertence à família das quinases lipídicas e é formada por uma subunidade catalítica (p110) e uma subunidade regulatória (p85). Através de sinais extracelulares PI3K é transferida para a membrana onde fosforila PIP2, que é convertido em PIP3. Este, funciona como segundo mensageiro intracelular e regula a localização e ativação de outras proteínas intracelulares, entre elas AKT (KRAUSS, 2008).

O gene *PIK3CA* codifica a subunidade de 110-kDa da enzima PI3K. Mutações que causam o expressão aumentada do gene e o aumento de número de cópias são frequentemente descritos em vários tipos de câncer (LARRAMENDY *et al.*, 2000; SAMUELS *et al.*, 2004).

A família AKT é composta por três proteínas: AKT1, AKT2 e AKT3, as quais são codificadas por três genes diferentes (DATTA *et al.*, 1999), que são expressos constitutivamente nas células em níveis que variam de acordo com o tecido. A ativação de AKT ocorre na membrana através da sua fosforilação pela proteínas PDK1

e PDK2, e depende da disponibilidade intracelular de PI3K. Após sua ativação, AKT passa a ter localização citoplasmática e nuclear (BORGATTI *et al.*, 2000) e seus substratos regulam vários processos celulares incluindo apoptose, proliferação, diferenciação, metabolismo e angiogênese (STOKOE, 2001; VIVANCO *et al.*, 2002). AKT regula positivamente fatores anti-apoptóticos e negativamente fatores pró-apoptóticos e possui amplo espectro de ação ao promover ou impedir a ação de diversas proteínas relacionadas ao ciclo celular, entre elas, P21, P27, ciclina D1, MDM2 e P53 (ZHOU *et al.*, 2001).

Foi observado que as vias de sinalização das proteínas AKT encontram-se frequentemente ativadas em muitas neoplasias humanas. Essa ativação pode ocorrer tanto pela amplificação do gene ou como resultado de mutações em componentes que sinalizam a sua ativação (NICHOLSON & ANDERSON, 2002).

Outro componente importante da via PI3K/AKT é a proteína PTEN (Homólogo da fosfatase e tensina, *do inglês*: phosphatase and tensin homolog), uma fosfatase lipídica que possui como principal substrato o PIP3. Essa enzima possui efeito reverso a PI3K, uma vez que sua função é a desfosforilação e consequente inativação de PIP3 no mesmo sítio que este é fosforilado pela PI3K (O'REILLY *et al.*, 2006). Dessa forma, o gene *PTEN* atua como supressor tumoral impedindo a proliferação celular através da inibição da via PI3K/AKT (Figura 6).

O gene *PTEN* é também conhecido como *MMAC1* (*do inglês*: Mutated in Multiple Advanced Cancers) e está mapeado em 10q23. Além de atuar como antagonista na via PI3K/AKT, estudos sugerem que o gene *PTEN* atue na regulação de células tronco (PEREZ-TENORIO e STAL, 2002).

A perda da atividade de *PTEN* devido a deleções ou silenciamento por metilação do seu promotor é encontrada com alta frequência em cânceres humanos (BLANCO-APARICIO *et al.*, 2007). Nos tumores mamários a perda ou diminuição da sua expressão estão também associados à resistência a agentes terapêuticos convencionais e recidiva após o tratamento (SHOMAN *et al.*, 2004).

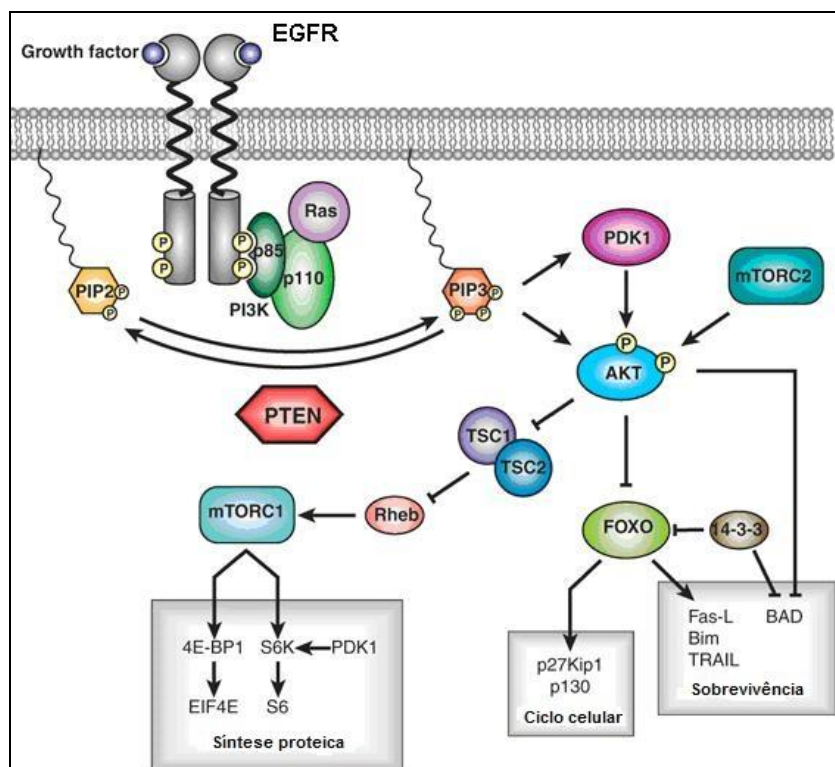


**Figura 6. Via de Sinalização PI3K/AKT.** Fonte: Modificado de NYATI *et al.*, 2006.

Outros componentes da via PI3K/AKT incluem os fatores de crescimento a fibroblastos (FGFs, *do inglês*: fibroblast growth factors) e seus receptores (FGFRs, *do inglês*: fibroblast growth factors receptors). Estes, possuem importante função na regulação da proliferação celular, sobrevivência, migração e diferenciação durante o desenvolvimento e vida adulta. No câncer, a ativação de FGFRs é causada por diversos mecanismos como amplificação gênica, translocação cromossômica e mutações de ponto. A família FGF consiste de 18 moléculas que se ligam com alta afinidade a quatro receptores homólogos: FGFR1-FGFR4. Após a ativação mediante esta ligação, várias vias de sinalização celular são ativadas, entre as mais importantes estão as vias Ras/MAPK e PI3K/AKT (WESCHE, HAGLUND & HAUGSTEN, 2011).

Em análises por aCGH (hibridização genômica comparativa por microarranjo, *do inglês*: array-Comparative Genomic Hybridization) e de expressão gênica em 55 amostras de tumores de mama triplo negativos, TURNER *et al* (2010) apresentaram um painel de 40 genes com expressão significativamente aumentada por amplificação gênica. Dentre eles encontra-se o gene *FGFR2*, mapeado em 10q26.3. Os autores

demonstraram que o tratamento com inibidores de FGFR em linhagens celulares com amplificação de *FGFR2* induz apoptose por inibição da via PI3K/AKT demonstrando a importância deste gene como potencial alvo terapêutico (TURNER *et al.*, 2010).

De acordo com o acima apresentado, pode-se concluir que a ativação da via PI3K/AKT ocorre por vários mecanismos, incluindo mutações nos genes analisados neste estudo (Figura 7).

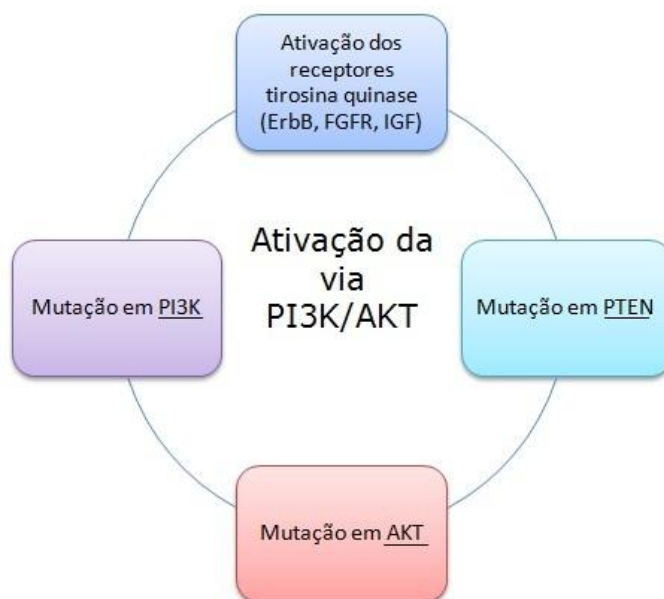


**Figura 7. Mecanismos de ativação da Via PI3K/AKT em tumores de mama.** Fonte: A autora.

Além disso, as alterações genômicas também apresentam relevância terapêutica. Ainda que muitos membros da via PI3K estejam frequentemente alterados em câncer de mama, a investigação dos genes que fazem parte desta via pode auxiliar no desenvolvimento de terapias alvo efetivas. De fato, estudos vêm demonstrando que a inativação da via PI3K/AKT é de extrema importância para que a resistência à quimioterapia e a radioterapia seja superada.

Como exemplo pode-se citar a droga *trastuzumab* (Herceptin®; F. Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland). Este anticorpo monoclonal liga-se à porção extracelular do receptor HER2 mediando uma citotoxicidade anticorpo-dependente em células que superexpressam o gene *HER2*. Outro efeito do medicamento é a ativação da proteína PTEN e a consequente inativação da via sinalizada por PI3K (NAGATA *et al.*, 2004). A

ligação ao receptor HER2 suprime a ação da molécula SRC sobre PTEN que permanece desfosforilado e impede que PI3K dê início à via sinalizadora que culminará na ativação de AKT (Figura 8).

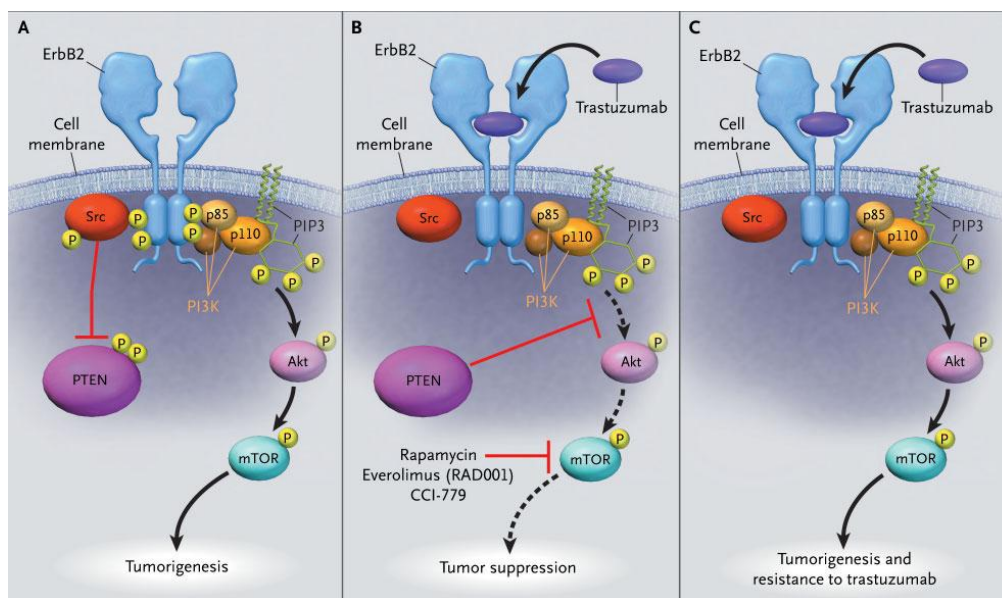


**Figura 8. Ação do medicamento Trastuzumab na Via PI3K/AKT. A]** Tumorigênese. A superexpressão do receptor HER2 desencadeia a sua ativação através da fosforilação; como resultado SRC kinase e PI3K são mantidos no seu estado ativo, PTEN é inativado desencadeando a cascata de sinalização proto-oncogênica que inclui AKT e Mtor. **B]** Supressão Tumoral na presença de Trastuzumab. O medicamento impede a ativação de HER2 e SRC, PTEN permanece no seu estado ativo inativando a via. **C]** Ausência da proteína PTEN. Tumorigênese e resistência ao tratamento com Trastuzumab. Fonte: PANDOLFI, 2004.

## 2.8 ESTUDOS DE VARIAÇÃO E ALTERAÇÃO DE NÚMERO DE CÓPIAS NO DNA

A variação do número de cópias (CNV, *do inglês*: copy number variation) é definida quando um determinado segmento no genoma humano apresenta ganhos ou perdas do material genético. Neste caso, as alterações que representam mais de duas cópias são consideradas ganhos e aquelas que representam menos de duas cópias determinam as perdas. As CNVs possuem aproximadamente 1Kb de comprimento e são alterações polimórficas normalmente presentes na população em geral (COOPER *et al.*, 2008).

Em 2004 dois trabalhos independentes demonstraram que genomas de

indivíduos saudáveis apresentavam centenas de regiões genômicas que variavam significativamente em número de cópias. Essas variações estruturais são geralmente herdadas e representam cerca de 12% do genoma (SEBAT *et al.*, 2004; IAFRAT *et al.*, 2004). Exemplos de CNVs comuns incluem aquelas contendo famílias de genes que codificam esteróides sexuais, metabolismo de drogas e receptores olfatórios. Outras CNVs são raras na população em geral ou étnico-específicas (IAFRATE *et al.*, 2004; TUZUN *et al.*, 2005).

Alterações no número de cópias de DNA são frequentemente observadas no genoma de tumores como consequência de mutações somáticas que ocorrem durante o desenvolvimento neoplásico. Essas mudanças no DNA são geralmente denominadas alterações de número de cópias (CNAs, *do inglês*: copy number alteration) e frequentemente são maiores em tamanho do que as CNVs, podendo envolver ganhos e perdas de grandes segmentos cromossômicos (LAFRAMBOISE *et al.*, 2005; COOPER *et al.*, 2008). As CNAs são de particular interesse na biologia tumoral devido a associação com a desregulação da expressão gênica de oncogenes ou genes supressores de tumor.

A análise do genoma em larga escala tem sido extensivamente aplicada ao estudo do câncer e outras doenças. Em consequência, estes estudos contribuíram para a identificação de genes e vias genéticas associados com etiologia e progressão de doenças. Especialmente, a análise genômica global do DNA tumoral resultou na identificação de alterações na sequência e no número de cópias, associadas com o diagnóstico, prognóstico e resposta ao tratamento de vários tipos de câncer (FOROZAN *et al.*, 2000; ALBERTSON & PINKEL, 2003; LUCITO *et al.*, 2003).

A análise genômica do câncer teve um avanço significativo com a introdução da técnica de hibridização genômica comparativa (CGH), que permitiu fazer o mapa dos ganhos e perdas em nível cromossômico de todo o genoma (KALLIONIEMI *et al.*, 1993; GRAY *et al.*, 1994). Subseqüentemente ao CGH, a técnica de array-CGH (aCGH) foi introduzida em 1998 (PINKEL *et al.*, 1998) permitindo maior automação, melhor reprodutibilidade e precisão devido ao mapeamento mais exato das aberrações cromossômicas. A análise de aCGH é uma técnica conduzida pela marcação diferencial com fluorocromos do DNA genômico total de uma amostra teste (tumor) e

uma amostra referência (normal), seguida pela co-hibridização no array composto de sondas de DNA que incluem representações de todo o genoma. A razão entre as intensidades de fluorescência permite a identificação de CNAs entre a amostra normal e a do tumor.

A tecnologia de aCGH tem sido aplicada com sucesso para caracterizar anormalidades congênitas (KALLIONIEMI *et al.*, 1993; GRAY *et al.*, 1994; VELTMAN *et al.*, 2002) para a classificação de tumores (WESSELS *et al.*, 2002), além de ser útil para uma melhor compreensão do processo da instabilidade cromossômica no câncer humano (NESSLING *et al.*, 2005).

ISOLA *et al.* (1995) foram os primeiros a descrever que alterações genéticas detectadas por CGH poderiam prever a recorrência de câncer de mama em pacientes linfonodo-negativas, ou seja, sem metástases nos linfonodos. Nesse estudo, pacientes que apresentavam um maior número de alterações do número de cópias de DNA tiveram recorrência da doença, enquanto pacientes com poucas alterações permaneceram “livres” da doença. Outros estudos confirmaram essas observações iniciais (AUBELE *et al.*, 2002; CLIMENT *et al.*, 2002; DELLAS *et al.*, 2002; KARLSSON *et al.*, 2007).

Através das análises de aCGH também foi possível demonstrar padrões similares de alterações entre tumores primários de mama e linfonodo sentinela, indicando que poucas alterações genéticas são únicas as metástases linfonodais (CAVALLI *et al.*, 2003; SANTOS *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2009). Esses achados, estão de acordo com a hipótese de que apenas um pequeno número de células de uma população inicial heterogênea no tumor primário adquire uma capacidade metastática. Assim, são sugestivos de que eventos relativamente discretos separam a metástase linfonodal do tumor primário correspondente (HUNTER & ALSARRAJ, 2009).

Tanto o CGH como o aCGH tem auxiliado na identificação de genes importantes nos diferentes subtipos de câncer de mama e no melhor entendimento dos mecanismos de progressão da doença. Os padrões de alterações de número de cópias de DNA podem caracterizar os diferentes subtipos de tumor e indicar a presença de genes que são funcionalmente importantes na carcinogênese. Esses genes podem permitir a identificação de novas vias oncogênicas e, em consequência o

descobrimiento de novos alvos terapêuticos, potencializando-os como biomarcadores de prognóstico e resposta a terapia (REIS-FILHO *et al.*, 2005; HAN *et al.* 2006; CLIMENT *et al.*, 2007)

### 2.8.1 Plataformas de aCGH

Como citado acima, a técnica de aCGH utiliza clones de sondas como sequências mapeadas no genoma impressas em microarranjos (arrays) que vão ser aplicadas para a hibridização das amostras em estudo. As plataformas atualmente disponíveis diferem de acordo com a resolução (determinada pelo tamanho e/ou espaçamento entre as sondas) e tipo de sondas utilizadas nos arrays.

Em relação ao tipo de sondas têm-se dois tipos de plataformas: BAC arrays e arrays de oligonucleotídeos. Os primeiros contêm sequências de cromossomos bacterianos artificiais (BACs, *do inglês*: Bacterial Artificial Chromosomes) e determinam regiões genômicas com ganhos ou perdas com níveis de resolução de megabases (1Mb) ou submegabases (100KBs). Os BAC arrays possuem uma resolução média de 150KBs, com tipicamente grandes segmentos de 100-160KBs (FIEGLER *et al.*, 2003; ISHKANIAN *et al.*, 2004). Já as plataformas de companhias como a *Agilent*, *Affymetrix*, *NimbleGen* e *Illumina* oferecem arrays de oligonucleotídeos, contendo tamanhos de segmento mais curtos, da ordem de 50-100KBs. Dessa maneira, as plataformas de oligonucleotídeos fornecem uma melhor detecção de ganhos e perdas em comparação com os BAC arrays, devido a sua resolução mais alta (em média de 35KB), e devido ao maior número de sondas por array. Contudo, uma desvantagem da plataforma de oligos é que o tamanho pequeno das sondas pode resultar em diminuição da intensidade dos sinais de hibridização, e conseqüentemente, gerar um número maior de achados falso-positivos. Assim, a identificação das regiões de CNAs deve ser realizada utilizando instrumentos estatísticos e algoritmos complexos, que possam excluir qualquer vies experimental, bem como a utilização de técnicas capazes de validar os resultados encontrados, como o FISH (Hibridização *In Situ* Fluorescente, *do inglês*: Fluorescent *In Situ* Hybridization,) e PCR em tempo real (LOCKWOOD *et al.*, 2006; HESTER *et al.*, 2009).

### 3. JUSTIFICATIVAS

Os tumores de mama triplo negativos representam cerca de 10 a 17% de todos os tipos de câncer de mama e são caracterizados por uma evolução clínica agressiva. Pacientes portadoras deste subtipo tumoral possuem um prognóstico desfavorável por apresentarem risco elevado de recorrência e morte em comparação com mulheres portadoras de outros subtipos de tumores mamários. Devido a estes tumores apresentarem baixa ou nenhuma expressão dos receptores hormonais e HER2, as terapias que se direcionam a estes receptores, como a endócrina (tamoxifeno) e a que utiliza o anticorpo monoclonal trastuzumab (herceptin) não são efetivas nestas pacientes. A opção de tratamento se restringe, desta forma, a terapias adjuvantes sistêmicas como a quimioterapia.

A desregulação do receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR) e seus efeitos nas proteínas que atuam na via de sinalização celular PI3K/AKT, estão envolvidos na etiologia e progressão do câncer de mama. Estudos clínicos têm demonstrado que a desregulação destas proteínas pode causar resistência ao tratamento químico e/ou radioterápico. Considerando que vários membros da via PI3K/AKT apresentam potencial terapêutico para os tumores triplo negativos, a investigação das alterações dos genes desta via são essenciais para o entendimento da etiologia destes tumores e dos mecanismos de resistência a terapia.

#### 4. OBJETIVOS

Neste trabalho temos como objetivo principal, analisar a variação do número de cópias dos genes envolvidos na via de sinalização celular PI3K/AKT: *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2*, *PTEN* e *FGFR2*, em tumores de mama triplo negativos.

Os objetivos específicos são:

- Analisar as características clínico-patológicas das pacientes com tumores mamários deste estudo provenientes da região Sul do Brasil e da África do Sul.
- Comparar as características clínico-patológicas de pacientes com tumores mamários dos subtipos triplo negativo (TN) e não-triplo negativo (N-TN) nas duas populações estudadas.
- Analisar as alterações de número de cópias dos genes da via PI3K/AKT, *PIK3CA*, *AKT1*, *AKT2*, *PTEN* e *FGFR2*, através das metodologias de aCGH, FISH e PCR em tempo real em um grupo de 54 tumores de mama TN e 65 tumores N-TN.
- Relacionar as alterações de número de cópias dos cinco genes analisados com os parâmetros clínico-patológicos (tamanho, grau de diferenciação tumoral, e presença de metástases em linfonodos regionais) nos grupos das pacientes com tumores TN e N-TN.
- Comparar as alterações de número de cópias dos cinco genes analisados entre os tumores TN e N-TN.
- Comparar os resultados obtidos com os publicados na literatura.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

### 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

Neste estudo foram utilizadas 119 amostras de tumores primários de mama. Destas, 54 amostras eram do subtipo triplo negativo (TN) e 65 de subtipos não-triplo negativos (N-TN).

#### *Tumores Triplo negativos (TN)*

As amostras TN foram recebidas do Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital das Clínicas, ambos da cidade de Curitiba, PR, Brasil. As pacientes assinaram um Consentimento Livre e Esclarecido sobre os objetivos desta pesquisa (Anexo I).

O subtipo TN foi caracterizado uniformemente para todas as amostras no Serviço de Anatomia Patológica, de ambos os hospitais acima, utilizando-se a técnica de Imunohistoquímica, para a avaliação da expressão protéica dos marcadores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano (HER2). Para a avaliação da expressão do RE utilizou-se o anticorpo monoclonal de origem de camundongo específico para o receptor de estrogênio humano do tipo  $\alpha$  (*Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor  $\alpha$* ) e para o RP o anticorpo policlonal de origem de coelho específico para o RP (*Polyclonal Rabbit Anti-Human Progesterone Receptor*), ambos adquiridos da empresa Dako (Dako North America Inc, Carpinteria, CA). Para a análise do marcador HER2 utilizou-se o HercepTest, também da empresa Dako. O sistema de *scoring* seguiu as recomendações adotadas universalmente (WOLFF *et al*, 2007): as amostras foram consideradas negativas para a expressão deste marcador quando a expressão protéica apresentou *scores* de 0 ou 1+ e positivas quando apresentou score 3+. Amostras com *score* 2+ foram consideradas não conclusivas e foram definidas pela análise por FISH. Um limite de 10% foi considerado para a positividade dos anticorpos contra RE, RP e HER2 de acordo com recomendações internacionais (GOLDHIRSCH *et al*, 2005).

Neste estudo as 54 amostras de tumores TN recebidas após a avaliação dos marcadores tumorais acima descritos, foram obtidas de: tecido congelado a fresco (36 amostras) e tecido fixado em formalina e emblocado em parafina (18 amostras). Estas últimas amostras foram organizadas em 2 lâminas de TMAs (Microarranjos de tecidos, *do inglês*: Tissue Microarray), contendo cada uma 9 amostras tumorais e 1 amostra de tecido mamário normal, que foi utilizado como controle para as análises moleculares. Estas amostras de TMAs, foram também analisadas por imunohistoquímica quanto a expressão protéica do EGFR e das citoqueratinas 5/6 e 14. Todas as amostras apresentaram-se negativas para o receptor EGFR.

As informações epidemiológicas das 36 pacientes TN e das 18 TN/EGFR<sup>-</sup> (TMAs) estão apresentadas nos anexos II e III, respectivamente.

#### *Tumores Não-Triplo Negativos (N-TN)*

Foram considerados neste estudo tumores de subtipo não-triplo negativo (N-TN) todos os tumores que apresentaram positividade para a expressão protéica de pelo menos um dos marcadores tumorais testados (RE, RP e HER2) de acordo com os mesmos critérios apresentados acima.

Esse grupo foi composto de 65 amostras de DNA extraídas de tecido fixado em formalina e emblocado em parafina e foram obtidas do Laboratório Nacional de Ciências da Saúde da cidade do Cabo, da África do Sul. As informações epidemiológicas dessas pacientes estão apresentadas no anexo IV.

Dados epidemiológicos de um grupo de 189 pacientes portadoras de câncer de mama N-TN, foram obtidos do banco de dados do laboratório de Citogenética Humana e Oncogenética da Universidade Federal do Paraná. Os dados epidemiológicos dessas pacientes apresentam-se no anexo V. Esses dados são provenientes do Hospital Nossa Senhora das Graças e Hospital das Clínicas (Curitiba, PR, Brasil) e foram utilizados somente para análises epidemiológicas. As pacientes deste banco de dados apresentam o mesmo grupo étnico do grupo das pacientes portadoras de tumor TN que foram analisadas neste estudo (predominantemente caucasóides).

Este presente estudo faz parte de um amplo projeto de pesquisa que objetiva a análise genética em tumores mamários. Foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Nossa Senhora das Graças, Curitiba, Paraná. Processo número: 25000.007020/2003-93; registro no CONEP:7220 e parecer número 251/2003 de 20 de fevereiro de 2003.

