



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
Instituto de Biociências

Fabíola Encinas Rosa

**Perfil da expressão gênica na predição fenotípica
dos carcinomas mamários**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas (Genética) do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de doutor.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Silvia Regina Rogatto

**Botucatu - SP
2007**

Resumo

O câncer de mama é a segunda causa de câncer relacionado a morbidade e mortalidade nas mulheres em todo o mundo. Até a década de 1990, a principal abordagem utilizada para identificar marcadores com significado prognóstico em câncer de mama consistia de testes de um ou poucos genes em um grupo de pacientes, geralmente de forma retrospectiva. Embora uma grande quantidade de estudos utilizando esta abordagem tem sido publicado, somente os receptores hormonais (receptores progesterona e estrógeno) e o HER-2 têm sido utilizados como marcadores na prática clínica no tratamento do câncer de mama. A identificação de novos fatores prognósticos e preditivos tem se tornado decisiva para facilitar a terapia individualizada nestes tumores. Neste estudo, 80 carcinomas de mama invasivo foram avaliados para determinar a expressão gênica e protéica, e a amplificação gênica utilizando as técnicas de PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), imuno-histoquímica (IHQ) e hibridação *in situ* cromogênica (CISH), respectivamente. O objetivo deste estudo foi comparar a sensibilidade dos diferentes procedimentos e correlacionar os achados com os dados clínicos e patológicos das pacientes. Foi analisado a expressão gênica (qRT-PCR) e protéica (IHQ) dos transcritos *ESR1*, *ESR2* e *PGR*. O grau tumoral e o índice proliferativo do gene *Ki-67* foi negativamente correlacionado com os níveis do *ESR1* e do *PGR*, sugerindo que a expressão dos receptores está associada com tumores de mama bem diferenciados e menos diretamente relacionados com a proliferação celular. Uma correlação significativa foi observada entre a expressão protéica do *ESR2* e o acometimento de linfonodos, indicando que o *ESR2* pode ser um marcador prognóstico em câncer de mama. Para elucidar o perfil molecular do nível de expressão do *HER-2*, a amplificação (CISH), expressão do mRNA (qRT-PCR) e a expressão protéica (IHQ) foram avaliadas. A metodologia de CISH permitiu a identificação da heterogeneidade intratumoral em relação ao padrão de amplificação do *HER-2* em três casos. A concordância entre os resultados de IHQ e qRT-PCR foi de 78.9%, enquanto para qRT-PCR e CISH foi 91.9%. Baseado nesses achados, as metodologias de CISH e qRT-PCR foram procedimentos úteis para investigar o *status* do gene *HER-2*. Uma associação significativa foi encontrada entre a baixa expressão do *HER-2* (qRT-PCR) e o envolvimento de menos que quatro linfonodos, sugerindo um papel prognóstico deste marcador em câncer de mama. Em adição, uma análise da expressão