## 5.2 ANÁLISES MOLECULARES

Os experimentos de aCGH, FISH e PCR em tempo real foram realizados na Universidade de Georgetown, Washington DC., EUA, sob supervisão da Dra. Luciane Regina Cavalli, durante os períodos de abril à julho de 2010 e junho e julho de 2011.

### 5.2.1 EXTRAÇÃO DO DNA

A extração de DNA de tumores congelados a fresco foi realizada no tecido tumoral mamário manualmente microdissectado por tesouras, pinças e bisturis estéreis. Anteriormente a extração do DNA das amostras de tecido fixado em formalina e embocado em parafina, estas foram analisadas histologicamente quanto a presença de células tumorais através da análise de lâminas coradas com hematoxilina e eosina (H&E). Estas áreas foram então microdissectadas utilizando-se bisturi esteril, em cortes consecutivos de aproximadamente 20 micrômetros. O tecido removido foi desparafinado em solução de xilol e hidratado em solução de etanol a 95° GL. Os tecidos foram digeridos em 80 µL de tampão da proteinase K 5X, 40 µL de solução de proteinase K (10mg/ml), 20µL de solução de SDS 20%, 240 µL de água ultrapura e 20 µg/µl de enzima Rnase. A mistura foi homogeneizada em agitador tipo Vortex, seguida de incubação no bloco de aquecimento a 60°C por 30 minutos. Na sequência foram adicionados 500 µL de fenol saturado pH 8,0 e 400 µL de clorofórmio, homogeneizando manualmente várias vezes. O material foi precipitado utilizando-se 50 µL de acetato de sódio 3M e 1 ml de etanol absoluto. O DNA foi “lavado” em 500 µL de etanol 70%, aquecido a 55°C por 10 minutos para que ocorra a evaporação da água e ressuspenso em 30 a 50 µl de água ultrapura e retornada ao bloco de aquecimento a 95°C por 10 minutos, para a homogeneização da solução de DNA. Após atingir a

temperatura ambiente, a amostra de DNA foi armazenada a -20°C. A leitura da concentração de DNA foi realizada utilizando-se o espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade). Foram apenas consideradas para as análises moleculares, as amostras que apresentaram razão A260nm/A280nm com valor aproximado de 1,8 a 2,0.

### 5.2.2 ARRAY-CGH (aCGH)

A técnica de aCGH foi realizada em 23 amostras de DNA extraídas de tumores congelados a fresco de pacientes com tumores TN.

Esse método permite a identificação simultânea do número de cópias de um grande número de genes em um único experimento. A plataforma utilizada neste estudo foi a da empresa Agilent – 4x44K (Agilent Inc, CA), contendo oligonucleotídeos correspondentes a 44.000 genes, com sequências baseadas no *database* do HG19 (*Human Genome 19*).

Para a realização do experimento de aCGH, moléculas de DNA genômico do indivíduo a ser avaliado - DNA teste - e de uma amostra referência - DNA controle - são fragmentadas em tamanho de 300 a 500pb por meio de enzimas de restrição. Fragmentos de DNA das amostras teste e controle são incorporados a fluorocromos que emitem luminosidade de diferentes comprimentos de onda. Os DNAs marcados com fluorescências distintas são submetidos à hibridização na lâmina contendo as sondas de DNA (Figura 9).

Para a digestão das amostras foram utilizados três microgramas de DNA tumoral. Para o DNA controle foram utilizados três microgramas de DNA obtido a partir de uma mistura de DNA de um grupo de seis mulheres não portadoras de câncer. As amostras contendo as enzimas de restrição *AluI* (10U/μl) e *RSaI* (10U/μl) (Promega Corp., WI) foram incubadas à 37°C por 2 horas. Após a incubação, as amostras foram submetidas à temperatura de 65 °C para inativação das enzimas. O tamanho dos fragmentos após a digestão do DNA foram avaliados em corrida eletroforética em gel de agarose (2%).

Após a digestão as amostras foram marcadas utilizando-se o *Bioprimer Array CGH genomic labeling kit (Invitrogen, Inc)*, com os fluoróforos correspondentes: Cy3 (fluorocromo cianina 3) para as amostras tumorais e Cy5 (fluorocromo cianina 5) para as amostras controle. A estratégia de marcação dos fragmentos utiliza *random primers* (oligonucleotídeos iniciadores de sequência aleatória) e incorporação pela enzima Klenow com atividade de DNA polimerase I à 65 °C por 10 minutos. Após a desnaturação do DNA (95 °C por 3 minutos), as amostras foram incubadas com a mistura de oligonucleotídeos, fluoróforos e enzima Klenow.

Após a marcação, os fragmentos foram purificados utilizando-se coluna de sílica para a eliminação dos fragmentos não-marcados. Em seguida, a concentração de fluorescência incorporada ao DNA foram determinadas em leitura no espectrofotômetro NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade). As amostras controle e teste foram então combinadas aos pares, de acordo com a concentração de fluorescência incorporada ao DNA, e hibridizadas na presença de *Cot-1* DNA e *Blocking Agent* (10x) à 65°C, em rotação de 20rpm por 40 horas, seguindo-se as instruções do fabricante (Agilent Technologies Inc., Santa Clara, CA).

Após esse período as lâminas de arrays foram escaneadas no Scanner Agilent G2565CA e os dados extraídos pelo programa Feature Extraction v.10.1.1.1 (Agilent Technologies). Os resultados foram analisados utilizando-se o software Workbench 6.5, proveniente da empresa Agilent Technologies. Para a análise das alterações de número de cópias de DNA, foram adotados os seguintes critérios: Algoritmo de análise: ADM2, threshold  $\geq 6$ , amplificação e deleção gênica consideradas na presença de um número mínimo de 3 sondas consecutivas, com valores superiores a  $\log_2 (7/6)$  e inferiores a  $\log_2 (5/6)$ , respectivamente.

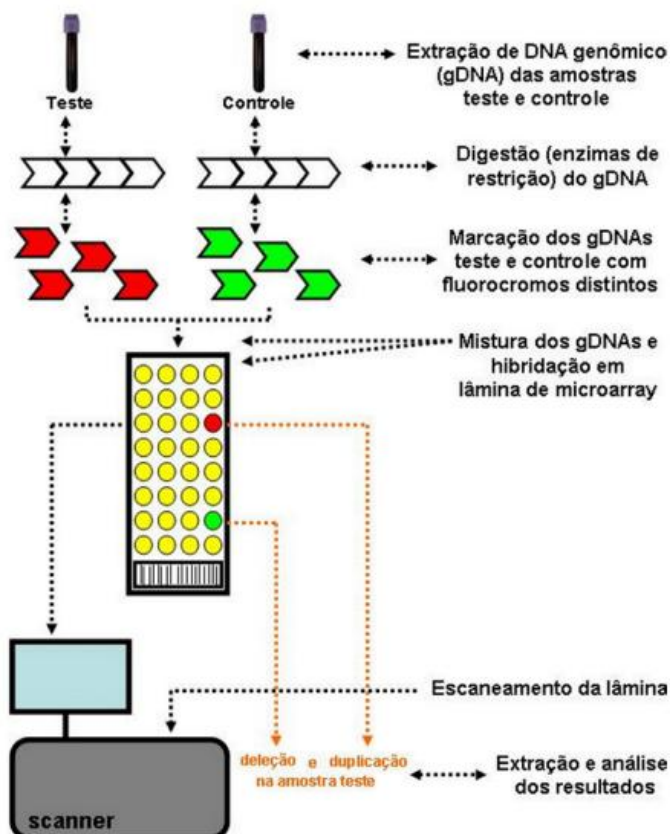


**Figura 9. Fluxograma representando as etapas da técnica de Array-CGH.** Fonte: Baseado em “Agilent Oligonucleotide Array-Based CGH for Genomic DNA Analysis”. [www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/G4410-90010.pdf](http://www.chem.agilent.com/library/usermanuals/public/G4410-90010.pdf)

### 5.2.3 PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL

A técnica de PCR quantitativa em tempo real foi realizada para a determinação de alterações do número de cópias dos genes *PI3KCA*, *AKT1*, *AKT2*, *PTEN* e *FGFR2* em 36 amostras de DNA extraídas de tumores congelados a fresco de pacientes com tumores de mama TN e 65 amostras de DNA extraídos de tecido fixado em formalina e embocado em parafina (ser consistente com os termos na tese toda) de pacientes com tumores N-TN.

Neste estudo para a avaliação do número de cópias dos cinco genes descritos acima, foi utilizado o ensaio TaqMan® Copy Number Assays da empresa Life Technologies™. Essa metodologia é baseada em uma reação dupla de PCR em tempo real que detecta a sequência do gene alvo do estudo e a sequência de um gene de

referência (RNASE P) conhecido por apresentar duas cópias em um genoma diplóide. Este método de detecção relativa é usado para determinar o número de cópias do gene de interesse em um DNA genômico, normalizado com o número de cópias do DNA de referência. Neste trabalho, para fins de simplificação, este ensaio (TaqMan® Copy Number Assays) será referido como PCR em tempo real.

Em todas as placas, contendo as amostras tumorais, foi incluído um DNA controle com o número de cópias dos genes de interesse conhecido. Utilizou-se um DNA genômico de um indivíduo normal que possuía duas cópias dos genes em estudo. Para cada reação foram utilizados: 2 µ de DNA (na concentração de 5ng/µ), 0,5µ mix do gene em estudo (contendo o par de primers e sonda TaqMan®), 0,5µ mix do gene da RNASE P (primers e sonda TaqMan®) e 2µ de água ultrapura, totalizando 10µ de volume de reação. Todas as amostras, incluindo o DNA controle foram analisadas em triplicata na placa. Os reagentes utilizados nestas reações e as especificações do ciclo de PCR encontram-se descritos na Tabela 2.

As análises foram realizadas utilizando-se o software Copy Caller (Life Technologies™). Não foram consideradas amostras que apresentaram valor de  $C_T > 33$  ciclos e valor de  $z\text{-score} \geq 2.65$ . O número de cópias do DNA teste foi calculado pelo método da quantificação relativa:  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  multiplicado por 2 (indivíduos diplóides). Este método é adotado devido a padronização prévia dos ensaios de primers e sondas comercializados pela empresa que fornecem uma eficiência de reação de 100%, possibilitando que as curvas de amplificação entre os genes testados e o gene de referência possam ser comparadas com precisão.

**Tabela 2.** Localização e marcação das Sondas TaqMan®, reagentes e ciclo de amplificação utilizados nos ensaios de PCR em tempo real.

|                    |                                                                              | SONDA TAQMAN® |                                               |
|--------------------|------------------------------------------------------------------------------|---------------|-----------------------------------------------|
|                    |                                                                              | Localização   | Marcação                                      |
| Genes Alvo         | <i>AKT1</i>                                                                  | 105241518     |                                               |
|                    | <i>AKT2</i>                                                                  | 40761052      | 5' = Repórter - FAM                           |
|                    | <i>PIK3CA</i>                                                                | 178876317     | 3' = Quentcher - não                          |
|                    | <i>PTEN</i>                                                                  | 89685514      | fluorescente                                  |
|                    | <i>FGFR2</i>                                                                 | 123325143     |                                               |
| Gene de Referência | <i>RNASE P</i>                                                               | 157907524     | 5' = Repórter - VIC<br>3' = Quentcher - TANRA |
| Master Mix         | Taq Gold DNA polymerase (Hot start), dNTPs                                   |               |                                               |
| Ciclo de PCR       | Hold: 95°C - 10 minutos<br>40 Ciclos: 95°C - 15 segundos/ 60°C - 60 segundos |               |                                               |

#### 5.2.4 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE (FISH)

As análises de FISH foram realizadas nas 18 amostras de tumores mamários TN/EGFR<sup>+</sup> presentes nas lâminas de TMAs.

A técnica de FISH consiste, basicamente, no pareamento de determinado segmento de DNA com uma sequência específica de nucleotídeos complementares. Essa técnica envolve a preparação das amostras, o isolamento e a marcação da sequência de DNA que se deseja localizar *in situ* e a sua hibridização nos cromossomos ou em tecido fixado na lâmina, de acordo com os itens a seguir:

##### 5.2.4.1. Preparo das amostras

As lâminas de TMA contendo os tecido mamários foram expostas a solução de xilol, para a desparafinização do tecido, seguido de tratamento com álcool a 100%. O tecido tumoral foi digerido em solução ácida de 49,5ml de água destilada: 0,5ml de ácido clorídico (1N) contendo 200 µl de pepsina a 10% à 37°C por 4 horas. O tecido foi

em seguida desidratado em uma série etanólica de 70, 90 e 100% por 3 minutos em cada etapa e desnaturado em solução de formamida a 70% e tampão citrato de sódio (2xSSC) à 80°C por 4 minutos, para depois ser desidratado com álcool gelado (-20°C) à 70%, 90% e 100% durante 5 minutos cada etapa. As lâminas foram secadas e armazenadas a temperatura ambiente até a o processo de hibridização.

#### 5.2.4.2. Construção das sondas

As sondas foram construídas a partir de cromossomos artificiais de bactérias - BACS (*do inglês*: Bacterial Artificial Chromosomes) selecionados através dos registros do banco de genes (<http://genome.ucsc.edu/>), contendo a seqüência dos genes: *PI3KCA*, *AKT1*, *AKT2*, *PTEN* e *FGFR2* (Tabela 3). A extração do DNA foi realizada utilizando-se o kit *Qiagen Large-Construc* (*Qiagen*, EUA).

**Tabela 3.** Identificação dos BACs, localização e marcação utilizada.

| BACs         | Localização | Gene          | Marcação     |
|--------------|-------------|---------------|--------------|
| RP11-245C23  | 3q26.3      | <i>PIK3CA</i> | Digoxigenina |
| RP11-466H15  | 3q26.3      |               | Digoxigenina |
| RP11-613F6   | 3q26.32     |               | Digoxigenina |
| CTD-2507D9   | 14q32       | <i>AKT1</i>   | Digoxigenina |
| CTD-3022N17  | 14q32       |               | Digoxigenina |
| RP11-36B2    | 19q13.1     | <i>AKT2</i>   | Biotina      |
| RP11-639f21  | 19q13.1     |               | Biotina      |
| RP11-296P10  | 19q13.2     |               | Biotina      |
| RP11-7P17    | 10q26.12    | <i>FGFR2</i>  | Digoxigenina |
| RP11-300A10  | 10q26.13    |               | Digoxigenina |
| RP11-1024G22 | 10q26.13    |               | Digoxigenina |
| RP11-383D9   | 10q23.31    | <i>PTEN</i>   | Biotina      |
| RP11-846G17  | 10q23.31    |               | Biotina      |

#### 5.2.4.3 Marcação das sondas

As sondas foram marcadas com as moléculas repórteres biotina e digoxigenina pelo processo de *nick translation*. Nesta reação utiliza-se 1µg de DNA, nucleotídeos não marcados (dNTPs normais – A, T, C, G, sendo o dTTP em menor concentração), nucleotídeo marcado (dUTP) e as enzimas DNase I e DNA polimerase I. A DNase I hidrolisa o DNA gerando quebras (*nicks*) em cada uma das fitas da molécula de DNA aleatoriamente (um pequeno número de quebras pode resultar em ineficiente incorporação de nucleotídeos marcados e gera sondas muito longas; por outro lado, quebras em excesso, geram sondas muito curtas). Assim, nucleotídeos marcados e não marcados da mistura de *nick translation* foram incorporados ao novo DNA sintetizado. Em geral, timinas são substituídas por uracilas marcadas, sem que todas as timinas sejam substituídas, pois se isto ocorrer a conformação da molécula de DNA pode ser alterada e, por consequência, prejudicar o processo de hibridização *in situ*. Durante a reação, ocorre a quebra em uma das fitas, e a dupla fita do DNA fragilizada também se rompe. Assim, este processo além de incorporar nucleotídeos marcados, fragmenta o DNA.

O tamanho ideal para a sonda é em torno de 200-300 pb. O tamanho dos fragmentos foi verificado por corrida eletroforética em gel de agarose 2%.

#### 5.2.4.4 Hibridização

As sondas foram primeiramente desnaturadas à 90°C por 4 minutos e em seguida pré-aneladas à 37°C por 1 hora com DNA de Cot1 e DNA de espermatozoário de salmão para bloqueio das regiões repetitivas.

Foram aplicados 15µl da sonda nos tecidos desnaturados contidos nas lâminas de TMA, que foram seladas e incubadas em estufa por 16 horas à 37°C.

#### 5.2.4.5 Lavagem pós-hibridização

As lâminas foram lavadas em solução de 50% de formamida (75ml 2xSSC + 75ml de formamida) por 5 minutos por três vezes e em solução de 1xSSC por 5 minutos por três vezes. Em seguida, foram incubadas à 37°C em câmara úmida por 45 minutos com 100µl de solução bloqueadora.

#### 5.2.4.6 Detecção e contagem de sinais de hibridização

Para a detecção dos sinais fluorescentes foi realizado o método de detecção indireto. Foram adicionados 100µl da solução de detecção 1 (1 µl de Avidina – FITC, 1 µl de mouse anti-digoxigenina diluídos em 200µl de tampão de detecção) nas lâminas, sendo estas incubadas à 37°C em câmara úmida por 45 minutos. O mesmo procedimento foi utilizado para as soluções de detecção 2, 3 e 4 (contendo respectivamente 1 µl de *rabbit anti-mouse* – TRITC + 1 µl anti-avidina biotinilada, 1 µl de avidina-FITC e 1 µl de goat anti-rabbit TRITC).

Em seguida as lâminas foram lavadas em solução de 4xSSC + 0,1% *Tween* 20 à 42° C por 5 minutos, três vezes, coradas com DAPI por 10 minutos e lavadas em solução de 4xSSC + 0,1% *Tween* 20 em temperatura ambiente por 2 minutos. Após a adição de solução de *antifade* e lamínula, as lâminas foram analisadas em microscópio Leica DMRBE (Leica, Wetzlar, Alemanha), equipado com filtros ópticos para DAPI, FITC e TRITC e acoplado à uma câmara com dispositivo CCD.

Um mínimo de 100 células em intérfase foram avaliadas para cada amostra. Foram apenas considerados núcleos interfásicos não sobrepostos, com sinal de hibridização de intensidade satisfatória. Os sinais das sondas controle e das sondas gênicas específicas foram anotados para cada amostra por dois observadores independentes. Três a cinco imagens representativas de cada caso foram capturadas.

#### 5.2.4.7 Confirmação da localização cromossômica das sondas de BACs

Anteriormente a hibridização das sondas construídas a partir dos BACs nas amostras tumorais, estas foram testadas quanto a sua localização cromossômica e eficiência de hibridização em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos obtidos através da preparação citológica de sangue periférico proveniente de um indivíduo normal. A Figura 10 apresenta a hibridização das sondas para os genes *FGFR2* e *PTEN*, nos cromossomos metafásicos normais.

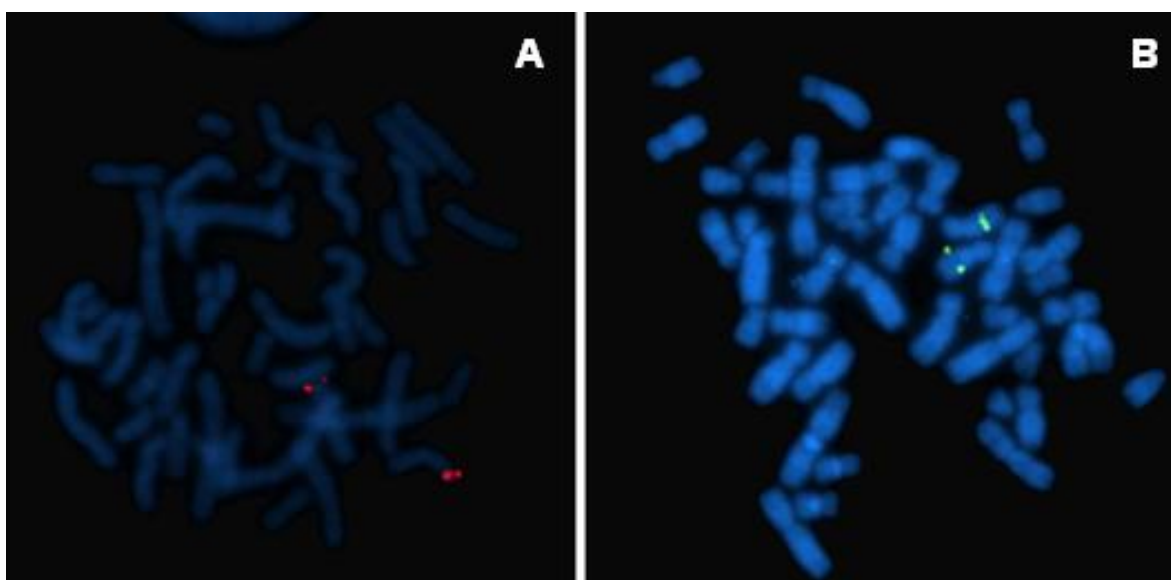


**Figura 10. Localização das sondas em cromossomos normais. A]** Sonda para o gene *FGFR2* (sinais vermelhos) (BAC: RP11-300A10) em 10q26.13 **B]** Sonda para o gene *PTEN* (sinais verdes) (BAC: RP11-846G17) em 10q23.31. Aumento: 100x. Fonte: a autora.

### 5.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise de variância foi realizada para comparar as médias dos tamanhos dos tumores nas amostras com os resultados de alteração de número de cópias nos cinco genes analisados. O teste de BARTLETT foi utilizado para verificar a homogeneidade das variâncias.

O teste do Qui-Quadrado foi utilizado na comparação entre os parâmetros histopatológicos (presença de metástase em linfonodos regionais e grau de diferenciação tumoral) e os resultados das análises de alteração de número de cópias para cada um dos genes. Foram considerados significativos valores de  $P < 0,05$ .

## 6. RESULTADOS

### 6.1 ANÁLISES EPIDEMIOLÓGICAS

Na tabela 4 estão apresentados os parâmetros clínico-patológicos disponíveis para as 54 pacientes com tumores mamários TN (provenientes da região sul do Brasil) e 65 pacientes com tumores mamários N-TN (provenientes da África do Sul). Estas informações, com diferentes tamanhos amostrais (**n**) conforme o parâmetro analisado (idade, grau de diferenciação tumoral e tamanho do tumor), foram comparadas entre os dois grupos de pacientes analisados.

Foi observada no grupo TN uma alta frequência de pacientes com grau tumoral III (tumores pouco diferenciados) e baixa frequência de pacientes com grau tumoral I (tumores bem diferenciados), o que resultou em uma diferença estatisticamente significativa (representando 99,8% do valor do  $\chi^2$  total = 8,11/8,12) quando comparado com o grupo de pacientes N-TN ( $\chi^2_2 = 8,12$ ;  $P < 0,02$ ). Não foi observada diferença estatística quando estes grupos foram comparados em relação a idade das pacientes e tamanho do tumor.

**Tabela 4.** Análise de parâmetros clínico-patológicos de pacientes TN e N-TN do Sul do Brasil e da África do Sul, respectivamente.

| Características              | TN (Brasil)<br>Nº pacientes (%) | N-TN (África do Sul)<br>Nº pacientes (%) | Qui-quadrado                   |
|------------------------------|---------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Idade</b>                 |                                 |                                          |                                |
| < 60 anos                    | 27 (60)                         | 36 (66,7)                                | $\chi^2_1 = 0,47$ ; $P > 0,30$ |
| ≥ 60 anos                    | 18 (40)                         | 18 (33,3)                                |                                |
| Média ± DP                   | 55,13 ± 15 anos                 | 53,7 ± 12,7                              |                                |
| <b>Grau tumoral</b>          |                                 |                                          |                                |
| Grau I                       | 2 (4,1)                         | 13 (21,7)                                | $\chi^2_2 = 8,12$ ; $P < 0,02$ |
| Grau II                      | 24 (49,0)                       | 29 (48,3)                                |                                |
| Grau III                     | 23 (46,9)                       | 18 (30)                                  |                                |
| <b>Tamanho do tumor (cm)</b> |                                 |                                          |                                |
| T1 (< 2,0)                   | 8 (26,7)                        | 8 (15,1)                                 | $\chi^2_2 = 1,65$ ; $P > 0,30$ |
| T2 (≥ 2,0 e ≤ 5,0)           | 20 (66,6)                       | 41 (77,4)                                |                                |
| T3 (> 5,0)                   | 2 (6,7)                         | 4 (7,5)                                  |                                |
| Média ± DP                   | 3,1 ± 2,0 cm                    | 3,5 ± 1,9 cm                             |                                |

Legenda: DP: desvio padrão.

Os dados clínico-patológicos das mesmas 54 pacientes com tumores TN provenientes do Sul do Brasil foram comparadas com uma amostra de 189 pacientes de tumores N-TN provenientes da mesma região do país e mesmo grupo étnico (predominantemente de origem caucasóide) (Tabela 5).

Novamente, assim como observado na análise entre as pacientes de diferentes grupos étnicos, foi observada uma diferença estatisticamente significativa entre o grau tumoral de pacientes com tumores TN e N-TN ( $\chi^2_2 = 13,7$   $P < 0,01$ ). Este resultado foi causado pela baixa frequência de pacientes com tumores grau I e alta frequência de pacientes com tumores grau III observada na amostra TN, representando 76% do valor do  $\chi^2$  total (10,4/13,7). Não foi observada diferença estatisticamente significativa quando estes grupos foram comparados em relação a idade das pacientes, tamanho do tumor e presença de metástases nos linfonodos axilares.

**Tabela 5.** Análise dos parâmetros clínico-patológicos de pacientes TN e N-TN do Sul do Brasil.

| <b>Características</b>            | <b>TN (Brasil)</b><br>N° pacientes (%) | <b>N-TN (Brasil)</b><br>N° pacientes (%) | <b>Qui-quadrado</b>            |
|-----------------------------------|----------------------------------------|------------------------------------------|--------------------------------|
| <b>Idade</b>                      |                                        |                                          |                                |
| < 60 anos                         | 27 (60)                                | 111 (59,4)                               | $\chi^2_1 = 0,01$ ; $P > 0,90$ |
| ≥ 60 anos                         | 18 (40)                                | 76 (40,6)                                |                                |
| <i>Média ± DP</i>                 | 55,13 ± 15 anos                        | 56,5 ± 13,7 anos                         |                                |
| <b>Grau tumoral</b>               |                                        |                                          |                                |
| Grau I                            | 2 (4,1)                                | 31 (17,5)                                | $\chi^2_2 = 13,7$ ; $P < 0,01$ |
| Grau II                           | 24 (49,0)                              | 106 (59,9)                               |                                |
| Grau III                          | 23 (46,9)                              | 40 (22,6)                                |                                |
| <b>Envolvimento de linfonodos</b> |                                        |                                          |                                |
| Positivo                          | 26 (57,8)                              | 102 (56,4)                               | $\chi^2_1 = 0,03$ $P > 0,80$   |
| Negativo                          | 19 (42,2)                              | 79 (43,6)                                |                                |
| <b>Tamanho do tumor (cm)</b>      |                                        |                                          |                                |
| T1 (< 2,0)                        | 8 (26,7)                               | 36 (19,8)                                | $\chi^2_2 = 1,37$ ; $P > 0,50$ |
| T2 (≥ 2,0 e ≤ 5,0)                | 20 (66,6)                              | 123 (67,6)                               |                                |
| T3 (> 5,0)                        | 2 (6,7)                                | 23 (12,6)                                |                                |
| <i>Média ± DP</i>                 | 3,1 ± 2,0 cm                           | 3,4 ± 1,7 cm                             |                                |

Legenda: DP: desvio padrão.

Na Tabela 6 observa-se que não há diferenças estatisticamente significativas entre os parâmetros clínico-patológicos (idade, grau e tamanho do tumor) das pacientes N-TN nas duas populações estudadas, sul do Brasil e África do Sul.

**Tabela 6.** Análise dos parâmetros clínico-patológicos de pacientes N-TN do Sul do Brasil e da África do Sul.

| Características              | N-TN (Brasil)<br>Nº pacientes (%) | N-TN (África do Sul)<br>Nº pacientes (%) | Qui-quadrado             |
|------------------------------|-----------------------------------|------------------------------------------|--------------------------|
| <b>Idade</b>                 |                                   |                                          |                          |
| < 60 anos                    | 111 (59,4)                        | 36 (66,7)                                | $\chi^2_1 = 0,94$ P>0,40 |
| ≥ 60 anos                    | 76 (40,6)                         | 18 (33,3)                                |                          |
| Média ± DP                   | 56,5 ± 13,7 anos                  | 53,7 ± 12,7                              |                          |
| <b>Grau tumoral</b>          |                                   |                                          |                          |
| Grau I                       | 31 (17,5)                         | 13 (21,7)                                | $\chi^2_2 = 2,47$ P>0,20 |
| Grau II                      | 106 (59,9)                        | 29 (48,3)                                |                          |
| Grau III                     | 40 (22,6)                         | 18 (30)                                  |                          |
| <b>Tamanho do tumor (cm)</b> |                                   |                                          |                          |
| T1 (< 2,0)                   | 36 (19,8)                         | 8 (15,1)                                 | $\chi^2_2 = 1,9$ P>0,30  |
| T2 (≥2,0 e ≤5,0)             | 123 (67,6)                        | 41 (77,4)                                |                          |
| T3 (> 5,0)                   | 23 (12,6)                         | 4 (7,5)                                  |                          |
| Média ± DP                   | 3,3 + 1,7 cm                      | 3,5 ± 1,9 cm                             |                          |
| <b>Grupo étnico</b>          |                                   |                                          |                          |
|                              | Origem Caucasóide                 |                                          |                          |
| Negro                        |                                   | 5 (9,3)                                  |                          |
| Branco                       |                                   | 12 (22,2)                                |                          |
| Misto                        |                                   | 36 (66,6)                                |                          |
| Indiano                      |                                   | 1 (1,9)                                  |                          |

Legenda: DP: desvio padrão.

## 6.2 ANÁLISES DE ALTERAÇÕES DE NÚMERO DE CÓPIAS DE DNA

As análises de alteração de número de cópias de DNA foram realizadas nas 54 amostras de tumores mamários TN provenientes do Sul do Brasil (pelos métodos de aCGH, PCR em tempo real e FISH) e nas 65 amostras de tumores N-TN (pelo método de PCR em tempo real) provenientes da África do Sul.

### 6.2.1. Tumores Triplo Negativos (TN) – Pacientes do Sul do Brasil

#### 6.2.1.1. Análises pelos métodos de aCGH e PCR em Tempo Real

O método de aCGH foi realizado em 23 amostras de DNA de tumores TN e as mesmas foram submetidas à PCR em tempo real para a validação dos resultados nos genes da via PI3K/AKT (*AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *FGFR2* e *PTEN*). A tabela 7 apresenta os resultados observados através dos dois métodos utilizados para os cinco genes da via PI3K/AKT.

Através das análises de aCGH nas amostras desse estudo também foi possível observar a alteração do número de cópias de uma série de outros genes não relacionados a via PI3K/AKT. No entanto estes dados não foram apresentados por não fazerem parte dos objetivos deste trabalho.

**Tabela 7.** Resultados das análises de 23 tumores TN pelos métodos de aCGH e validação por PCR em tempo real.

| Ensaio        | aCGH             | Resultados Validados – PCR tempo real        |
|---------------|------------------|----------------------------------------------|
|               | Nº pacientes (%) | Nº pacientes (Concordância dos resultados %) |
| <b>AKT1</b>   |                  |                                              |
| Normal        | 22 (95,6)        | 11 (50)                                      |
| Amplificação  | 0                | 0                                            |
| Deleção       | 1 (4,4)          | 1 (100)                                      |
| <b>AKT2</b>   |                  |                                              |
| Normal        | 23 (100)         | 12 (52,2)                                    |
| Amplificação  | 0                | 0                                            |
| Deleção       | 0                | 0                                            |
| <b>PIK3CA</b> |                  |                                              |
| Normal        | 21 (91,2)        | 8 (38,1)                                     |
| Amplificação  | 1 (4,4)          | 1 (100)                                      |
| Deleção       | 1 (4,4)          | 1 (100)                                      |
| <b>PTEN</b>   |                  |                                              |
| Normal        | 21 (91,2)        | 7 (33,3)                                     |
| Amplificação  | 0                | 0                                            |
| Deleção       | 2 (8,8)          | 2 (100)                                      |
| <b>FGFR2</b>  |                  |                                              |
| Normal        | 21 (91,2)        | 11 (52,4)                                    |
| Amplificação  | 1 (4,4)          | 1 (100)                                      |
| Deleção       | 1 (4,4)          | 1 (100)                                      |

Como indicado na tabela 7, a análise dos tumores TN por aCGH, identificou alterações nos genes da via PI3K/AKT com frequências que variaram de 4,4 % (deleção de *AKT1*, amplificação e deleção de *PIK3CA*, amplificação e deleção de *FGFR2*) a 8,8% (deleção de *PTEN*). O gene *AKT2* não apresentou alteração de número de cópias em nenhuma das amostras analisadas por este método.

Todas as alterações de número de cópias observadas por aCGH foram confirmadas por PCR em tempo real na análise do mesmo DNA genômico. A Figura 11 apresenta estas análises em amostras de duas pacientes. Por outro lado, a frequência de concordância entre as duas análises nos casos identificados como normais pelo aCGH, ou seja, que não apresentaram alterações de número de cópias para os genes estudados, variou de 33,3 a 52,4%.

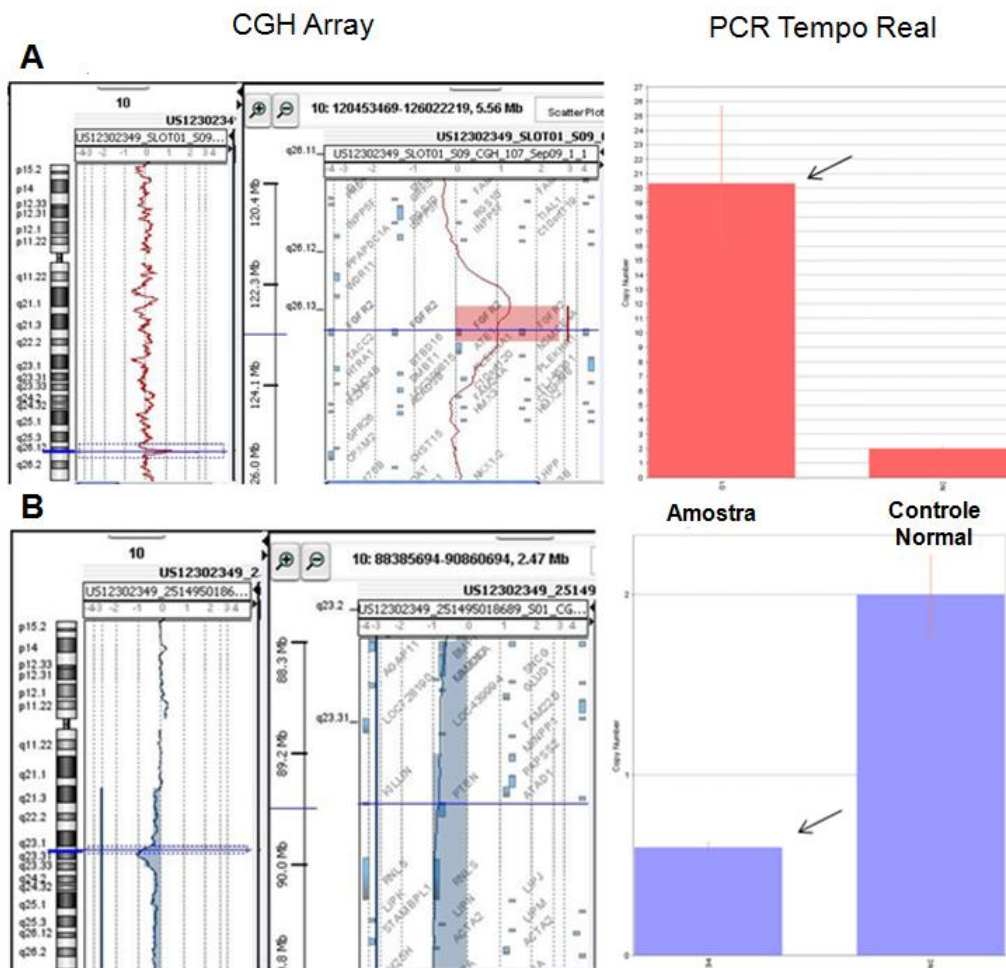


**Figura 11. Resultados de aCGH e PCR em tempo Real. A]** Caso 13: Amplificação na região do gene *FGFR2* detectada pelo método de aCGH array e aumento do número de cópias do mesmo gene (20 cópias) detectado pelo método de PCR em tempo real. **B]** Caso 22: deleção na região do gene *PTEN* detectada por aCGH e diminuição (1 cópia) do mesmo gene detectado pelo método de PCR tempo real. Fonte: a autora.

Os resultados obtidos por PCR em tempo real realizado nas 36 amostras de DNA dos tumores TN, são apresentados na tabela 8 e nas Figuras 12, 13, 14, 15 e 16, para os genes *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA* e *FGFR2*, respectivamente.

O número de amostras analisadas por este método variou de acordo com o gene analisado: os genes *AKT2*, *PTEN* e *FGFR2* foram analisados para todas as 36 amostras. Para os genes *AKT1* e *PIK3CA* somente uma amostra não pôde ser analisada. Dentre as alterações observadas, o gene *PTEN*, foi observado alterado com maior frequência (66,6%), seguido pelos genes *PIK3CA* (60%) *AKT1* (40%), *FGFR2* (44,5%) e *AKT2* (38,9%).

Os casos com números de cópias normais, aumentadas e diminuídas não se distribuíram igualmente nos cinco genes analisados por este método ( $\chi^2_8=24,94; P<0,01$ ). Observou-se que dos 15  $\chi^2$  parciais obtidos, apenas um deles (diminuição do número de cópias no gene *PTEN*, que foi maior do que o esperado=9,50) foi responsável por 46% (11,57/24,94) do valor do  $\chi^2$  total.

**Tabela 8.** Resultados das análises de PCR em tempo real dos cinco genes da via PI3K/AKT realizadas em 36 amostras de tumores mamários TN.

| Genes         | N.º de cópias normal | Aumento de cópias | Diminuição de cópias |
|---------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|               | Nº pacientes (%)     | Nº pacientes (%)  | Nº pacientes (%)     |
| <i>AKT1</i>   | 21 (60%)             | 7 (20%)           | 7 (20%)              |
| <i>AKT2</i>   | 22 (61,1%)           | 9 (25%)           | 5 (13,9%)            |
| <i>PIK3CA</i> | 14 (40%)             | 13 (37,1%)        | 8 (22,9%)            |
| <i>PTEN</i>   | 12 (33,3%)           | 4 (11,1%)         | 20 (55,6%)           |
| <i>FGFR2</i>  | 20 (55,5%)           | 9 (25%)           | 7 (19,5%)            |

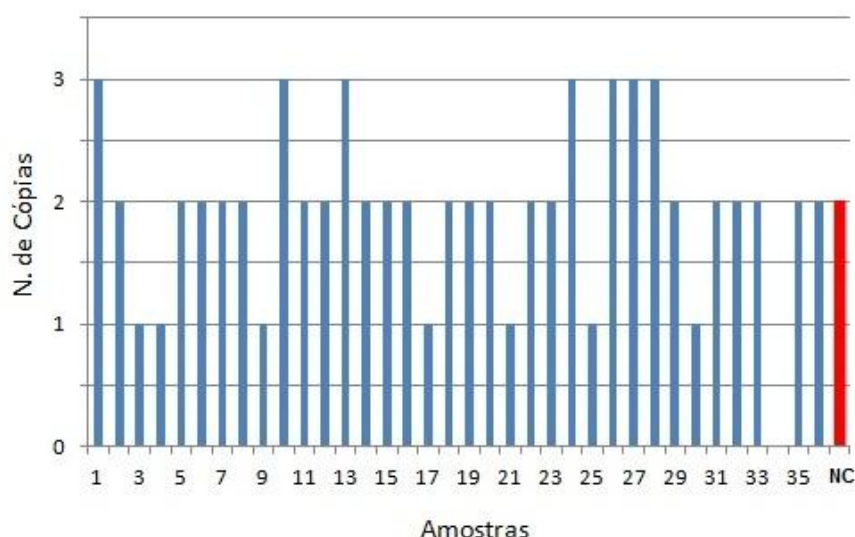


**Figura 12. Gene *AKT1* (TN).** oGráfico dos resultados de alterações de número de cópias do gene *AKT1* obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em vermelho): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

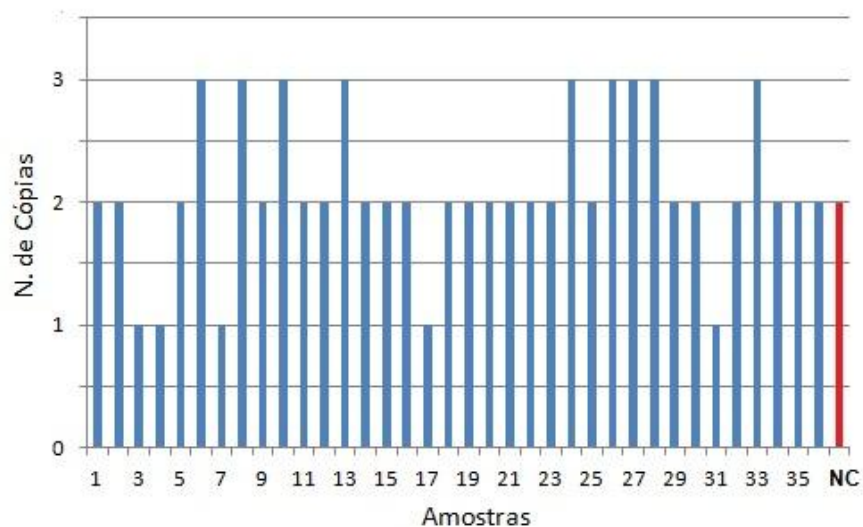


**Figura 13. Gene *AKT2* (TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em vermelho): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

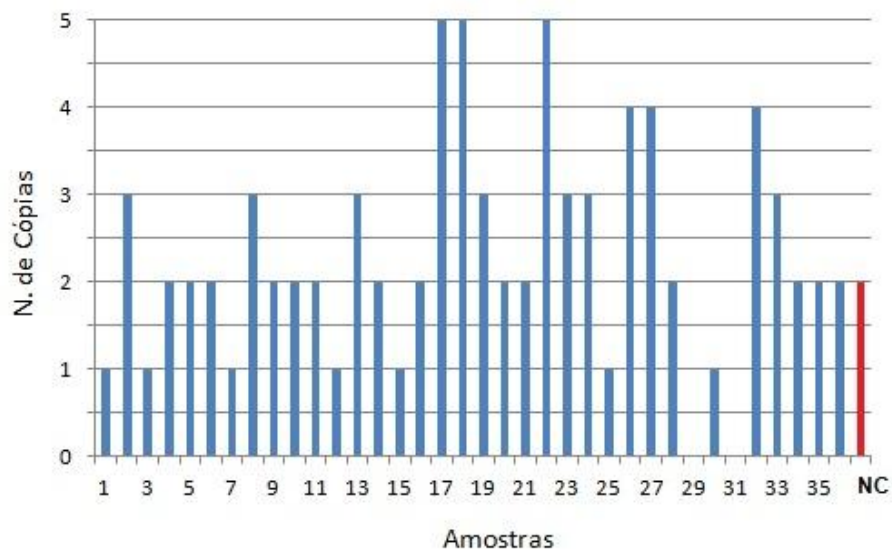


**Figura 14. Gene *PIK3CA* (TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em vermelho): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

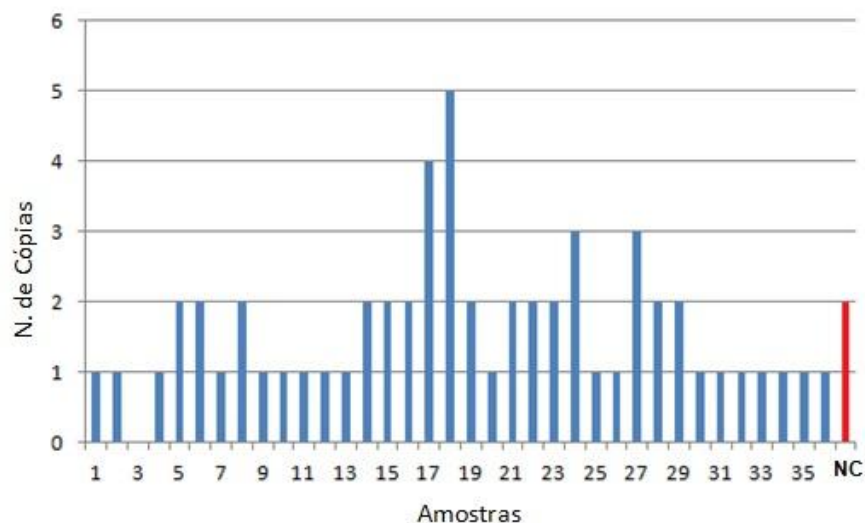


**Figura 15. Gene *PTEN* (TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em vermelho): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

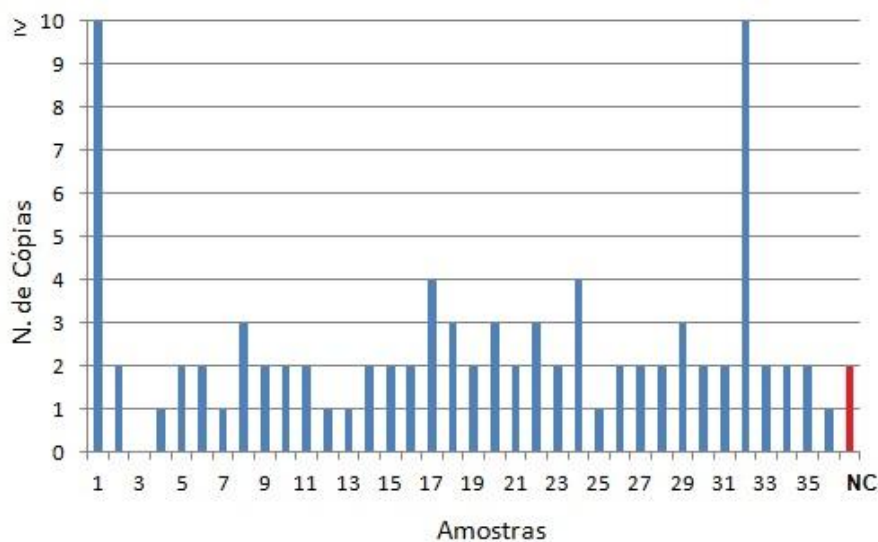


**Figura 16. Gene *FGFR2* (TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em vermelho): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

#### 6.2.1.2. Análises pelo método de FISH

A Tabela 9 apresenta os resultados de FISH realizado para as 18 amostras de tumores TN contidas nas lâminas de TMAs. O número de amostras analisadas por este método variou de acordo com o gene analisado: o maior número

de casos analisados foi para o gene *AKT1* (17 casos), seguido dos genes *PIK3CA* e *FGFR2* (14 casos), *AKT2* (11 casos) e *PTEN* (8 casos). O gene que apresentou o maior número de alterações de cópias de DNA foi o *PTEN* observado com perdas e ganhos em 62,5% e 12,5% dos casos respectivamente. Os outros genes com o maior número de alterações foram *FGFR2*, *AKT2*, *PIK3CA* e *AKT1*, todos com apenas ganhos do número de cópias, em 50%, 27,3%, 21,4% e 11,8% dos casos respectivamente.

De acordo com os dados desta tabela (excluindo-se a diminuição do número de cópias) avaliamos se as alterações de número de cópias se distribuem igualmente nos cinco genes analisados, obtendo-se um valor de  $\chi^2$  não significativo ( $\chi^2_4=6,02; P>0,10$ ). No entanto, observe-se que, como ocorreu na análise por PCR em tempo real, que o gene *PTEN* diferenciou-se pelo número elevado de casos com diminuição de cópias. As figuras 17 e 18 apresentam alguns exemplos das imagens obtidas na análise de FISH.

**Tabela 9.** Resultados das análises dos genes da via PI3K/AKT pelo método de FISH nas amostras de tumores TN analisadas nos dois TMAs.

| Genes         | N.º de cópias normal | Aumento de cópias | Diminuição de cópias |
|---------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|               | Nº pacientes (%)     | Nº pacientes (%)  | Nº pacientes (%)     |
| <i>AKT1</i>   | 15 (88,2%)           | 2 (11,8%)         | 0                    |
| <i>AKT2</i>   | 8 (72,7%)            | 3 (27,3%)         | 0                    |
| <i>PIK3CA</i> | 11 (78,6%)           | 3 (21,4%)         | 0                    |
| <i>PTEN</i>   | 2 (25%)              | 1 (12,5%)         | 5 (62,5%)            |
| <i>FGFR2</i>  | 7 (50%)              | 7 (50%)           | 0                    |

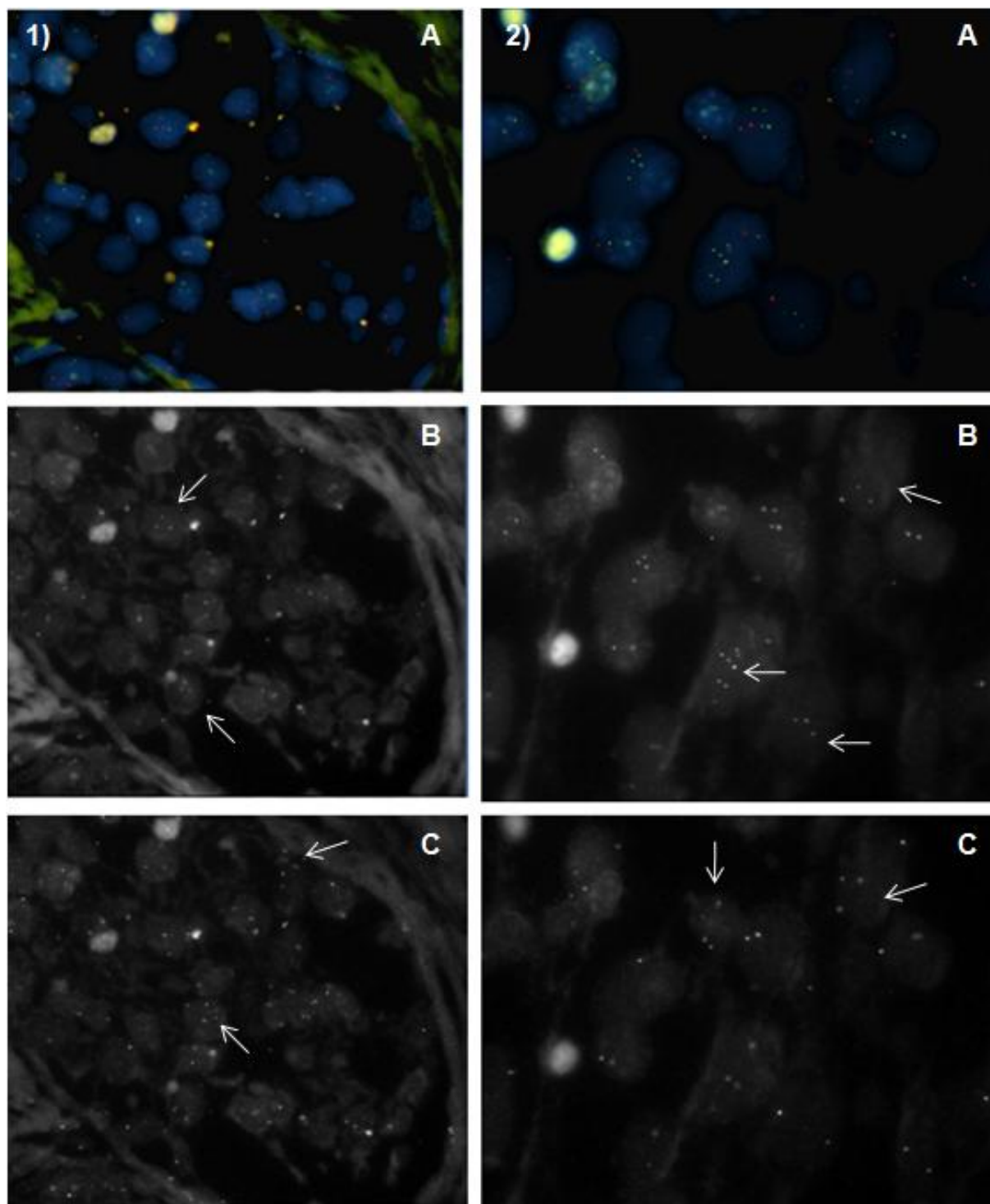


**Figura 17. Resultados da análise de FISH para os genes *AKT2* (sinais verdes) e *AKT1* (sinais vermelho).** Amostras de número 17 (1) e 13 (2) **A]** Coloração em filtro triplo (DAPI, FITC e TRITC). **B]** Filtro para FITC, mostrando aumento do número de cópias do gene *AKT2* em células tumorais interfásicas (setas). **C]** Filtro TRITC, mostrando aumento do número de cópias para o gene *AKT1* em células tumorais interfásicas (setas). Aumento 100x.

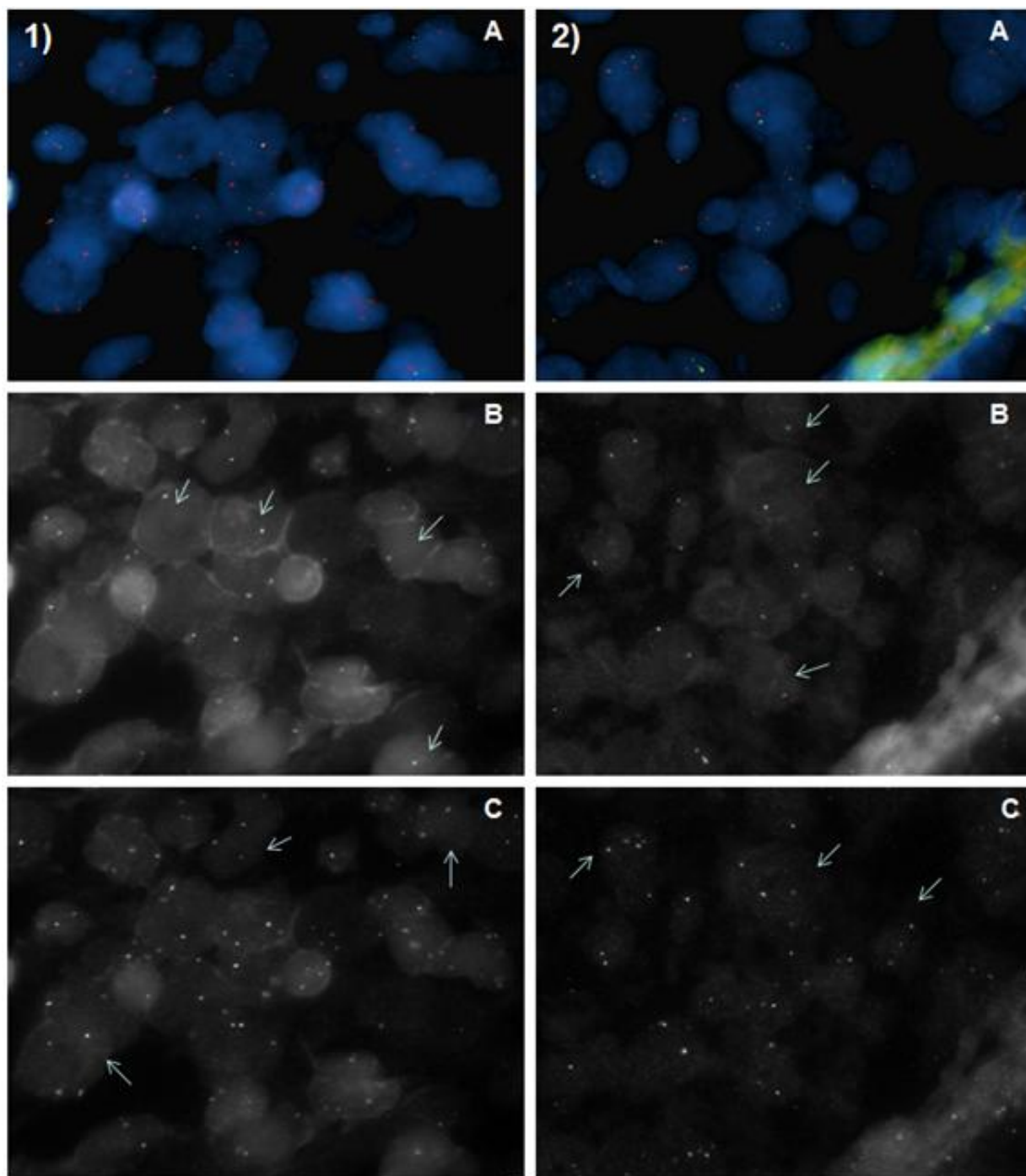


**Figura 18. Resultados da análise de FISH para os genes *PTEN* (sinais verdes) e *FGFR2* (sinais vermelho).** Amostras de número 13 (1) e 9 (2) **A]** Coloração em filtro triplo (DAPI, FITC e TRITC). **B]** Filtro para FITC, mostrando a perda do gene *PTEN* em células tumorais interfásicas (setas). **C]** Filtro TRITC, mostrando aumento do número de cópias para o gene *FGFR2* em células tumorais interfásicas (setas). Aumento 100x.

### 6.2.1.3. Resultados totais de alterações de número de cópias dos tumores TN

A tabela 10 apresenta os resultados das alterações de número de cópias obtidos nas 54 amostras de tumores TN obtidos pelos 3 métodos de análise: aCGH, PCR em tempo real e FISH. As análises de aCGH foram incluídas somente para as amostras cujos resultados foram validados por PCR em tempo real. Os resultados de número de cópias normais e de aumento do número de cópias obtidos pelos métodos de PCR em tempo real e FISH apresentaram-se homogeneamente distribuídos ( $\chi^2_4=6,0$ ;  $P>0,10$  e  $\chi^2_4=3,01$ ;  $P>0,20$ , respectivamente) nos diferentes genes analisados. Essa análise demonstra que os resultados obtidos pelos duas metodologias podem ser agrupados.

**Tabela 10.** Resultados totais de alterações de número de cópias obtidos nas 54 amostras de tumores TN para os cinco genes da via PIK3/AKT analisados neste estudo.

| Genes         | N.º de cópias normal | Aumento de cópias | Diminuição de cópias |
|---------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|               | Nº pacientes (%)     | Nº pacientes (%)  | Nº pacientes (%)     |
| <i>AKT1</i>   | 36 (69,2)            | 9 (17,3)          | 7 (13,5)             |
| <i>AKT2</i>   | 30 (63,8)            | 12 (25,5)         | 5 (10,6)             |
| <i>PIK3CA</i> | 25 (51)              | 16 (32,6)         | 8 (16,3)             |
| <i>PTEN</i>   | 14 (31,8)            | 5 (11,4)          | 25 (56,8)            |
| <i>FGFR2</i>  | 27 (54)              | 16 (32)           | 7 (14%)              |

Como o esperado, considerando que os dados apresentados nesta tabela representam a somatória dos dados das tabelas 8 e 9, os números de casos com cópias normais, aumentadas e diminuídas para os cinco genes analisados não se distribuíram igualmente ( $\chi^2_8=45,56$ ;  $P<0,001$ ). Novamente, observou-se que dos 15  $\chi^2$  parciais obtidos, apenas um deles (diminuição do número de cópias no gene *PTEN*, que foi maior do que o esperado=9,45) foi responsável por 56% (25,58/45,56) do valor do  $\chi^2$  total.

#### 6.2.1.4 Associações entre as alterações do número de cópias de DNA com dados clínico-patológicos nos tumores TN

Os resultados totais de número de cópias obtidos nas amostras de tumores TN (Tabela 10) foram comparados com os parâmetros clínico-patológicos disponíveis para estas pacientes (tamanho e grau de diferenciação tumoral e presença de metástases em linfonodos regionais).

A Tabela 11 apresenta as médias dos tamanhos dos tumores (cm) das pacientes TN em relação ao número de cópias normais, com aumento e diminuição para cada gene analisado. As diferenças entre as médias dos tamanhos dos tumores observados nestes casos foram avaliadas pela análise da variância. O teste de Bartlett, utilizado para analisar a homogeneidade das variâncias, indicou um valor de  $\chi^2_{14}$  (corr.) = 21,64;  $P > 0,05$ . Conclui-se portanto, através destas análises, que não houve diferenças significativas entre os casos com e sem alterações do número de cópias para cada gene analisado e o tamanho tumoral (Tabela 12).

**Tabela 11.** Médias dos tamanhos de tumores TN (cm) e número de pacientes distribuídas de acordo com as alterações de número cópias dos cinco genes da via PI3K/AKT analisados.

| Genes         | N.º de cópias normal                        | Aumento de cópias | Diminuição de cópias |
|---------------|---------------------------------------------|-------------------|----------------------|
|               | Média do tamanho dos tumores $\pm$ DP e (n) |                   |                      |
| <i>AKT1</i>   | 3,4 $\pm$ 2,1 (19)                          | 2,3 $\pm$ 1,1 (7) | 4,3 $\pm$ 1,8 (4)    |
| <i>AKT2</i>   | 3,2 $\pm$ 1,2 (19)                          | 3,2 $\pm$ 3,1 (8) | 3,7 $\pm$ 2,9 (3)    |
| <i>PIK3CA</i> | 3,6 $\pm$ 2,9 (9)                           | 2,9 $\pm$ 1 (14)  | 3,5 $\pm$ 2,0 (7)    |
| <i>PTEN</i>   | 3,8 $\pm$ 2,3 (14)                          | 2,7 $\pm$ 1,1 (5) | 2,7 $\pm$ 1,7 (11)   |
| <i>FGFR2</i>  | 3,4 $\pm$ 2,1 (19)                          | 2,8 $\pm$ 1,3 (6) | 3,1 $\pm$ 2,3 (5)    |

Legenda: DP: desvio padrão; (n): número de pacientes.

**Tabela 12.** Análise da variância do tamanho dos tumores em relação as alterações de número de cópias dos cinco genes da via PI3K/AKT analisados.

| Varição                        | G.L | S.Q    | $s^2(x)$ | F    | G.L    | P      |
|--------------------------------|-----|--------|----------|------|--------|--------|
| Entre alterações               | 2   | 10,60  | 5,3      | 1,36 | 2;135  | > 0,05 |
| Entre genes                    | 4   | 0,16   | 0,04     | 0,01 | 4;135  | > 0,05 |
| Interação                      | 8   | 15,14  | 1,89     | 0,49 | 8;135  | > 0,05 |
| Entre alterações e entre genes | 14  | 25,90  | 1,85     | 0,47 | 14;135 | > 0,05 |
| Resíduo                        | 135 | 524,88 | 3,89     |      |        |        |

Legenda: G.L: grau de liberdade; S.Q: soma dos quadrados;  $s^2$ : variância; F: razão entre as variâncias entre e dentro. Fonte: a autora.

A comparação das alterações de número de cópias dos genes analisados entre os diferentes graus de diferenciação tumoral (I, II e III) foi realizada utilizando-se o teste do Qui-quadrado. As tabelas 13, 14, 15, 16 e 17 apresentam os resultados para cada um dos genes analisados, *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN* e *FGFR2*, respectivamente, nos quais as frequências dos tumores de grau I e II foram considerados em conjunto e comparadas com as dos de grau III, devido a baixa frequência observada nos primeiros (grau I). As alterações de número de cópias foram comparadas individualmente com as demais possibilidades. Assim foram comparadas amostras com n°. de cópias normal (normal) e amostras com alterações de n°. de cópias (com alteração); amostras com aumento do n°. de cópias (aumento)

Somente na análise do gene *PTEN* foi encontrada diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2_{1}=6,04$ ;  $P < 0,05$ ). Esta diferença foi devida a maior frequência de diminuição do número de cópias deste gene nos tumores de grau III quando comparada com a somatória das pacientes TN com tumores de graus I e II, representando 37% do valor do  $\chi^2$  total (2,21/6,04) (Tabela 16).

**Tabela 13.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT1* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 2                              | 0             | 0                              | 2           | 0                              | 2              |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 19                             | 5             | 3                              | 21          | 2                              | 22             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 11                             | 8             | 6                              | 13          | 2                              | 17             |
| $\chi^2_1 = 2,78$ ; $P > 0,05$ |               | $\chi^2_1 = 2,75$ ; $P > 0,05$ |             | $\chi^2_1 = 0,11$ ; $P > 0,70$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 14.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT2* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 2                              | 0             | 0                              | 2           | 0                              | 2              |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 13                             | 8             | 6                              | 15          | 2                              | 19             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 11                             | 8             | 6                              | 13          | 2                              | 17             |
| $\chi^2_1 = 0,24$ ; $P > 0,50$ |               | $\chi^2_1 = 0,15$ ; $P > 0,50$ |             | $\chi^2_1 = 0,08$ ; $P > 0,70$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 15.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PIK3CA* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 1                              | 1             | 1                              | 1           | 0                              | 2              |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 12                             | 8             | 12                             | 10          | 2                              | 20             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 7                              | 11            | 7                              | 11          | 4                              | 14             |
| $\chi^2_2 = 1,60$ ; $P > 0,20$ |               | $\chi^2_2 = 0,97$ ; $P > 0,30$ |             | $\chi^2_2 = 1,61$ ; $P > 0,20$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 16.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PTEN* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes                       |               |                              |             |                                |                |
|----------------------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                                       | Com Alteração | Aumento                      | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 2                                            | 0             | 0                            | 2           | 0                              | 2              |
| Grau II<br>Nº pacientes                      |               |                              |             |                                |                |
| Normal                                       | Com Alteração | Aumento                      | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 9                                            | 9             | 6                            | 12          | 3                              | 15             |
| Grau III<br>Nº pacientes                     |               |                              |             |                                |                |
| Normal                                       | Com Alteração | Aumento                      | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 5                                            | 12            | 3                            | 14          | 9                              | 8              |
| $\chi^2_1 = 2,45$ ; $P > 0,10$ Com Alteração |               | $\chi^2_1 = 0,75$ $P > 0,30$ |             | $\chi^2_1 = 6,04$ ; $P < 0,05$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 17.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *FGFR2* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 1                              | 1             | 1                              | 1           | 0                              | 2              |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 16                             | 6             | 4                              | 18          | 2                              | 20             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 8                              | 10            | 7                              | 11          | 3                              | 15             |
| $\chi^2_1 = 2,98$ ; $P > 0,05$ |               | $\chi^2_1 = 1,64$ ; $P > 0,20$ |             | $\chi^2_1 = 0,68$ ; $P > 0,30$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

Nos resultados das análises entre a presença e ausência de metástases nos linfonodos axilares e as alterações de número de cópias dos genes *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN* e *FGFR2* não se observou diferenças estatisticamente significativas. Estes resultados estão apresentados nas tabelas 18, 19, 20, 21 e 22.

**Tabela 18.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT1* em relação a presença/ausência de metástases nos linfonodos axilares.

| Presença de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
|-------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 17                                                    | 8             | 5                              | 20          | 3                              | 22             |
| Ausência de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 14                                                    | 5             | 3                              | 16          | 2                              | 17             |
| $\chi^2_1 = 0,17$ ; $P > 0,50$                        |               | $\chi^2_1 = 0,13$ ; $P > 0,72$ |             | $\chi^2_1 = 0,02$ ; $P > 0,80$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 19.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT2* em relação a presença/ausência de metástases nos linfonodos axilares.

| Presença de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
|-------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 13                                                    | 8             | 7                              | 14          | 1                              | 20             |
| Ausência de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 13                                                    | 4             | 2                              | 15          | 2                              | 15             |
| $\chi^2_1 = 0,92$ ; $P > 0,30$                        |               | $\chi^2_1 = 2,42$ ; $P > 0,10$ |             | $\chi^2_1 = 0,63$ ; $P > 0,30$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 20.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PIK3CA* em relação a presença/ausência de metástases nos linfonodos axilares.

| Presença de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
|-------------------------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 13                                                    | 11            | 8                              | 16          | 3                              | 21             |
| Ausência de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 7                                                     | 10            | 7                              | 10          | 3                              | 14             |
| $\chi^2_1 = 0,67$ ; $P > 0,30$                        |               | $\chi^2_1 = 0,26$ ; $P > 0,50$ |             | $\chi^2_1 = 0,21$ ; $P > 0,50$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 21.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PTEN* em relação a presença/ausência de metástases nos linfonodos axilares.

| Presença de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                              |             |                              |                |
|-------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|------------------------------|----------------|
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                      | Não Aumento | Diminuição                   | Não Diminuição |
| 8                                                     | 13            | 4                            | 17          | 9                            | 12             |
| Ausência de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                              |             |                              |                |
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                      | Não Aumento | Diminuição                   | Não Diminuição |
| 8                                                     | 6             | 2                            | 12          | 4                            | 10             |
| $\chi^2 = 1,23$ ; $P > 0,20$                          |               | $\chi^2 = 0,13$ ; $P > 0,70$ |             | $\chi^2 = 0,73$ ; $P > 0,30$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 22.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PTEN* em relação a presença/ausência de metástases nos linfonodos axilares.

| Presença de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                              |             |                              |                |
|-------------------------------------------------------|---------------|------------------------------|-------------|------------------------------|----------------|
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                      | Não Aumento | Diminuição                   | Não Diminuição |
| 15                                                    | 8             | 6                            | 17          | 2                            | 21             |
| Ausência de metástases nos linfonodos<br>Nº pacientes |               |                              |             |                              |                |
| Normal                                                | Com Alteração | Aumento                      | Não Aumento | Diminuição                   | Não Diminuição |
| 8                                                     | 10            | 8                            | 10          | 2                            | 16             |
| $\chi^2 = 1,77$ ; $P = 0,10$                          |               | $\chi^2 = 1,50$ ; $P > 0,20$ |             | $\chi^2 = 0,07$ ; $P > 0,70$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

### 6.2.3 Tumores Não Triplo Negativos (N-TN) – Amostras da África do Sul

#### 6.2.3.1. Análises pelo método de PCR em tempo real

Neste grupo amostral de tumores do subtipo N-TN foi somente realizada a avaliação do número de cópias de DNA pelo método de PCR em tempo real. Os resultados das análises das 65 amostras de DNA estão apresentados na Tabela 23 e nas Figura 19, 20, 21, 22 e 23, para os genes *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN* e *FGFR2*, respectivamente.

O número de amostras N-TN analisadas por este método variou de acordo com o gene analisado: o gene *PTEN* foi analisado em um maior número de amostras (60 casos), seguido pelos genes *AKT1* (58 casos), *AKT2* (58 casos), *PIK3CA* (57 casos) e *FGFR2* (44 casos). Dentre os genes analisados, o gene *PTEN* (58,3% dos casos), foi observado alterado com maior frequência, seguido pelos genes *PIK3CA* (56,1%) *AKT2* (44,8%), *AKT1* (41,4%) e *FGFR2* 36,4%).

Como nos tumores TN, os casos com números de cópias normais, aumentadas e diminuídas não se distribuíram igualmente nos cinco genes analisados ( $\chi^2_{8}=28,27$ ;  $P<0,001$ ). Observou-se que dos 15  $\chi^2$  parciais obtidos, novamente a diminuição do número de cópias no gene *PTEN* (que foi maior do que o esperado= 14,5) foi a principal responsável pela diferença observada ( $10,75/28,27= 38\%$ ).

**Tabela 23.** Resultados das análises dos cinco genes da via PI3K/AKT analisados pelo método de PCR em tempo real em 65 amostras de tumores mamários N-TN.

| Genes         | N.º de cópias normal | Aumento de cópias | Diminuição de cópias |
|---------------|----------------------|-------------------|----------------------|
|               | Nº pacientes (%)     | Nº pacientes (%)  | Nº pacientes (%)     |
| <i>AKT1</i>   | 34 (58,6)            | 14 (24,1)         | 10 (17,3)            |
| <i>AKT2</i>   | 32 (55,2)            | 14 (24,2)         | 12 (20,6)            |
| <i>PIK3CA</i> | 25 (43,9)            | 23 (40,3)         | 9 (15,8)             |
| <i>PTEN</i>   | 25 (41,7)            | 8 (13,3)          | 27 (45)              |
| <i>FGFR2</i>  | 28 (63,6)            | 7 (15,9)          | 9 (20,5)             |

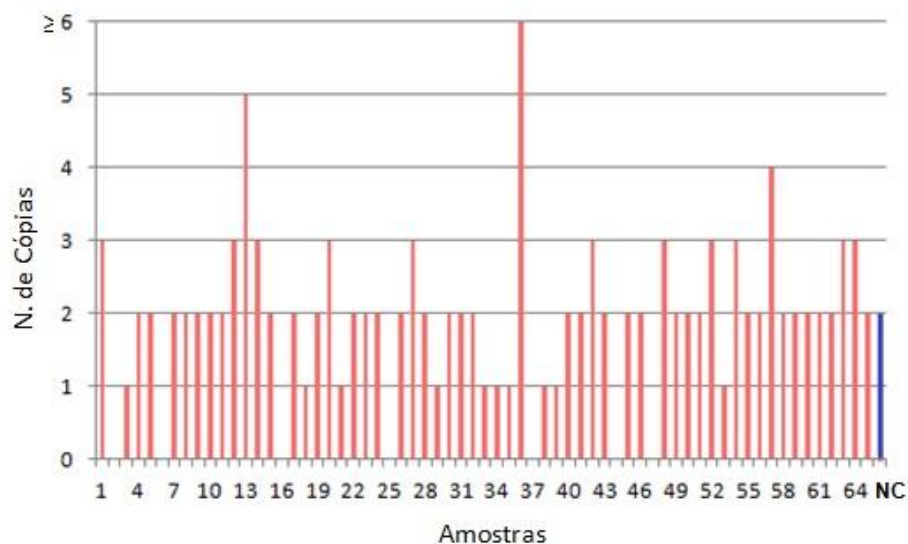


**Figura 19. Gene *AKT1* (N-TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias do gene obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em azul): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

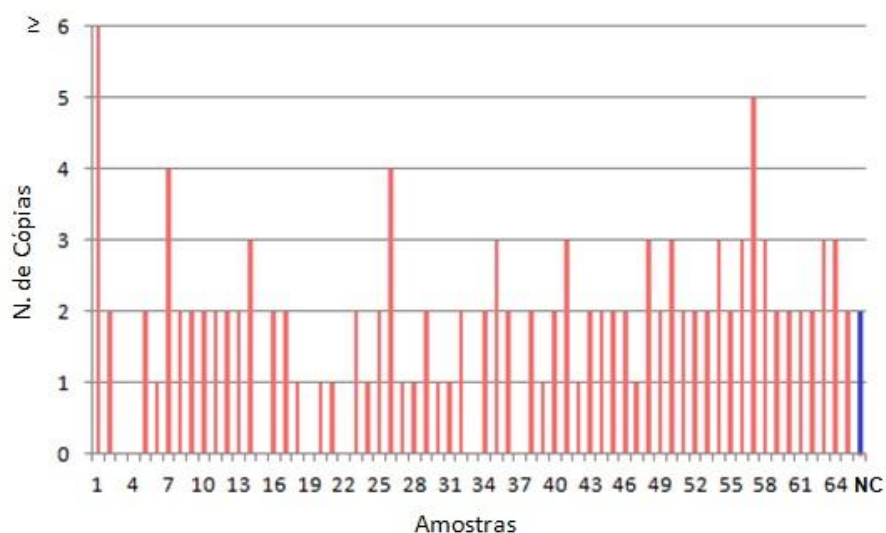


**Figura 20. Gene *AKT2* (N-TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em azul): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

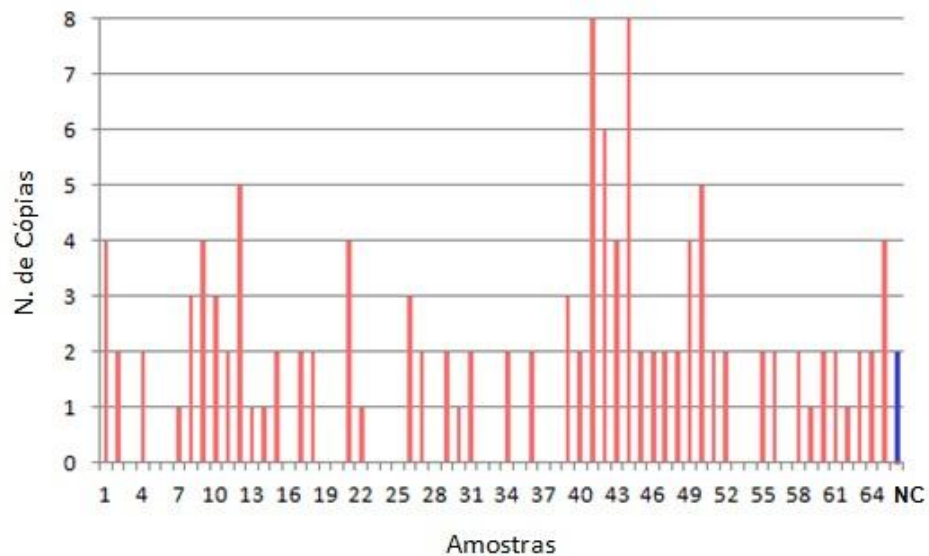


**Figura 21. Gene *PIK3CA* (N-TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em azul): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

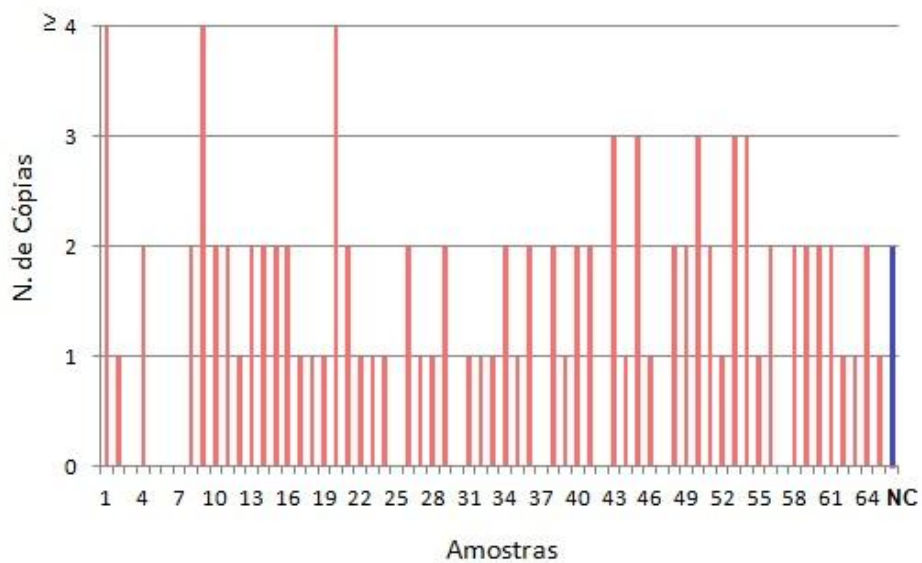


**Figura 22. Gene *PTEN* (N-TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em azul): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

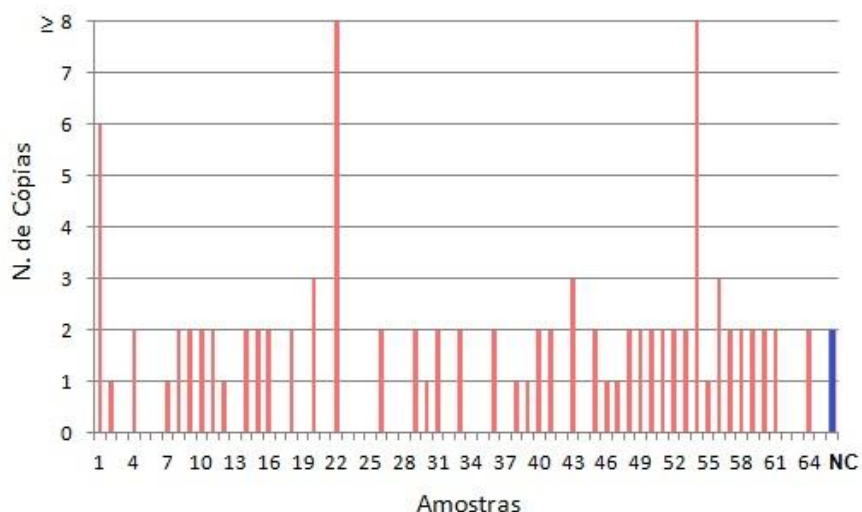


**Figura 23. Gene *FGFR2* (N-TN).** Gráfico dos resultados de alterações de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real. NC (em azul): amostra controle normal com duas cópias do gene. Fonte: a autora.

#### 6.2.3.4 Associações entre as alterações do número de cópias de DNA com dados clínico-patológicos nos tumores N-TN

Os resultados de número de cópias obtidos pelo método de PCR em tempo real nas amostras de DNA de tumores N-TN (Tabela 23) foram comparados com os parâmetros clínico-patológicos disponíveis para essas pacientes (tamanho e grau de diferenciação tumoral). A Tabela 24 apresenta as médias dos tamanhos tumorais (cm) das pacientes com tumores N-TN em relação ao número de cópias normais e alteradas (com aumento e diminuição para cada gene analisado).

**Tabela 24.** Médias dos tamanhos de tumores N-TN (cm) e número de pacientes distribuídas de acordo com as alterações de número cópias dos genes da via PI3K/AKT analisados.

| Genes         | N.º de cópias normal                        | Aumento de cópias  | Diminuição de cópias |
|---------------|---------------------------------------------|--------------------|----------------------|
|               | Média do tamanho dos tumores $\pm$ DP e (n) |                    |                      |
| <i>AKT1</i>   | $3,6 \pm 2,1$ (29)                          | $2,7 \pm 1,3$ (14) | $3,3 \pm 0,9$ (9)    |
| <i>AKT2</i>   | $3,3 \pm 0,9$ (28)                          | $3,9 \pm 3,2$ (13) | $3,0 \pm 1,2$ (12)   |
| <i>PIK3CA</i> | $3,1 \pm 1,0$ (22)                          | $3,6 \pm 2,5$ (21) | $3,4 \pm 1,3$ (8)    |
| <i>PTEN</i>   | $3,7 \pm 1,0$ (22)                          | $3,9 \pm 3,4$ (7)  | $3,0 \pm 1,1$ (25)   |
| <i>FGFR2</i>  | $4,0 \pm 2,2$ (25)                          | $2,2 \pm 1,0$ (6)  | $3,1 \pm 0,9$ (7)    |

Legenda: DP: desvio padrão; (n): número de pacientes.

Com a finalidade de verificar se as diferenças entre as médias dos tamanhos dos tumores observados nos casos com número de cópias normais e com alterações e ainda nos cinco genes analisados, poderiam ser analisadas pela análise da variância, aplicou-se aos dados da tabela 24 o teste de homogeneidade das variâncias de Bertlett que apresentou um valor de  $\chi^2_{14(\text{corr.})} = 89,32; P < 0,001$ , indicando que não há homogeneidade das variâncias dos dados amostrais, o que estatisticamente inviabiliza a aplicação da análise da variância. No entanto, pode-se constatar que as médias dos tamanhos dos tumores com números de cópias normal, com aumento e com diminuição nos cinco genes foram semelhantes (3,56, 3,26 e 3,16, respectivamente).

A comparação das alterações de número de cópias dos genes analisados entre os diferentes graus de diferenciação tumoral (I, II e III) das pacientes deste grupo amostral foi realizada utilizando-se o teste do Qui-quadrado. Nas tabelas 25, 26, 27, 28 e 29 estão apresentados os resultados para cada um dos genes analisados, *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN* e *FGFR2*, respectivamente. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em nenhuma das comparações realizadas.

**Tabela 25.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT1* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 7                              | 4             | 3                              | 8           | 1                              | 10             |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 15                             | 10            | 7                              | 18          | 5                              | 13             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 9                              | 9             | 4                              | 14          | 5                              | 13             |
| $\chi^2_2 = 0,65$ ; $P > 0,70$ |               | $\chi^2_2 = 0,20$ ; $P > 0,90$ |             | $\chi^2_2 = 1,64$ ; $P > 0,30$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do nº. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do nº. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do nº. de cópias.

**Tabela 26.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT2* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 4                              | 8             | 4                              | 8           | 4                              | 8              |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 19                             | 8             | 4                              | 23          | 4                              | 23             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 7                              | 9             | 5                              | 11          | 4                              | 12             |
| $\chi^2_2 = 5,66$ ; $P > 0,05$ |               | $\chi^2_2 = 2,30$ ; $P > 0,30$ |             | $\chi^2_2 = 1,80$ ; $P > 0,30$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 27.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PIK3CA* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 7                              | 5             | 4                              | 8           | 1                              | 11             |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 11                             | 14            | 12                             | 13          | 2                              | 23             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 4                              | 12            | 7                              | 9           | 5                              | 11             |
| $\chi^2_2 = 3,26$ ; $P > 0,10$ |               | $\chi^2_2 = 0,71$ ; $P > 0,70$ |             | $\chi^2_2 = 4,67$ ; $P > 0,05$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 28.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PTEN* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |               |                                |             |                                |                |
|--------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 5                              | 8             | 2                              | 11          | 6                              | 7              |
| Grau II<br>Nº pacientes        |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 11                             | 16            | 3                              | 24          | 13                             | 14             |
| Grau III<br>Nº pacientes       |               |                                |             |                                |                |
| Normal                         | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 8                              | 8             | 3                              | 13          | 5                              | 11             |
| $\chi^2_2 = 0,48$ ; $P > 0,70$ |               | $\chi^2_2 = 0,49$ ; $P > 0,70$ |             | $\chi^2_2 = 1,25$ ; $P > 0,50$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 29.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *FGFR2* e o grau de diferenciação tumoral.

| Grau I<br>Nº pacientes         |          |                                |           |                                |              |
|--------------------------------|----------|--------------------------------|-----------|--------------------------------|--------------|
| Normal                         | Alterado | Ganho                          | Não Ganho | Deletado                       | Não Deletado |
| 6                              | 5        | 3                              | 7         | 2                              | 9            |
| Grau II<br>Nº pacientes        |          |                                |           |                                |              |
| Normal                         | Alterado | Ganho                          | Não Ganho | Deletado                       | Não Deletado |
| 13                             | 4        | 2                              | 15        | 2                              | 15           |
| Grau III<br>Nº pacientes       |          |                                |           |                                |              |
| Normal                         | Alterado | Ganho                          | Não Ganho | Deletado                       | Não Deletado |
| 8                              | 5        | 2                              | 11        | 3                              | 10           |
| $\chi^2_2 = 1,58$ ; $P > 0,45$ |          | $\chi^2_2 = 1,51$ ; $P > 0,50$ |           | $\chi^2_2 = 0,68$ ; $P > 0,70$ |              |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

#### 6.2.4 Comparações do número de cópias de DNA entre os tumores TN e N-TN

Os resultados totais de número de cópias nos cinco genes analisados foram comparados entre os grupos de tumores mamários TN e N-TN conforme os dados das Tabelas 10 (obtidos por PCR em tempo real e FISH) e 23 (obtidos por PCR em tempo real). Nas tabelas 30, 31, 32, 33 e 34 estão apresentados para os dois grupos amostrais, os resultados para os genes *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN* e *FGFR2* respectivamente.

Somente na análise do número de cópias do gene *FGFR2* foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os dois grupos amostrais. Esta diferença foi devida a alta frequência do aumento do número de cópias observada para este gene nas amostras TN quando comparado as amostras N-TN ( $\chi^2_1 = 4,4$  ;  $P < 0,05$ ) (Tabela 34).

**Tabela 30.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT1* nos grupos de amostras TN e N-TN.

| Triplo Negativo<br>Nº pacientes     |               |                                |             |                                |                |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 36                                  | 16            | 9                              | 43          | 7                              | 45             |
| Não Triplo Negativo<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 34                                  | 24            | 14                             | 44          | 10                             | 48             |
| $\chi^2_1 = 1,17$ ; $P > 0,20$      |               | $\chi^2_1 = 0,77$ ; $P > 0,40$ |             | $\chi^2_1 = 0,30$ ; $P > 0,50$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 31.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *AKT2* nos grupos de amostras TN e N-TN.

| Triplo Negativo<br>Nº pacientes     |               |                                |             |                                |                |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 30                                  | 17            | 12                             | 35          | 5                              | 42             |
| Não Triplo Negativo<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 32                                  | 26            | 14                             | 44          | 12                             | 46             |
| $\chi^2_1 = 0,81$ ; $P > 0,30$      |               | $\chi^2_1 = 0,03$ ; $P > 0,80$ |             | $\chi^2_1 = 1,93$ ; $P > 0,10$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 32.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PIK3CA* nos grupos de amostras TN e N-TN.

| Triplo Negativo<br>Nº pacientes     |               |                                |             |                                |                |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 25                                  | 24            | 16                             | 33          | 8                              | 41             |
| Não Triplo Negativo<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 25                                  | 32            | 23                             | 34          | 9                              | 48             |
| $\chi^2_1 = 0,54$ ; $P > 0,30$      |               | $\chi^2_1 = 0,67$ ; $P > 0,30$ |             | $\chi^2_1 = 0,01$ ; $P > 0,90$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 33.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *PTEN* nos grupos de amostras TN e N-TN.

| Triplo Negativo<br>Nº pacientes     |               |                                |             |                                |                |
|-------------------------------------|---------------|--------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 14                                  | 30            | 5                              | 39          | 25                             | 19             |
| Não Triplo Negativo<br>Nº pacientes |               |                                |             |                                |                |
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                        | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 25                                  | 35            | 8                              | 52          | 27                             | 33             |
| $\chi^2_1 = 1,05$ ; $P > 0,30$      |               | $\chi^2_1 = 0,09$ ; $P > 0,70$ |             | $\chi^2_1 = 1,42$ ; $P > 0,10$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

**Tabela 34.** Análise pelo teste de Qui-quadrado entre as alterações de número de cópias do gene *FGFR2* nos grupos de amostras TN e N-TN.

| Triplo Negativo<br>Nº pacientes     |               |                               |             |                                |                |
|-------------------------------------|---------------|-------------------------------|-------------|--------------------------------|----------------|
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                       | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 27                                  | 23            | 16                            | 34          | 7                              | 43             |
| Não Triplo Negativo<br>Nº pacientes |               |                               |             |                                |                |
| Normal                              | Com Alteração | Aumento                       | Não Aumento | Diminuição                     | Não Diminuição |
| 29                                  | 15            | 6                             | 38          | 9                              | 35             |
| $\chi^2_1 = 1,37$ ; $P > 0,20$      |               | $\chi^2_1 = 4,4$ ; $P < 0,05$ |             | $\chi^2_1 = 0,69$ ; $P > 0,30$ |                |

Legenda: Com alteração: amostras com aumento e diminuição do n°. de cópias; Não aumento: amostras normais e com diminuição do n°. de cópias; não diminuição: amostras normais e com aumento do n°. de cópias.

## 7. DISCUSSÃO

Tumores de mama do tipo triplo negativo (TN) constituem um grupo tumoral relevante por apresentarem comportamento clínico agressivo e conferirem um prognóstico desfavorável. Pacientes com esses tumores possuem baixa ou nenhuma expressão dos receptores de estrogênio, progesterona e HER2, não respondendo satisfatoriamente as terapias alvos direcionadas a estes marcadores, tais como a terapia hormonal e imunoterapia (IWASE & YAMAMOTO, 2008; KOBAYASHI, 2008). Como resultado, essas pacientes apresentam uma taxa de sobrevida menor do que aquelas com outros tipos de câncer de mama (BAUER *et al.*, 2007), apresentando alta frequência de recorrência, frequentemente 1 a 3 anos após o diagnóstico (LUND *et al.*, 2008). Nos últimos anos os tumores TN têm sido extensivamente estudados para a identificação de marcadores moleculares que possam ser utilizados para o desenvolvimento de agentes terapêuticos efetivos.

A via de sinalização celular PI3K/AKT regula funções biológicas importantes como angiogênese, proliferação, sobrevivência e migração celular (MC AULIFFE *et al.*, 2010). Alterações nesta via têm sido observadas com frequência em câncer de mama (ALESKANDARANY *et al.*, 2009, ANDERSEN *et al.*, 2010; KIRKEGAARD *et al.*, 2010; REEDER-HAYES *et al.*, 2010; JONKERS, 2012; MARTINS *et al.*, 2012).

Em tumores triplo negativos são observados altos níveis de ativação dos componentes da via PI3K/AKT quando comparados com outros subtipos tumorais (MOULDER, 2010). Estudos também sugerem que alterações nessa via de sinalização influenciam a agressividade biológica dos tumores TN (ANDERSEN *et al.*, 2010; REEDER-HAYES *et al.*, 2010). Nesse sentido, vários agentes químicos com função inibidora de componentes da via PI3K/AKT estão atualmente sendo avaliados em diversas fases de ensaios clínicos (REEDER-HAYES *et al.*, 2010). A maioria destes ensaios têm investigado o uso potencial de inibidores para o fator de crescimento epidermal (EGFR) (BURNES *et al.*, 2010). Recentes estudos também têm testado outros agentes inibidores como anti-angiogênicos ou anti-mitóticos isoladamente ou combinados a outros agentes quimioterápicos (BILICI *et al.* 2012; GRIFFITHS *et al.*, 2012).

Neste estudo as informações clínico-patológicas de 54 pacientes portadores de tumores TN provenientes do Sul do Brasil foram comparadas com os dados de 65 pacientes N-TN da África do Sul. Na análise do grau de diferenciação tumoral foi observada uma alta frequência de pacientes TN com grau tumoral III e baixa frequência de pacientes com grau I, resultando em uma diferença estatisticamente significativa ( $\chi^2_2 = 8,12; P < 0,02$ ) na comparação entre os dois grupos de pacientes.

Para determinar se esta diferença estava relacionada ao grupo étnico, os dados das mesmas pacientes TN provenientes do sul do Brasil foram comparadas com os de uma amostra de 189 pacientes N-TN provenientes da mesma região do país e mesmo grupo étnico (predominantemente de origem caucasóide). Os resultados dessa análise também demonstraram uma diferença estatisticamente significativa entre o grau tumoral de pacientes com tumor TN e N-TN ( $\chi^2_2 = 13,7 P < 0,01$ ). Esses resultados estão de acordo com outros dados da literatura que demonstram que o fenótipo triplo negativo está associado a características de pior prognóstico quando comparado a outros subtipos tumorais mamários (STARK *et al.*, 2008) Um estudo realizado pelo sistema de saúde americano em uma série de 1.263 mulheres diagnosticadas com câncer de mama invasivo demonstrou que pacientes que apresentam grau histológico avançado (III) possuem um risco 31 vezes maior de serem portadoras de tumores de mama do tipo triplo negativo comparado a pacientes com baixo grau (I) histológico (STARK *et al.*, 2008).

A idade ao diagnóstico também foi comparada entre as pacientes TN (sul do Brasil) e N-TN (sul do Brasil e África do Sul) (Tabelas 4 e 5), não sendo encontradas diferenças estatisticamente significativas nessas análises. Nossos resultados não são concordantes com a análise de dados epidemiológicos de outras populações da literatura, que demonstram que pacientes com tumores TN tendem a ser mais jovens do que as com outros subtipos tumorais (BAUER *et al.*, 2007; IHEMELANDU *et al.*, 2007). Em um registro proveniente do estado da Califórnia nos EUA com 51.074 pacientes com câncer de mama foi demonstrado que 63% das pacientes portadoras de tumores triplo negativos são diagnosticadas antes dos 60 anos de idade (BAUER *et al.*,

2007). Em um estudo da Universidade de Howard (Washington, DC) foi observado que no grupo de pacientes com idade menor de 35 anos, 57,1% apresentavam tumores do subtipo basal e apenas 25% do subtipo luminal A (IHEMELANDU *et al.*, 2007).

Análises epidemiológicas entre pacientes de diferentes grupos étnicos é importante na identificação de fatores prognósticos relevantes e específicos para cada população. Neste estudo, a comparação dos dados das pacientes com tumores do tipo N-TN do sul do Brasil e da África do Sul demonstrou que não há diferenças estatisticamente significativas entre as características clinico-patológicas avaliadas das pacientes nessas duas populações no que se refere a este subtipo tumoral. A ausência neste estudo de pacientes provenientes da África do Sul com tumores TN impossibilitou a análise desse subtipo tumoral entre as duas populações.

A população da África do Sul é dividida basicamente em 4 grupos: negros (75%), brancos (13%), população mista (9%) - descendentes de brancos, negros e indianos - e indianos (3%). Estudos epidemiológicos demonstraram que as mulheres negras da África do Sul têm uma incidência menor de câncer de mama quando comparado com os demais grupos étnicos (VOROBIOF, SITAS & GABRIEL; 2001). Fatores epidemiológicos únicos desse grupo como menarca tardia, idade jovem da primeira gestação, alto número de filhos, e longo período de lactação parecem ser as causas da menor incidência de câncer de mama nessas mulheres (WALKER *et al.*, 1994; VOROBIOF, SITAS & GABRIEL; 2001). No entanto, apesar de menos incidente, o câncer de mama nas mulheres negras da África do Sul está relacionado com prognóstico clínico agressivo, geralmente associado com idade mais jovem, estágios tumorais avançados (III ou IV) e com metástase à distância (VOROBIOF, SITAS & GABRIEL; 2001; ANTOINE *et al.*, 2011). Os estudos com essa população são escassos na literatura, porém as estimativas são de que cerca de metade dos tumores nas mulheres negras na África Subsaariana são do tipo triplo negativos (ANTOINE *et al.*, 2011). Assim, a amostra de pacientes deste estudo, composta exclusivamente de tumores não-triplo negativos, apresenta uma baixa incidência de mulheres negras (apenas 9,3%), o que pode ser resultado dos fatores acima citados.

### *Alterações do número de cópias de genes da via PI3K/AKT*

Neste estudo foram analisadas as alterações de número de cópias de cinco genes da via PI3K/AKT: *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *PTEN* e *FGFR2* com o objetivo principal de identificar se estas poderiam estar relacionadas significativamente com este subtipo tumoral e com fatores prognósticos das pacientes, tais como tamanho e grau tumoral e presença de metástases nos linfonodos axilares.

Alterações de número de cópias foram observadas em todos os genes analisados neste estudo nos dois subtipos tumorais (TN e N-TN). Nos tumores TN as alterações mais frequentemente observadas envolveram os genes *PTEN* (68,2% dos casos), *PIK3CA* (49%), *FGFR2* (46%), *AKT2* (36,2%) e *AKT1* (30,8%). Nos tumores do tipo N-TN, as alterações mais frequentes envolveram os genes *PTEN* (58,3%), *PIK3CA* (56,1%), *AKT2* (44,8%), *AKT1* (41,4%) e *FGFR2* (36,4%). Com exceção do gene *FGFR2*, que apresentou uma frequência de aumento de número de cópias significativamente maior nos tumores TN ( $\chi^2_1 = 4,4$ ;  $P < 0,05$ ; Tabela 34), os demais genes apresentaram alterações com frequências que não diferiram significativamente entre os subtipos tumorais.

As análises das alterações de número de cópias nos cinco genes estudados demonstrou que a diminuição de cópias do gene *PTEN* é a alteração mais frequente tanto nos tumores TN (56,8%) quanto nos N-TN (45%) como demonstrado pelos valores de qui-quadrado altamente significativos:  $\chi^2_8 = 45,56$ ;  $P < 0,001$  e  $\chi^2_8 = 28,28$ ;  $P < 0,001$ , respectivamente (Tabelas 9 e 22). Como citado acima, a comparação das frequências de perdas de *PTEN* entre os tumores TN e N-TN não foi observada com diferenças estatisticamente significativas ( $\chi^2 = 1,42$ ;  $P > 0,1$ ) (Tabela 33) sugerindo que alterações nesse gene são relevantes na etiologia de ambos subtipos tumorais, independente da positividade para os marcadores moleculares de RE, RP e HER2.

Alterações do número de cópias do gene *PTEN*, assim como no nosso estudo, são frequentemente descritas em câncer de mama (SAAL *et al.*, 2005; PEREZ-TENORIOET *et al.*, 2007; LOPES-KNOWLES *et al.*, 2009). A perda de pelo menos

uma cópia deste gene tem sido demonstrada como ocorrendo em aproximadamente 50% dos tumores mamários (MYERS *et al.*, 1998; PARSONS & SIMPSON, 2003).

As descrições de mutações monoalélicas e deleções em uma única cópia de *PTEN* reforçam o modelo da haplo-insuficiência deste gene (DEPOWSKI *et al.*, 2001; WOLFF *et al.*, 2007), que descreve que a perda ou mutação de um único alelo é suficiente para afetar a gênese ou progressão do câncer.

Outros modelos de haplo-insuficiência são conhecidos em tumores mamários, como por exemplo para o gene *BRCA1* (BUCHHOLTZ *et al.*, 2002; CAVALLI *et al.*, 2004), envolvido frequentemente com os tumores do subtipo basal e TN (SANTAROSA *et al.*, 2012).

Dois trabalhos recentes e independentes demonstraram que em tumores basais, a perda do gene *PTEN* precede a perda alélica do gene *BRCA1* (JONKERS, 2012; MARTINS *et al.*, 2012). Além disso foi observado que linhagens celulares de tumores TN associadas a mutações no gene *BRCA1* (HCC-1937, MDA-MB-436, SUM-1315, and SUM-149), também apresentam perda do gene *PTEN* (ELSTROLD *et al.*, 2006; MARTINS *et al.*, 2012). A alta frequência de perda nestes casos, foi sugerida como sendo causa do alto grau de instabilidade genômica característica destes tumores (SAAL *et al.*, 2008). Nas amostras de tumores mamários analisadas neste estudo, não foram obtidas informações sobre mutações do gene *BRCA1* ou histórico familiar de câncer das pacientes, não sendo possível realizar a correlação entre estes dois genes.

Os resultados das análises dos parâmetros clínico-patológicos indicaram que a perda de *PTEN* está associada ao grau tumoral avançado nos tumores TN. Foi observada alta de deleções nesse gene (53%) em pacientes com tumores de grau III, quando comparado as pacientes com tumores de grau I (0%) e II (17%) ( $\chi^2_1=6,04$ ;  $P<0,05$ ; Tabela 14). No grupo N-TN, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre a perda de *PTEN* e o grau de diferenciação tumoral.

Em concordância com os nossos resultados, LOPES-KNOWLES *et al.* (2009) também observaram uma associação positiva entre a perda de *PTEN* e alto grau histológico em tumores mamários do tipo basal, incluindo triplo negativos. No estudo destes autores, no entanto, esta perda foi significativamente associada ao tamanho do tumor (>2,0 cm). Esta associação não foi observada no nosso estudo, tanto para os

tumores do grupo TN como para os tumores N-TN. Além disso, em concordância com o estudo de LOPES-KNOWLES *et al.* (2009), não observamos associações significativas entre a perda de *PTEN* e a presença de metástases nos linfonodos axilares.

Estudos de análise protéica demonstram que baixos níveis da proteína PTEN ocorrem em cerca de 30 a 50% das pacientes com câncer de mama (DEPOWSKI *et al.*, 2001; PANIGRAHI *et al.*, 2004; PANDOLFI, 2004; SAAL *et al.*, 2005). Além disso, a perda ou baixa expressão dessa proteína também foi relacionada com prognóstico clínico agressivo, como a perda de receptores hormonais, metástase em linfonodos, alto grau histológico e óbito associado a doença (PERREN *et al.*, 1999; BOSE *et al.*, 1998; DEPOWSKI *et al.*, 2001; TSUTSUI *et al.*, 2005; SHEN *et al.*, 2007).

HU e colaboradores (2009) observaram a perda da proteína PTEN em 59% dos tumores triplo negativos e em apenas 17% dos tumores RE e RP positivos. Baixos níveis de expressão de *PTEN* também foram observados em tumores mamários do subtipo basal quando comparados aos tumores luminais (HU *et al.*, 2009; NETO *et al.*, 2011).

Neste estudo o aumento do número de cópias do gene *PIK3CA* também foi observado com altas frequências nas amostras TN (32,6%) e N-TN (40,3%) e similarmente ao gene *PTEN*, não diferiu significativamente entre esses dois subtipos tumorais ( $\chi^2_1 = 0,67$ ;  $P > 0,30$ ; Tabela 32). Essas frequências de aumento de número de cópias de *PIK3CA* observadas no nosso estudo foram maiores do que as observadas em estudos prévios em tumores mamários, 8,7% a 14% dos casos (WU *et al.*, 2005; LÓPEZ-KNOWLES *et al.*, 2010). No entanto, nesses estudos, o número de tumores triplo negativos investigado foi limitado.

No estudo de LOPEZ-KNOWLES *et al.* (2009) apenas 7% dos tumores triplo negativos basais (ER-, PR-, HER2-, CK5/6+ e/ou EGFR+) analisados apresentaram alterações de número de cópias do gene *PIK3CA*. As mutações observadas foram as mais comumente descritas na literatura, envolvendo os exons 9 e 20 deste gene (WU *et al.*, 2005; SHAH *et al.*, 2012).

CISKOVA *et al.*, (2012) encontraram uma frequência de aumento de número de cópias desse gene em 12,5% dos tumores triplo negativos e 41,1% dos tumores RE e RP positivos e HER2 negativos.

No estudo de GONZALES-ANGULO *et al.* (2012), o aumento do número de cópias de *PIK3CA* foi observado em vários subtipos tumorais mamários, no entanto essas alterações foram significativamente associadas ao subtipo triplo negativo.

No presente estudo as alterações de número de cópias de *PIK3CA* não foram associadas a nenhum dos parâmetros clínico-patológicos avaliados (tamanho e grau tumoral, presença de metástases nos linfonodos axilares), tanto em tumores TN quanto em tumores N-TN. Estudos na literatura no entanto, têm relacionado alterações do gene *PIK3CA* com fatores prognósticos desfavoráveis, tais como grande tamanho tumoral, alto grau histológico e recorrência tumoral (LI *et al.*, 2006; LERMA *et al.*, 2008; LÓPEZ-KNOWLES *et al.*, 2010).

A associação entre as alterações de *PIK3CA* e/ou expressão deste gene com os subtipos tumorais ainda não está bem esclarecida. SAAL *et al.*, (2005) e STEMKE-HALE *et al.* (2008) descreveram uma maior frequência de mutações em *PIK3CA* em tumores RE<sup>+</sup>/RP<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup> (STEMKE-HALE *et al.*, 2008). ALESKANDARANY *et al.* (2010) encontraram associação da proteína PIK3CA com os subtipos basal, classes HER<sup>+</sup> e triplo negativo. No entanto, independente do subtipo tumoral, alterações no gene/proteína PIK3CA parecem estar associadas a tumores de baixa diferenciação celular e comportamento clínico agressivo. Portanto, terapias alvos com agentes causando a inibição deste gene/proteína seria de grande benefício para os pacientes com carcinomas mamários em geral.

Em relação aos genes da família AKT, no nosso estudo observamos aumento e diminuição do número de cópias com frequências semelhantes nos subtipos TN e N-TN, o que foi demonstrado pelos resultados não significativos nas comparações entre os dois grupos tumorais (Tabelas 30 e 31).

Há poucos estudos na literatura analisando as alterações de número de cópias dos genes *AKT1* e *AKT2*. Mutações somáticas nesses genes são raras (SOUNG *et al.*, 2006; BRUGGE *et al.*, 2007) e a maioria dos trabalhos descreve a desregulação na fosforilação das proteínas AKT (YUAN *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2001; KIRKEGAARD *et al.*, 2005; EDWARDS *et al.*, 2006; BRUGGE *et al.*, 2007; BLEEKER *et al.*, 2008; BRAUER ET AL, 2009; LOPEZ-KNOWLES *et al.*, 2009; KANAMORI *et al.*, 2011).

KIRKEGAARD *et al.* (2010) encontraram deleções em *AKT1* e *AKT2* em 4,8% e

21,1% respectivamente, das amostras de tumores de mama RE positivos, enquanto que amplificação foi observada para o gene *AKT1* em apenas 1% dessas amostras. A amplificação do gene *AKT2* foi previamente identificada em tumores mamários, ovarianos e pancreáticos (CHENG *et al.*, 1992; BELLACOSA *et al.*, 1995; CHENG *et al.*, 1996), estando associada nos tumores mamários a um prognóstico desfavorável (CHENG *et al.*, 1992; BELLACOSA *et al.*, 1995).

Alterações nos genes *AKT1* e *AKT2* não foram correlacionadas significativamente no nosso grupo amostral com os parâmetros clínico-patológicos testados. A expressão protéica destas proteínas foram, no entanto, previamente correlacionadas com tumores de alto grau tumoral, RE e RP negativos e HER2 positivos (PANIGRAHI *et al.*, 2004; JANSSEN *et al.*, 2007; TOKUNAGA *et al.*, 2006).

Apesar da alta similaridade entre as sequências e homologia estrutural dos genes *AKT1* e *AKT2*, estudos de análises *in vitro* sugerem que estes genes desempenham funções opostas na migração e invasão de células mamárias (HUTCHINSON *et al.*, 2004). Os resultados desses estudos indicam que apenas a expressão aumentada de *AKT2* poderia contribuir para o fenótipo invasivo e desenvolvimento de metástases. Entre os membros da família AKT, apenas *AKT2* apresenta importância em mediar os efeitos dependentes da via PI3K em células de câncer de mama (HUTCHINSON *et al.*, 2004). DILLON *et al.*, (2009) utilizaram modelos de camundongos transgênicos e também demonstraram as funções opostas destes dois genes: *AKT1* inibindo e *AKT2* promovendo metástases nesses animais.

A via PI3K/AKT também é regulada através dos receptores de fatores de crescimento de fibroblastos (FGFRs) (TENHAGEN *et al.*, 2012). Existem quatro tipos de receptores nesta família: FGFR1, FGFR2, FGFR3 e FGFR4, que são ativados por 18 ligantes extracelulares de expressão tecido específica. Quando ativados, os receptores FGFRs atuam fosforilando proteínas intracelulares entre elas, AKT, RAS (que ativa a via RAS/MAPK) e STAT (ativador transcricional de genes induzidos por interferons).

Membros da família de receptores FGFR são normalmente ativados no processo tumoral devido a amplificação gênica, translocação cromossômica ou mutações do tipo *missense* (KATOUEH KATOUEH *et al.*, 2010). Vários estudos tem descrito a associação

de SNPs e amplificações dos genes que codificam os FGFRs com o câncer de mama (REIS-FILHO *et al.*, 2006; MEYER *et al.*, 2008; ROIDL *et al.*, 2009; TURNER *et al.*, 2010; TURNER & GROSE, 2010; SHARPE *et al.*, 2011). Dentre os genes desta família, a amplificação do gene *FGFR1* é observada em 10% dos tumores mamários (COURJAL *et al.*, 1997). A maior frequência de amplificação desse gene foi associada ao subtipo luminal (tumores RE+) (TURNER *et al.*, 2010).

No presente estudo o aumento do número de cópias do gene *FGFR2* foi observado em 32% dos tumores mamários do tipo TN, e esta frequência foi significativamente maior da observada nos tumores N-TN (13,6%) ( $\chi^2_1 = 4,4$ ;  $P < 0,05$ , Tabela 34). Esses resultados corroboram estudos prévios que associam a amplificação do gene *FGFR2* com o fenótipo triplo negativo e sugerem que este gene atue como importante fator prognóstico e possível alvo terapêutico para esse subgrupo tumoral.

O aumento preferencial do número de cópias deste gene em tumores TN foi também observado por TURNER *et al.*, (2010). Na análise do perfil molecular de 56 tumores triplo negativos através de aCGH e expressão gênica estes autores identificaram 40 genes com expressão aumentada quando amplificados, entre eles o gene *FGFR2*. A amplificação de *FGFR2* foi observada em apenas 4% dos tumores triplo negativos, não sendo observada nos demais subtipos tumorais analisados. SHARPE *et al.* (2011) também observaram que a expressão de *FGFR2* é maior em tumores basais e triplo negativos quando comparados com outros subtipos tumorais. Estes autores analisando linhagens celulares de tumores TN, observaram que estas eram sensíveis a inibidores de FGFR, indicando que esta família de receptores provavelmente está envolvida com a capacidade proliferativa destes tumores. Ensaios clínicos em fases iniciais tem investigado estes agentes para potencial uso terapêutico em pacientes com tumores do tipo TN e basal (KATOUH *et al.*, 2010; TURNER *et al.*, 2010; JAIN *et al.*, 2012).

O receptor FGFR2 foi também demonstrado como associado a tumores mamários com mutações nos genes *BRCA*. No entanto, ao contrário de outros componentes da via PI3K/AKT, a expressão de FGFR2 foi observada preferencialmente aumentada em tumores associados a mutações no gene *BRCA2* em comparação com tumores associados a mutações no gene *BRCA1* (BANE *et al.*, 2009).

Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre o aumento do número de cópias do gene *FGFR2* e os parâmetros clínico-patológicos (tamanho e grau tumoral e presença de metástases nos linfonodos axilares) em ambos os grupos de pacientes, TN e N-TN.

Em resumo, a via de sinalização PI3K/AKT é importante para a maioria das funções celulares, e suas alterações estão envolvidas no processo carcinogênico. Os componentes desta via representam possíveis alvos terapêuticos no tratamento do câncer de mama, incluindo os tumores triplo-negativos. Entre os tratamentos já aprovados e disponíveis incluem-se os inibidores de mTOR para pacientes com deleção no gene *PTEN* (SANTANA-DAVILA & PEREZ, 2010) e inibidores de EGFR para pacientes com amplificação desse gene (TAKANO *et al.*, 2005; MORONI *et al.*, 2005 e HIRSCH *et al.*, 2006). De acordo com a base de dados dos ensaios clínicos regulados pelo governo americano (<http://www.clinicaltrials.gov>; acessado em 25 junho de 2012), inibidores de AKT estão sendo testados em pacientes com mutações no gene *PIK3CA* e perda de *PTEN* (NCT01277757). Outros ensaios clínicos em fase adiantada demonstram bons resultados no uso de inibidores de *FGFR1* e *FGFR2* no tratamento de tumores com amplificações nesses genes (NCT00958971). É importante salientar no entanto, que os resultados de alguns desses ensaios muitas vezes não são satisfatórios, não apresentando benefício à sobrevida livre da doença ou sobrevida geral das pacientes. Este fato, na maioria das vezes, é devido ao alto grau de heterogeneidade das alterações que ocorrem nesta via. Outros fatores incluem a resistência tumoral ao tratamento causada pela ação de outras vias oncogênicas, perda de marcadores de resposta à terapia e a estratificação inadequada das pacientes que participam dos ensaios clínicos (SAAL *et al.*, 2007). Neste sentido, estudos como o presente, que tem como objetivo a identificação e o entendimento dos mecanismos de alteração dos genes da via PI3K/AKT, podem esclarecer e fornecer informações relevantes a esta heterogeneidade observada, contribuindo desta forma para a condução e interpretação destes ensaios clínicos.

## 8. CONCLUSÃO

Neste estudo comprovamos que alterações do número de cópias dos genes *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *FGFR2* e *PTEN*, membros da via de sinalização PI3K/AKT, estão presentes e apresentam relevância nos tumores mamários do subtipo triplo negativo (TN). Essas alterações, assim que validadas em uma nova série de pacientes com tumores TN, podem futuramente representar marcadores moleculares com potencial aplicação para o desenvolvimento de terapias efetivas em pacientes, grupo de pacientes e/ou populações étnico-específicas.

As conclusões específicas desse estudo são:

1. Nas análises epidemiológicas entre tumores do tipo TN e N-TN, foi observada uma alta frequência de pacientes TN com grau tumoral avançado (grau III), independentemente do grupo étnico das pacientes. Não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à idade das pacientes, tamanho do tumor e presença de linfonodos axilares entre os grupos TN e N-TN.
2. Alterações do número de cópias foram observadas para todos os genes da via PI3K/AKT (*AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA*, *FGFR2* e *PTEN*) analisados neste estudo. Essas alterações foram observadas em ambos subtipos tumorais mamários (TN e N-TN) analisados, demonstrando que estas ocorrem independentemente da positividade para os marcadores de RE, RP e HER2.
3. As análises das alterações de número de cópias nos cinco genes estudados demonstrou que a diminuição de cópias de *PTEN* é a alteração mais frequente tanto nos tumores TN quanto nos tumores N-TN. A diminuição estatisticamente significativa do número de cópias deste gene em ambos estes subtipos tumorais são sugestivas que as mesmas são importantes na etiologia dos mesmos. No entanto, as mesmas devem ser confirmadas para que possam ser interpretadas com maior consistência.

4. As frequências de alterações de número de cópias dos genes *AKT1*, *AKT2*, *PIK3CA* e *PTEN* não diferiram significativamente entre os subtipos TN e N-TN. O aumento do número de cópias do gene *FGFR2* foi significativamente maior nas pacientes TN.

5. Nas análises entre as alterações de número de cópias e os parâmetros clínico-patológicos das pacientes apenas a perda de *PTEN* foi significativamente associada ao grau tumoral avançado. Essa associação ocorreu somente nos tumores do subtipo TN.

## 9. REFERÊNCIAS

ALBERTSON, D.G. AND D. PINKEL, Genomic microarrays in human genetic disease and cancer. **Hum Mol Genet**, 2003. 12 Spec No 2: p. R145-52.

ALESKANDARANY MA, RAKHA EA, AHMED MA, POWE DG, PAISH EC, MACMILLAN RD, ELLIS IO, GREEN AR. PIK3CA expression in invasive breast cancer: a biomarker of poor prognosis. **Breast Cancer Res Treat**, v. 122 (1), p. 45-53, 2010.

AL-HAJJ, M.; WICHA, M. S.; BENITOHERNANDEZ, A.; MORRISON, S. J.; CLARKE, M. F. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 7, p. 3983-8, 2003.

ALLRED, D.C.; BROWN, P.; MEDINA, D. The origins of estrogen receptor alpha-positive and estrogen receptor alpha-negative human breast cancer. **Breast cancer research: BCR**. London, v. 6, p. 240–245. 2004

ALTOMARE DA, TESTA JR. Perturbations of the AKT signaling pathway in human cancer. **Oncogene**, v. 24, p. 7455-64, 2005.

ANDRÉ, F.; DOMONT, J.; DELALOGUE, S. What can breast cancer molecular sub - classification add to conventional diagnostic tools? Review. **European Society for Medical Oncology**. London, v. 18 (Suppl 9) p. ix33-6, 2007

ARTEAGA CL. Epidermal growth factor receptor dependence in human tumors: more than just expression? **Oncologist**, v. 7(4), p. 31–39, 2002.

BACKUS J, LAUGHLIN T, WANG Y, BELLY R, WHITE R, BADEN J, JUSTUS MIN C, MANNIE A, TAFRA L, ATKINS D, VERBANAC KM. Identification and characterization of optimal gene expression markers for detection of breast cancer metastasis. **J Mol Diagn**, v. 7(3), p. 327-36, 2005.

BATEMAN, A.C. Breast Pathology. Basic Science. **Surgery**, v. 25, n° 6, p. 245-250, 2007.

BAUER KR, BROWN M, CRESS RD, PARISE CA, CAGGIANO V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**, v. 109, p. 1721–1728, 2007.

BERTUCCI F, FINETTI P, ROUGEMONT J, CHARAFE-JAUFFRET E, CERVERA N, TARPIN C, NGUYEN C, XERRI L, HOULGATTE R, JACQUEMIER J, VIENS P, BIRNBAUM D. Gene expression profiling identifies molecular subtypes of inflammatory breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 65(6), p. 2170-8, 2005.

BLANCATO, J. K.; HADDAD, B. R. **Medical Cytogenetics**. Hon Fong L. Mark, Marcel Dekker, 2000.

BHARGAVA R, GERALD WL, LI AR, et al. EGFR gene amplification in breastcancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. **Mod Pathol**, v. 18, p. 1027–1033, 2005.

BIÈCHE, I.; CHAMPEME, M. H.; MATIFAS, F.; CROPP, C. R.; CALAHAN, R.; LIDEREAU, R. Two distinct regions involved in 1p deletion in human primary breast cancer. **Cancer Research**, Chicago, v. 53, p. 1950-1994, 1993.

BIRNBAUM D, BERTUCCI F, GINESTIER C, TAGETT R, JACQUEMIER J, CHARAFE-JAUFFRET E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **International Journal of Oncology**, Athens, v. 25, p. 249-258, 2004.

BLANCO-APARICIO C, RENNER O, LEAL JF, CARNERO A. PTEN, more than the AKT pathway. **Carcinogenesis**, v.28 (7), p.1379–1386, 2007.

BOECKER W, BUERGER H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineage in the human adult breast epithelium: a new progenitor (adult steam) cell concept. **Cell proliferation**, Oxford, v. 36, p. 73-84, 2003.

BOLLET MA, THIBAUT F, BOUILLON K, MEUNIER M, SIGAL-ZAFRANI B, SAVIGNONI A, DIÉRAS V, NOS C, SALMON R, FOURQUET A. Role of dynamic magnetic resonance imaging in the evaluation of tumor response to preoperative concurrent radiochemotherapy for large breast cancers: a prospective phase II study. **Int J Radiat Oncol Biol Phys.**, v. 69(1), p. 13-8, 2007.

BORGATTI P, MARTELLI A.M, BELLACOSA A, CASTO R, MASSARI L, CAPITANI S et al. Translocation of AKT/PKB to the nucleous of oosteoblast-like MC3T3-E1 cells exposed to proliferative growth factors. **Febs Lett.**, v.477, p. 27-32, 2000.

BOSE S, WANG SI, TERRY MB, HIBSHOOSH H, PARSONS R. Allelic loss of chromosome 10q23 is associated with tumor progression in breast carcinomas. **Oncogene**, v. 17, p. 123–7, 1998.

BURNESS ML, GRUSHKO TA, OLOPADE OI. Epidermal Growth Factor Receptor in Triple-Negative and Basal-Like Breast Cancer Promising Clinical Target or Only a Marker? **Cancer J**, v. 16(1), p.23-32, 2010.

BUSTIN SA, BEAULIEU JF, HUGGETT J, JAGGI R, KIBENG FS, OLSVIK PA, PENNING LC, TOEGEL S. MIQE précis: Practical implementation of minimum standard guidelines for fluorescence-based quantitative real-time PCR experiments. **BMC Mol Biol.**, v.11, p. 74, 2010.

CANAVESE G, CATTURICH A, VECCHIO C, TOMEI D, GIPPONI M, VILLA G, CARLI F, BRUZZI P, DOZIN B. Sentinel node biopsy compared with complete axillary dissection for staging early breast cancer with clinically negative lymph nodes: results of randomized trial. **Ann Oncol.**, v. 20(6), p. 1001-7, 2009.

CAREY LA, DEES EC, SAWYER L et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res* 13: 2329–2334, 2007.

CARTER, C.L.; ALLEN, C.; HENSON, D.E. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. **Cancer**, New York, v. 63, p. 181-187, 1989.

CAVALLI, L.R.; URBAN, C.A.; DAI, D.; DE ASSIS, S.; TAVARES, D.C.; RONE, J.D.; BLEGGI-TORRES, L.F.; LIMA, R.S.; CAVALLI, I.J.; ISSA, J.P.; HADDAD, B.R. Genetic and epigenetic alterations in sentinel lymph nodes metastatic lesions compared to their corresponding primary breast tumors. **Cancer, Genetics and Cytogenetics**, v.146, p.33-40, 2003.

CHEANG MC, VODUC D, BAJDIK C, LEUNG S, MCKINNEY S, CHIA SK, PEROU CM, NIELSEN TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res**, 14(5):1368-76, 2008.

CHUANG E, CHRISTOS P, FLAM A, MCCARVILLE K, FORST M, SHIN S, VAHDAT L, SWISTEL A, SIMMONS R, OSBORNE M, MOORE A, MAZUMDAR M, KLEIN P. Breast Cancer Subtypes in Asian-Americans Differ According to Asian Ethnic Group. **J Immigr Minor Health**, v. 13, p. 325-28, 2012.

CLARKE, M.F.; FULLER, M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell**, Cambridge, v. 124(6), p. 1111- 1115, 2006.

CLIMENT, J.; GARCIA, J.L.; MAO, J.H.; ARSUAGA, J.; PEREZ-LOSADA, J. Characterization of breast cancer by array comparative genomic hybridization. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 85, p. 497-508, 2007.

COOPER, G. M. M., ZERR, T., KIDD, J. M. M., EICHLER, E. E. E. & NICKERSON, D. A. A. Systematic assessment of copy number variant detection via genome-wide snp genotyping. **Nature genetics**, v. 40, p. 1199-1203, 2008.

COURTILLOT, C.; PLU-BUREAU, G.; BINART, N.; BALLEYGUIER, C.; SIGALZAFRANI, B.; GOFFIN, V.; KUTTENN, F.; KELLY, P. A.; TOURAINE, P. Benign Breast Diseases. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**, v. 10, p. 325-335, 2005.

DATTA SR, BRUNET A, GREENBERG ME. Cellular survival: a play in three Akts. **Genes Dev.**, v. 13, p. 2905–2927, 1999.

DENT R, TRUDEAU M, PRITCHARD KI, HANNA WM, KAHN HK, SAWKA CA, LICKLEY LA, RAWLINSON E, SUN P, NAROD SA. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res**, v. 1 (13), p. 4429-34, 2007.

DEPOWSKI PL, ROSENTHAL SI, JEFFREY SR. Loss of Expression of the PTEN Gene Protein Product Is Associated with Poor Outcome in Breast Cancer. **Mod Pathol**, 14(7):672–676, 2001.

DILLON RL, MARCOTTE R, HENNESSY BT, WOODGETT JR, MILLS GB, MULLER WJ. Akt1 and Akt2 play distinct roles in the initiation and metastatic phases of mammary tumor progression. **Cancer Res**, v. 69, p.5057–64, 2009.

DONTU, G.; AL-HAJJ, M.; ABDALLAH, W.M.; CLARKE, M.F.; WICHA, M.S. Stem cells in normal breast development and breast cancer. **Cell proliferation**. Oxford, v. 36 (Suppl. 1), p. 59 -72, 2003.

ENGELMAN JA, LUO J, CANTLEY LC. The evolution of phosphatidylinositol 3-kinases as regulators of growth and metabolism. **Nat Rev Genet.**, v. 7, p. 606-19, 2006.

EINSENBERG, A. L. A.; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 47, n. 4, p. 377-88, 2001.

EDWARDS J, TRAYNOR P, MUNRO AF, PIRRET CF, DUNNE B, BARTLETT JM. The role of HER1-HER4 and EGFRvIII in hormone-refractory prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, v. 12, p.123–130, 2006.

EHEMAN, C.R.; SHAW, K.M.; RYERSON, A.B.; MILLER, J.W.; AJANI, U.A.; WHITE, M.C. The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 18, n° 6, p. 1763-1769, 2009.

FEARON ER, VOGELSTEIN B. A genetic model for colorectal tumorigenesis. **Cell**, Cambridge, v. 61, p. 759-767, 1990.

FOROZAN, F., et al., Comparative genomic hybridization analysis of 38 breast cancer cell lines: a basis for interpreting complementary DNA microarray data. *Cancer Res*, 2000. 60(16): p. 4519-25.

FIEGLER, H., et al., *DNA microarrays for comparative genomic hybridization based on DOP-PCR amplification of BAC and PAC clones*. **Genes Chromosomes Cancer**, v. 36(4): p. 361-74, 2003.

GELMON K, DENT R, MACKEY JR, LAING K, MCLEOD D, VERMA S. Targeting Triple-Negative Breast Cancer: Optimising Therapeutic Outcomes. **Ann Oncol**, v.19, 2012.

GLAS AM, FLOORE A, DELAHAYE LJ, WITTEVEEN AT, POVER RC, BAKX N, LAHTI-DOMENICI JS, BRUINSMA TJ, WARMOES MO, BERNARDS R, WESSELS LF, VAN'T VEER LJ. Converting a breast cancer microarray signature into a high-throughput diagnostic test. **BMC Genomics**, v. 30, p. 7-278, 2006.

GOLDHIRSCH A, WOOD WC, GELBER RD, COATES AS, THÜRLIMANN B, SENN HJ; 10th St. Gallen conference. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Ann Oncol.**, v. 18(7), p. 1133-44, 2007.

GONZALEZ-ANGULO AM, FERRER-LOZANO J, STEMKE-HALE K, SAHIN A, LIU S, BARRERA JA, BURGUES O, LLUCH AM, CHEN H, HORTOBAGYI GN, MILLS GB, MERIC-BERNSTAM F. PI3K pathway mutations and PTEN levels in primary and metastatic breast cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 10(6), p. 1093-101, 2011.

GOSWAMI S, SAHAI E, WYCKOFF JB, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. **Cancer Res**, v. 65, p. 5278 –5283, 2005.

GRAY, J.W., et al., Molecular cytogenetics of human breast cancer. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 1994. 59: p. 645-52.

GUIMARÃES, J.R. **Manual de oncologia**. 3ª ed. São Paulo: Libbs Farmacêutica, 2008.

HABEL LA, SHAK S, JACOBS MK, et al. A population based study of tumor gene expression and risk of breast cancer death among lymph node-negative patients. **Breast Cancer Res**, v.8, p. R25, 2006.

HAN W.; HAN, M.R.; KANG, J.J.; BAE, J.Y.; LEE, J.H.; BAE, Y.J.; LEE, J.E.; SHIN, H.J.; HWANG, K.T.; HWANG, S.E.; KIM, S.W.; NOH, D.Y. Genomic alterations identified by array comparative genomic hybridization as prognostic markers in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. **BMC Cancer**, v. 6, p. 92, 2006.

HARARI PM, ALLEN GW, BONNER JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. **J Clin Oncol**, v.25, p. 4057– 4065, 2007.

HEID CA, STEVENS J, LIVAK KJ, WILLIAMS PM. Real time quantitative PCR. **Genome Res**, v. 6(10), p. 986-94, 1996.

HEIMANN R, HELLMAN S. Clinical progression of breast cancer malignant behavior: what to expect and when to expect it. *J Clin Oncol*, v. 18(3), p. 591-9, 2000.

HEIMANN R, LAN F, MCBRIDE R, HELLMAN S. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res.*, v. 60(2), p. 298-304, 2000.

HENNESSY BT, SMITH DL, RAM PT, LU Y, MILLS GB. Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery. **Nat Rev Drug Discov** , v, 4, p. 988–1004, 2005.

HENSON D.E.; RIES, L.; FREEDMAN, M.A.; CARRIAGA, M. Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. **Cancer**, v. 68, p. 2142-2149, 1991.

HESTER SD, REID L, NOWAK N, JONES WD, PARKER JS, KNUDTSON K, WARD W, TIESMAN J, DENSLOW ND. Comparison of comparative genomic hybridization technologies across microarray platforms. **J Biomol Tech**, v. 20(2), p. 135-51, 2009.

HINES LM, RISENDAL B, BYERS T, MENGSHOL S, LOWERY J, SINGH M. Ethnic disparities in breast tumor phenotypic subtypes in Hispanic and non-Hispanic white women. **J Womens Health**, v. 20(10), p. 1543-50, 2011.

HIRSCH FR, VARELLA-GARCIA M, BUNN PA JR, et al. Molecular predictors of outcome with gefitinib in a phase III placebo-controlled study in advanced non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.*, v. 24, p. 5034–42, 2006.

HOLLAND PM, ABRAMSON RD, WATSON R, GELFAND DH. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 88 (16), p. 7276-80, 1991.

HU Z, FAN C, OH DS, MARRON JS, HE X, QAQISH BF, LIVASY C, CAREY LA, REYNOLDS E, DRESSLER L, NOBEL A, PARKER J, EWEND MG, SAWYER LR, WU J, LIU Y, NANDA R, TRETIKOVA M, RUIZ ORRICO A, DREHER D, PALAZZO JP, PERREARD L, NELSON E, MONE M, HANSEN H, MULLINS M, QUACKENBUSH JF, ELLIS MJ, OLOPADE OI, BERNARD PS, PEROU CM. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics**, London, v. 27 (7), p. 96, 2006.

HU X, STERN HM, GE L, O'BRIEN C, HAYDU L, HONCHELL CD, HAVERTY PM, PETERS BA, WU TD, AMLER LC, CHANT J, STOKOE D, LACKNER MR, CAVET G. Genetic Alterations And Oncogenic Pathways Associated With Breast Cancer Subtypes, **Mol Cancer Res.** v. 7(4), p. 511-22, 2009.

HUNTER, K.W.; ALSARRAJ, J. Gene expression profiles and breast cancer metastasis: a genetic perspective. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 26, p. 497-503, 2009.

HUTCHINSON JN, JIN J, CARDIFF RD, WOODGETT JR, MULLER WJ. Activation of Akt-1 (PKB $\alpha$ ) can accelerate ErbB-2-mediated mammary tumorigenesis but suppresses tumor invasion. **Cancer Res**, v. 64, p. 3171-8, 2004.

IAFRATE AJ, FEUK L, RIVERA MN, LISTEWNIAK ML, DONAHOE PK, QI Y, SCHERER SW, LEE C. Detection of large-scale variation in the human genome. **Nat Genet**, v. 36(9): p. 949-51, 2004.

IHEMELANDU CU, LEFFALL LD JR, DEWITTY RL, NAAB TJ, MEZGHEBE HM, MAKAMBI KH, ADAMS-CAMPBELL L, FREDERICK WA. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. **J Surg Res.**, v.143, p. 109 -118, 2007.

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <http://www.inca.org.br> Acesso em: Fevereiro de 2012.

IRSHAD S, ELLIS P, TUTT A. Molecular heterogeneity of triple-negative breast cancer and its clinical implications, **Curr Opin Oncol**, v. 6, p. 566-77, 2011.

LUCITO R, HEALY J, ALEXANDER J, ISHKANIAN AS, MALLOFF CA, WATSON SK, DELEEUEW RJ, CHI B, COE BP, SNIJDERS A, ALBERTSON DG, PINKEL D, MARRA MA, LING V, MACAULAY C, LAM WL. A tiling resolution DNA microarray with complete coverage of the human genome. **Nat Genet**, v. 36 (3). p. 299-303, 2004.

IWASE H, YAMAMOTO Y. Biological characteristics of triple negative breast cancer. **Jpn J Breast Cancer**, v. 23(2), p. 75-80, 2008.

KALLIONIEMI OP, KALLIONIEMI A, SUDAR D, RUTOVITZ D, GRAY JW, WALDMAN F, PINKEL D. Comparative genomic hybridization: a rapid new method for detecting and mapping DNA amplification in tumors. **Semin Cancer Biol**, v. 4(1), p.41-6, 1993.

KETTERHAGEN JP, QUAKENBUSH SR, HAUSHALTER RA. Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast. **Surgery, gynecology & obstetrics**, Chicago, v. 158, p.120-3, 1984.

KERSTING C, TIDOW N, SCHMIDT H, et al. Gene dosage PCR and fluorescence in situ hybridization reveal low frequency of egfr amplifications despite protein overexpression in invasive breast carcinoma. **Lab Invest**, v. 84, p. 582-587, 2004.

KIRKEGAARD T, WITTON CJ, EDWARDS J, NIELSEN KV, JENSEN LB, CAMPBELL FM, COOKE TG, BARTLETT JM. Molecular alterations in AKT1, AKT2 and AKT3 detected in breast and prostatic cancer by FISH, **Histopathology**, v. 56(2), p. 203-11, 2010.

KIRKEGAARD T, WITTON CJ, MCGLYNN LM ET AL. AKT activation predicts outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. **J. Pathol**, v. 207, p. 139–146, 2005.

KLIJN JG, BERNIS PM, SCHMITZ PI, et al. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. **Endocr Rev**, v.13, p. 3 –17, 1992.

KANAMORI Y, KIGAWA J, ITAMUCHI H et al. Correlation between loss of PTEN expression and Akt phosphorylation in endometrial carcinoma. *Clin. Cancer Res.*, v. 7, p. 892–82001.

KNUDSON, A. G. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 68, p. 820 – 823, 1971.

KNUUTILA S, BJORKQVIST AM, AUTIO K, TARKKANEN M, WOLF M, MONNI O, SZYMANSKA J, LARRAMENDY ML, TAPPER J, PERE H, *et al.*: DNA copy number amplifications in human neoplasms: review of comparative genomic hybridization studies. **Am J Pathol**, 152:1107-1123, 1998.

KOBAYASHI S. Basal-like subtype of breast cancer: a review of its unique characteristics and their clinical significance. **Breast Cancer**, v. 15(2), p. 153–8, 2008.

KRAG DN, WEAVER DL. Pathological and molecular assessment of sentinel lymph nodes in solid tumors. **Semin Oncol**, v. 29(3), p. 274-9, 2002.

KRAUSS, G. **Biochemistry of Signal Transduction and Regulation**, 4<sup>a</sup> edição, Alemanha: Wiley-VCH, 2008.

KREIKE B, VAN KOUWENHOVE M, HORLINGS H, WEIGELT B, PETERSE H, BARTELINK H, VAN DE VIJVER MJ. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Res**, 9(5):R65, 2007.

LANDERCASPER J, DIETRICH LL, JOHNSON JM. A breast center review of compliance with National Comprehensive Cancer Network Breast Cancer guidelines. **Am J Surg**, v. 192 (4), p. 525-7, 2006.

LARRAMENDY ML, LUSHNIKOVA T, BJORKQVIST AM, WISTUBA II, VIRMANI AK, SHIVAPURKAR N, GAZDAR AF, KNUUTILA S. Comparative genomic hybridization

reveals complex genetic changes in primary breast cancer tumors and their cell lines. **Cancer Genet Cytogenet**, p.119, p. 132-138, 2000.

LAFRAMBOISE T, WEIR BA, ZHAO X, BEROUKHIM R, LI C, HARRINGTON D, SELLERS WR, MEYERSON M. Allele-specific amplification in cancer revealed by SNP array analysis. **PLoS Comput Biol**, v. 1(6), p. 65, 2005.

LEHMANN BD, BAUER JA, CHEN X, SANDERS ME, CHAKRAVARTHY AB, SHYR Y, PIETENPOL JA. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest.**, 121(7):2750-67, 2011.

LIVASY CA, KARACA G, NANDA R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol.**, v. 19, p. 264– 271, 2006.

LOCKWOOD WW, CHARI R, CHI B, LAM WL. Recent advances in array comparative genomic hybridization technologies and their applications in human genetics. **Eur J Hum Genet**, v. 14(2), p.139-48, 2006.

LÓPEZ-KNOWLES E, O'TOOLE SA, MCNEIL CM, MILLAR EK, QIU MR, CREA P, DALY RJ, MUSGROVE EA, SUTHERLAND RL. PI3K pathway activation in breast cancer is associated with the basal-like phenotype and cancer-specific mortality. **Int J Cancer**, v. 126(5), p. 1121-31, 2010.

LOURO, I. D.; LLERENA JR., J. C.; VIEIRA DE MELO, M. S.; ASHTON-PROLLA, P.; CONFORTI-FROES, N. **Genética molecular do câncer**. 2 ed., São Paulo: MSG Produção Editorial, 2002.

LUNDIN J. The Nottingham Prognostic Index - from relative to absolute risk prediction. **European Journal of Cancer**, v. 43, p. 1498-1500, 2007

LY M, ANTOINE M, ANDRÉ F, CALLARD P, BERNAUDIN JF, DIALLO DA. Breast cancer in Sub-Saharan African women: review. **Bull Cancer**, v. 98(7), p. 797-806, 2011.

LUND MJ, BUTLER EN, BUMPERS HL, OKOLI J, RIZZO M, HATCHETT N, GREEN VL, BRAWLEY OW, OPREA-ILIES GM, GABRAM SG. High prevalence of triple-negative tumors in an urban cancer center. **Cancer**, 113:608–615, 2008.

MABRY H, GIULIANO AE. Sentinel node mapping for breast cancer: progress to date and prospects for the future. **Surg Oncol Clin N Am.**, v. 16(1), p. 55-70, 2007.

MILANEZI F, CARVALHO S, SCHMITT FC. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. **Expert Rev Mol Diagn.**, v. 8, p. 417–434, 2008.

MORONI M, VERONESE S, BENVENUTI S, et al. Gene copy number for epidermal growth factor receptor (EGFR) and clinical response to antiEGFR treatment in colorectal cancer: a cohort study. **Lancet Oncol.**, v.6, p. 279–86, 2005.

MOULDER SL. Does the PI3K pathway play a role in basal breast cancer? **Clinical Breast Cancer**, v. 10 (3), p.66-71, 2010.

MULLAN, P.B.; MILLIKAN, R.C. Molecular subtyping of breast cancer: opportunities for new therapeutic approaches. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 64(24), p. 3219-32, 2007.

MUKESH K. NYATI, MEREDITH A. MORGAN, FELIX Y. FENG & THEODORE S. LAWRENCE. Integration of EGFR inhibitors with radiochemotherapy. **Nature Reviews Cancer**, v. 6, p. 876-885, 2006.

MYERS MP, PASS I, BATTY IH, et al. The lipid phosphatase activity of PTEN is critical for its tumor suppressor function. **Proc Natl Acad Sci U S A** 1998; 95: 13513-8.

NAGATA Y, LAN KH, ZHOU X, TAN M, ESTEVA FJ, SAHIN AA, et al. PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients. **Cancer Cell**, v. 6, p. 117-27. 2004.

NAKATANI K, THOMPSON DA, BARTHEL A et al. Up-regulation of Akt3 in estrogen receptor-deficient breast cancers and androgenindependent prostate cancer lines. **J. Biol. Chem**, v. 274, p. 21528–21532, 1999.

NAVARRETE, M.A; MAIER, C.M.; FALZONI, R.; QUADROS, L.G; LIMA, G.R; BARACAT, E.C; NAZÁRIO, A.C. Assessment of the proliferative, apoptotic and cellular renovation indices of the human mammary epithelium during the follicular and luteal phases of the menstrual cycle. **Breast Cancer Research**, v. 7, p. 306–313, 2005.

NESSLING M, RICHTER K, SCHWAENEN C, ROERIG P, WROBEL G, WESSENDORF S, FRITZ B, BENTZ M, SINN HP, RADLWIMMER B, LICHTER P. Candidate genes in breast cancer revealed by microarray-based comparative genomic hybridization of archived tissue. **Cancer Res**, v. 65(2), p. 439-47, 2005.

NETO JC, IKOMA MM, CARVALHO KC, VASSALLO J, DE BROU M, GOBBI H, SOARES FA, ROCHA RM. *MGMT* and *PTEN* as potential prognostic markers in breast cancer. **Exp mol pathol**, v. 92, 2012.

NEUZIL, J.; STANTIC, M.; ZOBALOVA, R.; CHLADOVA, J.; WANG, X.; PROCHAZKA, L.A.C.; DONG, L.A; ANDERA L.D, RALPH, S.J. Tumour-initiating cells vs. cancer 'stem' cells and CD133: What's in the name? **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, p. 855–859, 2007.

NICHOLSON KM, ANDERSON NG. The protein Kinase B/AKT signaling pathway in human malignancy. **Cellular Signalling**, v.14, p. 381-65, 2002.

NIELSEN TO, HSU FD, JENSEN K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 5367-74, 2004.

O'REILLY KE, ROJO F, SHE QB, et al. mTOR inhibition induces upstream receptor tyrosine kinase signaling and activates Akt. **Cancer Res**, v. 66, p.1500–8, 2006.

PAIK S, SHAK S, TANG G, KIM C, BAKER J, CRONIN M, BAEHNER FL, WALKER MG, WATSON D, PARK T, HILLER W, FISHER ER, WICKERHAM DL, BRYANT J, WOLMARK N. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**, v.351(27), p. 2817-26, 2004.

PANDOLFI PP. Breast Cancer — Loss of PTEN Predicts Resistance to Treatment. **The New England Journal Of Medicine**, p. 2337-2338, 2004.

PARSONS R, SIMPSON L. *PTEN* and cancer. **Methods Mol Biol**, v. 222, p. 147-66, 2003.

PERREN A, WENG L, BOAG A, ZIEBOLD U, THAKORE K, DAHIA P. Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast. **Am J Pathol**, v.155, p. 1253–60, 1999.

PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, POLLACK JR, ROSS DT, JOHNSEN H, AKSLEN LA, FLUGE O, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS C, ZHU SX, LONNING PE, BØRRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v. 406, p. 747-752, 2000.

PINKEL, D., SEGRAVES, R., SUDAR, D., CLARK, S., POOLE, I., KOWBEL, D., COLLINS, C., KUO, W.L., CHEN, C., ZHAI, Y. *et al.* High resolution analysis of DNA copy number variation using comparative genomic hybridization to microarrays. **Nat. Genet.**, v. 20, p. 207–211, 1998.

POLYAK, K. Breast cancer: origins and evolution. **The Journal of clinical investigation**, New Haven, v. 117(11), p. 3155-3163, 2007.

POLYAK, K.; HAHN, W.C. Roots and stems: Stem cells in cancer. **Nature Medical**, v.12, p. 296–300, 2006.

QUAN ML, MCCREADY D. J. The evolution of lymph node assessment in breast cancer. **Surg Oncol.**, v. 15;99(4), p. 194-8, 2009.

RAKHA EA, REIS-FILHO JS, ELLIS IO. Basal-like breast cancer: a critical review. **J Clin Oncol**, 26 (15):2568-81, 2008.

RAKHA EA, ELLIS IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**, 41(1):40-7, 2009.

REINER A, ESPOSITO D, CHI M, RODGERS L, BRADY A, SEBAT J, TROGE J, WEST JA, ROSTAN S, NGUYEN KC, POWERS S, YE KQ, OLSHEN A, VENKATRAMAN E, NORTON L, WIGLER M. Representational oligonucleotide microarray analysis: a high-resolution method to detect genome copy number variation. **Genome Res**, v. 13(10), p. 2291-305, 2003.

REIS-FILHO, J.S.; SIMPSON, P.T.; GALE, T.; LAKHANI, S.R. THE MOLECULAR GENETICS OF BREAST CANCER : THE CONTRIBUTION OF COMPARATIVE GENOMIC HYBRIDIZATION. **PATHOLOGY – RESEARCH AND PRACTICE**, V. 201, P. 713-725, 2005.

RICHARDS RI, SUTHERLAND GR. Heritable unstable DNA sequences. **Nature Genetics**, New York, v. 1, p. 7-9, 1992.

RODENHISER, D.; MANN, M. Epigenetics and human disease: translating basic biology into clinical applications. **CMAJ : Canadian Medical Association journal**, Ottawa, v 174(3), p. 10.1503, 2006.

RODRIGUEZ-PANILLA SM, SARRIO D, HONRADO E, MORENO-BUENO G, HARDISSON D, CALERO F. et al. Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. **J Clin Pathol.**, v.60(9), p. 1006-12, 2007.

ROIDL A, BERGER HJ, KUMAR S, BANGE J, KNYAZEVA P, ULLRICH A. Resistance to chemotherapy is associated with fibroblast growth factor receptor 4 up-regulation. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 2058–2066, 2009.

ROONEY PH, MURRAY GI, STEVENSON DA, HAITESS NE, CASSIDY J, MCLEOD HL: Comparative genomic hybridization and chromosomal instability in solid tumours. **Br J Cancer**, v.80, p. 862-873, 1999.

SAAL LH, JOHANSSON P, HOLM K, GRUVBERGER-SAAL SK, SHE QB, MAURER M, KOUJAK S, FERRANDO AA, MALMSTRÖM P, MEMEO L, ISOLA J, BENDAHL PO, ROSEN N, HIBSHOOSH H, RINGNÉR M, BORG A, PARSONS R. Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.104(18), p. 7564-9, 2007.

SALMENA L, CARRACEDO A, PANDOLFI PP. Tenets of PTEN tumor suppression. **Cell**, v. 133(3), p.403-14, 2008.

SAMUELS Y, WANG Z, BARDELLI A, SILLIMAN N, PTAK J, SZABO S, YAN H, GAZDAR A, POWELL SM, RIGGINS GJ, *et al.*: High frequency of mutations of the PIK3CA gene in human cancers. **Science**, v. 304, p. 554, 2004.

SANTOS, S.C.L.; CAVALLI, I.J.; RIBEIRO, E.M.S.F.; URBAN, C.A.; LIMA, R.S.; BLEGGI-TORRES, L.F.; RONE, J.D.; HADDAD, B.R.; CAVALLI, L.R. Patterns of DNA copy number changes in sentinel lymph node breast cancer metastasis. **Citogenetic and Genome Research**, v. 122, p. 16-21, 2008.

SAUTTER-BIHL ML, SEDLMAYER F, BUDACH W, DUNST J, FEYER P, FIETKAU R, HAASE W, HARMS W, RÖDEL C, SOUCHON R, WENZ F, SAUER R. One life saved by four prevented recurrences? : Update of the Early Breast Cancer Trialists confirms: postoperative radiotherapy improves survival after breast conserving surgery. **Strahlenther Onkol.**, v.188(6), p. 461-463, 2012.

SCARFF, R.; TORLONI, F. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors, **World Health Organization**, Geneva, v. 2, p.20, 1968.

SEBAT, J., et al., Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science**, v. 305(5683), p. 525-8, 2004.

SHARPE R, PEARSON A, HERRERA-ABREU MT, JOHNSON D, MACKAY A, WELTI JC, NATRAJAN R, REYNOLDS AR, REIS-FILHO JS, ASHWORTH A, TURNER NC. FGFR signaling promotes the growth of triple-negative and basal-like breast cancer cell lines both in vitro and in vivo. **Clin Cancer Res**, v.17(16), p. 5275-86, 2011.

SHAYESTEH L, LU Y, KUO WL, BALDOCCHI R, GODFREY T, COLLINS C, PINKEL D, POWELL B, MILLS GB, GRAY JW: PIK3CA is implicated as an oncogene in ovarian cancer. **Nat Genet**, v. 21, p. 99-102, 1991.

SHIPITSIN M.; CAMPBELL, L.L.; ARGANI P.; WEREMOWICZ, S.; BLOUSHTAIN-QIMRON, N.; YAO, J.; NIKOLSKAYA, T.; SEREBRYISKAYA, T.; BEROUKHIM, R.; HU, M.; HALUSHKA, M.K.; SUKUMAR, S.; PARKER, L.M; ANDERSON, K.S.; HARRIS, L.N.; GARBER, J.E.; RICHARDSON, A.L.; SCHNITT, S.J.; NIKOLSKY, Y.; GELMAN, R.S.; POLYAK, K. Molecular Definition of Breast Tumor Heterogeneity, **Cancer Cell**, Cambridge, v. 11(3), p. 259-73, 2007.

SHOMAN N, KLASSEN S, MCFADDEN A, BICKIS MG, TORLAKOVIC E, CHIBBAR R. Reduced PTEN expression predicts relapse in patients with breast carcinoma treated by tamoxifen. **Mod Pathol**, v.18, p. 250-9, 2005.

SIZIOPIKOU KP, COBLEIGH M. The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies. **Breast.**, v. 16, p.104 –107, 2007.

SORLIE T, WANG Y, XIAO C, JOHNSEN H, NAUME B, SAMAHA RR, BORRESEN-DALE AL. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, London, v. 7, p. 127, 2006.

STARK A, KAPKE A, SCHULTZ D, BROWN R, LINDEN M, RAJU U. Advanced stages and poorly differentiated. grade are associated with an increased risk of HER2/neu positive breast carcinoma only in white women: findings from a prospective cohort study of African-American and White-American women. **Breast Cancer Res Treat**, v.10, p.405– 414, 2008.

STEEGERS MA, WOLTERS B, EVERS AW, STROBBE L, WILDER-SMITH OH. Effect of axillary lymph node dissection on prevalence and intensity of chronic and phantom pain after breast cancer surgery. **J Pain**, v. 9(9), p. 813-22, 2008.

STEMKE-HALE K, GONZALEZ-ANGULO AM, LLUCH A, NEVE RM, KUO WL, DAVIES M, CAREY M, HU Z, GUAN Y, SAHIN A, SYMMANS WF, PUSZTAI L, NOLDEN LK, HORLINGS H, BERNIS K, HUNG MC, VAN DE VIJVER MJ, VALERO V, GRAY JW, BERNARDS R, MILLS GB, HENNESSY BT. An integrative genomic and proteomic analysis of PIK3CA, PTEN, and AKT mutations in breast cancer. **Cancer Res.**, v. 68 (15), p. 6084-91, 2008.

STINGL, J. & CALDAS, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7(10), p. 791-799, 2007.

SUGIMURA, T. Cancer prevention: past, present, future. **Mutation research**, Amsterdam, v. 402, p. 7-14, 1998.

SUN M, WANG G, PACIGA JE et al. AKT1/PKBalpha kinase is frequently elevated in human cancers and its constitutive activation is required for oncogenic transformation in NIH3T3 cells. **Am. J. Pathol.**, v. 159, p. 431–437, 2001.

TAKANO T, OHE Y, SAKAMOTO H, et al. Epidermal growth factor receptor gene mutations and increased copy numbers predict gefitinib sensitivity in patients with recurrent non-small-cell lung cancer. **J Clin Oncol**, v.23, p. 6829–37, 2005.

TENHAGEN M, VAN DIEST PJ, IVANOVA IA, VAN DER WALL E, VAN DER GROEP P. Fibroblast growth factor receptors in breast cancer: expression, downstream effects, and possible drug targets. **Endocr Relat Cancer**, v. 19 (4), p. 115-29, 2012.

TROESTER MA, HOADLEY KA, SØRLIE T, HERBERT BS, BORRESEN-DALE AL, LONNING PE, SHAY JW, KAUFMANN WK, PEROU CM. Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. **Cancer Research**, v. 64(12), p. 4218-26, 2004.

TURNER N, GROSE R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, p. 116–129, 2010.

TURNER N, LAMBROS MB, HORLINGS HM, PEARSON A, SHARPE R, NATRAJAN R, GEYER FC, VAN KOUWENHOVE M, KREIKE B, MACKAY A, ASHWORTH A, VAN DE VIJVER MJ, REIS-FILHO JS. Integrative molecular profiling of triple negative breast cancers identifies amplicon drivers and potential therapeutic targets. **Oncogene**, v.29(14), p. 2013-23, 2010.

TUZUN E, SHARP AJ, BAILEY JA, KAUL R, MORRISON VA, PERTZ LM, HAUGEN E, HAYDEN H, ALBERTSON D, PINKEL D, OLSON MV, EICHLER EE. Fine-Scale Structural Variation of the Human Genome. **Nat Genet**, v. 37(7), p. 727-32, 2005.

VARGO-GOGOLA, T.; ROSEN, J.M. Modelling breast cancer: one size does not fit all. **Nature Reviews**, London, v. 7(9), p. 659-72, 2007.

VELTMAN I, VAN ASSELDONK M, SCHEPENS M, STOOP H, LOOIJENGA L, WOUTERS C, GOVAERTS L, SUIJKERBUIJK R, VAN KESSEL A. A novel case of infantile sacral teratoma and a constitutional t(12;15)(q13;q25) pat. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 136(1), p. 17-22, 2002.

VILLADSEN, R. ;FRIDRIKSDOTTIR, A.J.; RONNOV-JESSEN, L.; GUDJONSSON, T.; RANK, F.; LABARGE, M. A.; BISSELL, M. J.; PETERSEN, O.W. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. **The Journal of cell biology**, New York , v. 177(1), p. 87-101, 2007.

VIVANCO I, SAWYERS CL. The phosphatidylinositol 3-kinase AKT pathway in human cancer, **Nat. Rev. Cancer**, v. 2, p. 489–501, 2002.

VOROBIOF, D A, SITAS F, GABRIEL V. Breast Cancer Incidence in South Africa. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19,125-127, 2001.

ZHOU BP, LIAO Y, XIA W, SPOHN B, LEE MH, HUNG MC. Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells. **Nat Cell Biol**, v.3, p. 245-52, 2001.

ZHOU C, QIU L, SUN Y, HEALEY S, WANEBO H, KOUTTAB N, DI W, YAN B, WAN Y. Inhibition of EGFR/PI3K/AKT cell survival pathway promotes TSA's effect on cell death and migration in human ovarian cancer cells. **Int J Oncol.**, v.1, p. 269-78, 2006.

WALKER ARP, WALKER BF, NCONGWANE J, et al: Age of menopause in black women in South Africa. **Br J Obstet Gynecol**, v. 91, p. 797-801, 1984.

WANG ZC, LIN M, WEI LJ, LI C, MIRON A, LODEIRO G, HARRIS L, RAMASWAMY S, TANENBAUM DM, MEYERSON M, IGLEHART JD, RICHARDSON A. Loss of heterozygosity and its correlation with expression profiles in subclasses of invasive breast cancers. **Cancer Research**, v. 64(1), p. 64-71, 2004.

WANG, C.; IAKOVLEV, V.V.; WONG, V.; LEUNG, S.; WARREN, K.; IAKOVLEVA, G.; ARNESON, N.C.; PINTILIE, M.; MILLER, N.; YOUNGSON, B.; MCCREADY, D.R.; DONE, S.J. Genomic Alterations In Primary Breast Cancers Compared With Their Sentinel And More Distal Lymph Node Metastases: An aCGH Study. **Genes, Chromosomes And Cancer**, v. 48, p. 1091-1101, 2009.

WEINBERG, RA. Tumor suppressor genes. **Science**, Washington, v. 254, p. 1138-1146, 1991. *J Clin Oncol*. 2007 Jan 1;25(1):118-45. Epub 2006 Dec 11.

WESCHE J, HAGLUND K, HAUGSTEN EM. Fibroblast growth factors and their receptors in cancer. **Biochem J**, v.437(2), p.199-213, 2011.

WESSELS LF, VAN WELSEME T, HART AA, VAN'T VEER LJ, REINDERS MJ, NEDERLOF PM. Molecular classification of breast carcinomas by comparative genomic hybridization: a specific somatic genetic profile for BRCA1 tumors. **Cancer Res**, v. 62(23), p. 7110-7, 2002.

WOLFF AC, HAMMOND ME, SCHWARTZ JN, HAGERTY KL, ALLRED DC, COTE RJ, DOWSETT M, FITZGIBBONS PL, HANNA WM, LANGER A, MCSHANE LM, PAIK S, PEGRAM MD, PEREZ EA, PRESS MF, RHODES A, STURGEON C, TAUBE SE, TUBBS R, VANCE GH, VAN DE VIJVER M, WHEELER TM, HAYES DF. 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 (1), p.118-45, 2007.

WU G, XING M, MAMBO E, HUANG X, LIU J, GUO Z, CHATTERJEE A, GOLDENBERG D, GOLLIN SM, SUKUMAR S, TRINK B, SIDRANSKY D. Somatic mutation and gain of copy number of PIK3CA in human breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 7(5), p. 609-16, 2005.

YU, K.; LEE, C.H.; TAN, P.H.; TAN, P.. Conservation of breast cancer molecular subtypes and transcriptional patterns of tumor progression across distinct ethnic populations. **Clinical Cancer Research**, Denville, v.10, p. 5508–5517, 2004.

YUAN ZQ, SUN M, FELDMAN RI et al. Frequent activation of AKT2 and induction of apoptosis by inhibition of phosphoinositide-3- OH kinase/Akt pathway in human ovarian cancer. **Oncogene**, v.19, p. 2324–2330, 2000.

## **10. ANEXOS**

**10.1 ANEXO I – Consentimento Livre e Esclarecido**

**10.2 ANEXO II - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores TN provenientes do Brasil (amostras de DNA).**

**10.3 ANEXO III - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores TN/EGFR<sup>+</sup> provenientes do Brasil (amostras contidas nas lâminas de TMA)**

**10.4 ANEXO IV – Informações epidemiológicas das pacientes com tumores N-TN provenientes da África do Sul (amostras de DNA).**

**10.5 ANEXO V – Informações epidemiológicas das pacientes com tumores N-TN provenientes do Brasil.**

## 10.1 ANEXO I - CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Concordo em participar livremente deste estudo, entendo que serei entrevistado e submetido a uma avaliação laboratorial (exame de sangue). E, entendo que os riscos de minha participação nesta pesquisa são mínimos.

Entendo que minha participação é inteiramente voluntária, podendo me recusar a responder qualquer questão ou retirar o meu consentimento em participar neste estudo a qualquer hora, sem nenhum prejuízo ao meu tratamento atual ou futuro.

Eu, \_\_\_\_\_, após ter lido e entendido todas as informações e esclarecido todas as minhas dúvidas referentes a este estudo, concordo voluntariamente em participar do mesmo. Atesto também o recebimento das “Informações ao doador”, necessário para a minha compreensão do estudo.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

Assinatura (do doador ou responsável) ou impressão datiloscópica

Eu, Prof. Dr. Iglénir João Cavalli, declaro que forneci todas as informações referentes ao estudo ao doador.

\_\_\_\_\_ Data: \_\_/\_\_/\_\_

**Prof. Dr. Iglénir João Cavalli**

## 10. 2. ANEXO II – Informações epidemiológicas das pacientes com tumores TN provenientes do Brasil (amostras de DNA)

|    | Idade | Tamanho do tumor<br>(cm) | Envolvimento de<br>Linfonodos Axilares | Grau do Tumor |
|----|-------|--------------------------|----------------------------------------|---------------|
| 1  |       | 2,0                      | NEG                                    | III           |
| 2  |       | 1,8                      |                                        |               |
| 3  |       | 7,0                      | POS                                    | II            |
| 4  | 50    |                          |                                        |               |
| 5  | 72    | 0,9                      | POS                                    | II            |
| 6  | 16    | 10,5                     | POS                                    | II            |
| 7  |       | 1,3                      | NEG                                    | III           |
| 8  | 70    | 1,1                      |                                        | II            |
| 9  | 83    | 3,3                      | POS                                    | III           |
| 10 |       | 1,1                      |                                        | III           |
| 11 | 55    | 2,0                      |                                        | II            |
| 12 | 63    | 1,7                      |                                        | III           |
| 13 | 50    | 1,8                      | NEG                                    | II            |
| 14 | 42    |                          | POS                                    | II            |
| 15 | 82    |                          | POS                                    | II            |
| 16 | 47    | 4,5                      | POS                                    | II            |
| 17 | 51    | 3,0                      | NEG                                    | II            |
| 18 | 71    | 2,5                      | NEG                                    | II            |
| 19 | 62    | 3,0                      | NEG                                    | II            |
| 20 | 35    |                          | NEG                                    |               |
| 21 | 73    |                          | NEG                                    |               |
| 22 | 27    |                          | NEG                                    | III           |
| 23 | 40    | 2,5                      | POS                                    | III           |
| 24 | 43    | 1,2                      | POS                                    | III           |
| 25 | 39    | 4,0                      | POS                                    | III           |
| 26 | 59    | 4,0                      | POS                                    | II            |
| 27 | 50    |                          | POS                                    | III           |
| 28 | 61    | 3,0                      | NEG                                    | II            |
| 29 |       | 3,5                      | NEG                                    |               |
| 30 | 43    | 3,5                      |                                        | III           |
| 31 | 49    | 4,5                      |                                        | III           |
| 32 | 39    | 2,5                      |                                        | II            |
| 33 | 56    |                          |                                        | III           |
| 34 | 45    | 5,1                      |                                        | II            |
| 35 | 63    | 3,5                      |                                        | I             |
| 36 | 61    | 2,0                      |                                        | III           |

### 10.3. ANEXO III - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores TN/EGFR<sup>+</sup> provenientes do Brasil (amostras contidas nas lâminas de TMA)

|    | Idade | Envolvimento de        | Grau do Tumor | Marcadores Basais |       |      |
|----|-------|------------------------|---------------|-------------------|-------|------|
|    |       | Linfonodos<br>Axilares |               | EGFR              | CK5/6 | CK14 |
| 1  | 40    | POS                    | III           | NEG               | NEG   | NEG  |
| 2  | 41    | NEG                    | III           | NEG               | NEG   | POS  |
| 3  | 63    | POS                    | II            | NEG               | NEG   | NEG  |
| 4  | 52    | NEG                    | I             | NEG               | NEG   | NEG  |
| 5  | 43    | POS                    | III           | NEG               | POS   | NEG  |
| 6  | 52    | POS                    | III           | NEG               | NEG   | NEG  |
| 7  | 85    | POS                    | II            | NEG               | NEG   | NEG  |
| 8  | 73    | POS                    | III           | NEG               | NEG   | NEG  |
| 9  | 56    | POS                    | II            | NEG               | NEG   | NEG  |
| 10 | 62    | NEG                    | II            | NEG               | POS   | POS  |
| 11 | 51    | NEG                    | III           | NEG               | POS   | POS  |
| 12 | 39    | NEG                    | II            | NEG               | NEG   | NEG  |
| 13 | 57    | POS                    | III           | NEG               | NEG   | NEG  |
| 14 | 60    | POS                    | III           | NEG               | POS   | POS  |
| 15 | 61    | POS                    | II            | NEG               | NEG   | NEG  |
| 16 |       | POS                    | II            | NEG               | POS   | POS  |
| 17 | 40    | POS                    | III           | NEG               | NEG   | NEG  |
| 18 | 68    | NEG                    | II            | NEG               | NEG   | NEG  |

#### 10.4. ANEXO IV - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores N-TN provenientes da África do Sul (amostras de DNA)

|    | Grupo Étnico | Idade | Tamanho do tumor (cm) | Grau do Tumor |
|----|--------------|-------|-----------------------|---------------|
| 1  |              | 58    |                       | II            |
| 2  |              |       | 5,1                   |               |
| 3  |              |       |                       |               |
| 4  |              |       |                       |               |
| 5  |              | 50    | 3,5                   | II            |
| 6  |              | 64    | 9,0                   | II            |
| 7  |              |       |                       |               |
| 8  |              |       | 4,5                   | II            |
| 9  |              |       | 4,0                   | II            |
| 10 |              |       |                       | I             |
| 11 |              |       |                       | II            |
| 12 | branco       | 56    |                       | II            |
| 13 | misto        | 44    | 4,0                   | III           |
| 14 | misto        | 60    | 5,5                   | I             |
| 15 | branco       | 36    | 3,0                   | II            |
| 16 | branco       |       | 5,5                   | II            |
| 17 | misto        | 46    | 2,0                   |               |
| 18 | misto        | 29    | 4,5                   | I             |
| 19 | misto        | 76    | 1,2                   | III           |
| 20 | branco       | 38    | 1,8                   | I             |
| 21 | branco       | 51    |                       | II            |
| 22 | negro        | 49    | 2,2                   | III           |
| 23 | branco       | 66    | 2,5                   | II            |
| 24 | misto        | 48    | 2,5                   | III           |
| 25 | branco       | 58    |                       | II            |
| 26 | branco       | 64    | 3,0                   | II            |
| 27 | misto        | 61    | 3,5                   | II            |
| 28 | misto        | 55    | 4,8                   | III           |
| 29 | misto        | 52    | 3,0                   | III           |
| 30 | branco       | 55    | 2,6                   | III           |
| 31 | misto        | 51    | 1,8                   | I             |
| 32 | misto        |       | 4,8                   | II            |
| 33 | misto        | 55    | 4,5                   | II            |
| 34 | negro        | 54    | 4,0                   | III           |
| 35 | misto        | 48    | 2,2                   | II            |
| 36 | misto        | 69    | 1,9                   | II            |
| 37 | branco       | 53    | 0,7                   | I             |
| 38 | negro        | 31    | 2,0                   | III           |

|    |        |    |     |     |
|----|--------|----|-----|-----|
| 39 | misto  | 31 | 3,5 | III |
| 40 | misto  | 64 | 3,2 | II  |
| 41 | negro  | 29 | 10  | III |
| 42 | misto  | 69 | 2,0 | II  |
| 43 | branco | 40 |     | I   |
| 44 | misto  | 58 | 3,5 | II  |
| 45 | misto  | 23 | 4,5 | II  |
| 46 | misto  | 59 | 3,0 | II  |
| 47 | misto  | 64 | 4,6 | I   |
| 48 | misto  | 48 | 4,5 | II  |
| 49 | misto  | 53 | 3,0 | I   |
| 50 | misto  | 36 | 11  | III |
| 51 | misto  | 44 | 1,6 | III |
| 52 | misto  | 61 | 3,6 | II  |
| 53 | Indian | 53 | 3,2 | III |
| 54 | misto  | 76 | 1,8 | III |
| 55 | misto  | 72 | 2,3 | I   |
| 56 | misto  | 63 | 2,3 | I   |
| 57 | misto  | 69 | 1,8 | III |
| 58 | misto  | 56 | 3,5 | I   |
| 59 | misto  | 50 | 3,5 | III |
| 60 | misto  | 79 | 4,0 | II  |
| 61 | misto  | 60 | 4,0 | II  |
| 62 | negro  | 53 | 2,8 | II  |
| 63 | branco |    | 2,2 | I   |
| 64 | misto  | 68 | 2,2 | III |
| 65 | misto  | 50 | 2,5 | II  |

---

## 10.5. ANEXO V - Informações epidemiológicas das pacientes com tumores N-TN provenientes do Brasil

|    | Idade | Envolvimento de Linfonodos Axilares | Grau do Tumor | Tamanho do tumor (cm) | Marcadores |     |      |
|----|-------|-------------------------------------|---------------|-----------------------|------------|-----|------|
|    |       |                                     |               |                       | RE         | RP  | HER2 |
| 1  | 52    | NEG                                 | II            | 2,5                   | POS        | POS | NEG  |
| 2  | 25    | POS                                 | III           | 4,5                   | POS        |     |      |
| 3  | 48    | NEG                                 | III           | 3,8                   | POS        |     |      |
| 4  | 40    | POS                                 | II            | 4                     | POS        |     | NEG  |
| 5  | 64    | POS                                 | II            | 2,3                   | POS        |     |      |
| 6  | 49    | NEG                                 | I             | 6                     | POS        | POS |      |
| 7  | 64    | POS                                 | II            | 5,5                   | POS        | POS | NEG  |
| 8  | 47    | POS                                 | II            | 5,5                   | POS        | POS | NEG  |
| 9  | 53    | NEG                                 |               | 3,7                   | NEG        | NEG | POS  |
| 10 | 54    | NEG                                 | II            | 1                     | POS        | POS | NEG  |
| 11 | 62    | POS                                 | II            | 0,8                   | NEG        | NEG | POS  |
| 12 | 81    | NEG                                 | I             | 1,5                   | POS        |     |      |
| 13 | 71    |                                     | II            | 1                     | POS        | POS | NEG  |
| 14 | 44    | NEG                                 | II            | 3,5                   | POS        | POS | NEG  |
| 15 | 78    | NEG                                 | II            | 4,5                   | POS        |     | POS  |
| 16 | 54    | POS                                 | II            | 5,5                   | POS        |     |      |
| 17 | 47    | POS                                 | II            | 3                     | NEG        | NEG | POS  |
| 18 | 90    | POS                                 | II            | 6,5                   | POS        |     |      |
| 19 | 59    | 0                                   | II            | 5                     | POS        |     | NEG  |
| 20 | 51    | POS                                 | II            | 6                     | POS        | POS | NEG  |
| 21 | 55    | POS                                 | I             | 1,9                   | POS        |     |      |
| 22 | 47    | POS                                 | II            | 4,5                   | POS        |     | NEG  |
| 23 | 45    | POS                                 | III           | 3,8                   | POS        |     |      |
| 24 | 46    | POS                                 | II            | 4,8                   | POS        |     |      |
| 25 | 79    | NEG                                 | I             | 4                     | POS        | POS | POS  |
| 26 | 50    | POS                                 | II            | 1,5                   | POS        | POS | NEG  |
| 27 | 71    | NEG                                 | II            | 3                     | POS        |     | NEG  |
| 28 | 55    | NEG                                 | II            | 3,2                   | POS        |     |      |
| 29 | 59    | POS                                 | III           | 1,7                   | POS        |     |      |
| 30 | 66    | NEG                                 | II            | 2                     | POS        | POS | NEG  |
| 31 | 66    | NEG                                 | II            | 2                     | POS        | POS | NEG  |
| 32 | 69    | NEG                                 | III           | 1,8                   | NEG        | NEG | POS  |
| 33 | 65    | NEG                                 | II            | 1,7                   | POS        | POS | NEG  |
| 34 | 56    | POS                                 | II            | 6,5                   | POS        |     |      |
| 35 | 65    | POS                                 | II            | 3,5                   | POS        |     | NEG  |
| 36 | 53    | POS                                 | III           | 4                     | POS        | POS | POS  |
| 37 | 70    | NEG                                 | II            | 2,3                   | POS        | POS | POS  |
| 38 | 65    | NEG                                 | II            | 2,8                   | POS        | POS | NEG  |
| 39 | 47    | NEG                                 | I             | 4                     | POS        |     | NEG  |

|    |    |     |          |     |     |     |     |
|----|----|-----|----------|-----|-----|-----|-----|
| 40 | 45 | NEG | II       | 6,5 | POS |     |     |
| 41 | 43 | NEG | III      | 2   | POS |     |     |
| 42 | 28 | NEG | I        | 3,5 | POS | POS | POS |
| 43 | 60 | NEG | II       | 3   | POS | POS | NEG |
| 44 | 53 | POS |          | 4   | POS |     | NEG |
| 45 | 55 | POS |          | 1,3 | POS |     |     |
| 46 | 71 | POS | II       | 3   | POS | POS | NEG |
| 47 | 51 | NEG | II       | 6,5 | POS |     |     |
| 48 | 29 | POS | III / II | 4   | POS |     |     |
| 49 | 84 | NEG | II       | 3   | POS | POS | NEG |
| 50 | 56 | POS | III      | 2,8 | POS |     |     |
| 51 | 37 | POS | II       | 4   | POS | POS | NEG |
| 52 | 61 | NEG | II       | 4   | POS | NEG | POS |
| 53 | 44 | POS | II       | 7,5 | POS |     |     |
| 54 | 37 | POS | II / I   | 2,5 | POS |     |     |
| 55 | 43 | NEG | II       | 2,5 | POS | POS | NEG |
| 56 | 75 | POS | II/III   | 5   | POS | NEG | NEG |
| 57 | 64 | NEG | II       | 1   | POS | POS | NEG |
| 58 | 82 | POS | II       | 4,5 | POS | POS | NEG |
| 59 | 53 | NEG | II       | 2   | POS | POS | NEG |
| 60 | 60 | NEG | I        | 1,2 | POS | POS | NEG |
| 61 | 44 | NEG | II       | 2,7 | POS |     | NEG |
| 62 | 83 | POS | II       | 4,5 | POS | POS | NEG |
| 63 | 52 | NEG | II       | 6   | POS | POS | NEG |
| 64 | 73 | NEG | III      | 6   | POS | POS | NEG |
| 65 | 63 | POS | III      | 4   | NEG | NEG | POS |
| 66 | 70 | NEG | I        | 4   | POS | POS | POS |
| 67 | 43 | POS | II       | 1,6 | POS |     |     |
| 68 | 61 | POS | I        | 1,5 | POS |     |     |
| 69 | 66 | POS |          | 5   | POS | POS | NEG |
| 70 | 46 | POS | II       | 2,8 | POS | POS | NEG |
| 71 | 59 | POS | II       |     | POS | NEG | NEG |
| 72 | 74 | NEG | I        | 2   | POS | POS |     |
| 73 | 53 | NEG | II       | 1,6 | NEG | NEG | POS |
| 74 | 46 | POS | II       | 6   | POS | POS | NEG |
| 75 | 59 | POS | II       | 2   | POS | POS | NEG |
| 76 | 71 | NEG | II       | 1,5 | POS | POS |     |
| 77 | 69 | NEG | I        | 1,2 | POS | POS | NEG |
| 78 | 54 | POS | II       | 4   | POS |     |     |
| 79 | 66 | NEG | I        | 1,7 | POS | POS |     |
| 80 | 69 | POS |          | 3,5 | POS | POS |     |
| 81 | 67 | NEG | III      | 2,5 | POS | POS | NEG |
| 82 | 52 | POS | I        | 3,5 | POS | POS | NEG |

|     |    |     |     |     |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 83  | 41 | NEG | II  | 5   | POS |     |     |
| 84  | 40 | POS | II  | 3   | POS |     |     |
| 85  | 59 | NEG | I   | 1,2 | POS | POS | NEG |
| 86  | 67 | NEG | II  | 1,5 | POS | POS | NEG |
| 87  | 48 | NEG | I   | 2   | POS | POS | NEG |
| 88  | 45 | POS | II  | 1,3 | POS | POS | NEG |
| 89  | 78 | NEG | II  | 2,5 | POS | POS |     |
| 90  | 53 | NEG | I   | 1,8 | POS | POS | NEG |
| 91  | 72 | POS | III | 3,5 | NEG | NEG | POS |
| 92  | 55 |     | II  | 5   | POS | POS |     |
| 93  | 73 | POS | II  | 2   | POS | NEG | POS |
| 94  | 51 | NEG | III | 1,5 | POS | POS | POS |
| 95  | 63 | NEG | I   | 4   | POS | POS | NEG |
| 96  | 71 | POS | II  | 3,5 | POS | POS | POS |
| 97  | 53 | POS | II  | 7   | POS | POS | NEG |
| 98  | 45 | POS | III | 5   | POS | POS | NEG |
| 99  | 53 | POS | II  | 4   | NEG | NEG | POS |
| 100 | 42 | NEG | I   | 1,5 | POS | POS | NEG |
| 101 | 46 | NEG | II  | 5   | POS | POS | POS |
| 102 | 56 | POS | II  | 2   | POS | POS | NEG |
| 103 | 43 | NEG | II  | 2,5 | NEG | NEG | POS |
| 104 | 44 | POS |     |     | NEG | NEG | POS |
| 105 | 40 | POS | II  | 3,5 | POS | POS | POS |
| 106 | 72 | NEG | I   | 3,5 | POS | POS | POS |
| 107 | 55 | POS | III | 1,9 | NEG | NEG | POS |
| 108 | 40 | POS | II  | 3,5 | POS | POS | POS |
| 109 | 78 | NEG | II  | 1,4 | POS | POS | POS |
| 110 | 54 | POS | II  | 3,2 | POS | POS | NEG |
| 111 | 48 | POS | II  | 2,2 | POS |     | POS |
| 112 | 50 | POS | II  | 5   | POS |     |     |
| 113 | 48 | NEG | III | 2,2 | POS | POS |     |
| 114 | 63 | NEG | II  | 3   | POS | POS | POS |
| 115 | 56 | POS | II  | 4   | POS | POS | POS |
| 116 | 51 | NEG | III | 2   | POS | POS | POS |
| 117 | 79 | NEG | III | 2,8 | NEG | NEG | POS |
| 118 | 39 | POS | II  | 4,5 | POS | NEG | NEG |
| 119 | 57 | POS | II  | 4   | POS | NEG | POS |
| 120 | 49 | POS | II  | 2,5 | POS | POS | NEG |
| 121 | 75 | NEG | II  | 2,5 | POS | POS | NEG |
| 122 | 47 | POS | III | 3   | POS | POS | POS |
| 123 | 33 | POS |     | 5   | POS | POS | NEG |
| 124 | 75 | NEG | III | 2,7 | POS | POS | NEG |
| 125 | 74 | NEG | I   | 6   | POS | POS | NEG |

|     |    |     |     |     |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 126 | 42 | POS | I   | 2,5 | POS | POS | NEG |
| 127 | 38 | POS | II  | 2,9 | POS | POS | NEG |
| 128 | 33 | NEG | II  | 4   | POS | NEG | NEG |
| 129 | 39 | POS | III | 4   | POS | NEG | NEG |
| 130 | 66 | POS | II  | 4   | POS | NEG | NEG |
| 131 | 65 | POS | III | 4,1 | POS | POS | NEG |
| 132 | 54 | NEG | II  | 4   | POS | POS | POS |
| 133 | 47 | NEG | III | 1,5 | POS | POS | POS |
| 134 | 51 | NEG | II  | 2   | POS | NEG | POS |
| 135 | 42 | NEG | I   | 5   | NEG | POS | NEG |
| 136 | 89 | POS | II  | 3,5 | POS | POS | NEG |
| 137 | 37 | POS | III | 3   | NEG | NEG | POS |
| 138 | 60 | NEG | III | 2   | POS | POS | POS |
| 139 | 50 | POS | III | 3   | NEG | POS | NEG |
| 140 | 45 | POS | III | 5,7 | NEG | NEG | POS |
| 141 | 37 | POS | III |     | POS | POS |     |
| 142 | 44 | NEG | II  | 2,5 | POS | POS | POS |
| 143 | 58 | POS | III | 5,5 | POS | POS | NEG |
| 144 | 40 | NEG | III | 3,5 | NEG | POS | NEG |
| 145 | 82 |     |     | 2,9 | POS | POS | POS |
| 146 | 29 | NEG | I   | 2   | POS | POS |     |
| 147 | 52 | POS | III | 9   | NEG | POS | POS |
| 148 | 60 | POS | I   | 1,3 | POS | POS | POS |
| 149 | 61 | POS | II  | 4   | POS | POS | POS |
| 150 | 62 | NEG | II  | 5   | NEG | POS | POS |
| 151 |    | NEG |     | 3   | POS | POS | NEG |
| 152 | 65 | NEG |     | 2,5 | POS | POS | NEG |
| 153 | 31 | POS | III | 4,2 | NEG | POS | NEG |
| 154 | 71 | POS | I   | 3   | POS | POS |     |
| 155 | 62 | POS | III | 2   | POS | POS | NEG |
| 156 | 77 | NEG | II  | 1,8 | POS | NEG | NEG |
| 157 | 54 | POS | III | 1,8 | POS | POS | POS |
| 158 | 70 | POS |     | 4   | POS | POS | POS |
| 159 | 61 | POS | I   | 3,5 | NEG | POS | NEG |
| 160 | 76 | POS | II  | 4   | POS | POS | NEG |
| 161 | 48 | POS | II  | 7   | POS | POS | NEG |
| 162 | 36 | POS | III | 6   | POS | NEG | POS |
| 163 | 58 | POS | II  | 1   | NEG | NEG | POS |
| 164 | 63 | POS | II  | 1,6 | POS | POS | NEG |
| 165 | 33 | NEG | II  | 4   | POS | POS | NEG |
| 166 | 44 | POS | II  | 5   | POS | POS |     |
| 167 | 42 | POS | III | 3,4 | POS | POS | POS |
| 168 | 47 | POS | I   | 2,5 | POS | POS | NEG |

|     |    |     |     |     |     |     |     |
|-----|----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 169 | 72 | POS | II  | 3,5 | POS | POS | POS |
| 170 | 67 | POS | II  | 0,5 | POS | POS | NEG |
| 171 | 61 | NEG | II  | 2,5 | POS | POS | NEG |
| 172 | 66 | POS | I   | 2   | POS | POS | POS |
| 173 | 67 | POS | III | 5   | POS | POS | NEG |
| 174 | -  | POS | III |     | POS | POS | NEG |
| 175 | 44 | POS | II  | 1,8 | POS | POS |     |
| 176 | 57 | NEG | II  | 2   | POS | POS | POS |
| 177 | 62 | POS | II  | 6   | POS | POS | NEG |
| 178 | 72 | NEG | II  | 2,4 | POS | NEG |     |
| 179 | 57 | POS | II  |     | POS | POS | NEG |
| 180 | 43 | POS | II  | 3   | POS | NEG | NEG |
| 181 | 82 | POS | II  | 4   | POS | POS | NEG |
| 182 | 53 |     | I   | 9,5 | POS | POS | NEG |
| 183 | 45 |     | II  | 2,3 | POS | POS | POS |
| 184 | 45 |     | I   | 1,7 | POS | POS | POS |
| 185 | 86 |     |     |     | POS | POS | NEG |
| 186 | 83 | NEG | II  | 0,8 | POS | NEG | NEG |
| 187 | 49 |     | II  |     | POS | POS | NEG |
| 188 | 71 | NEG | I   | 1   | POS | POS | NEG |
| 189 | 45 | POS | II  | 2,2 | POS | POS | POS |

---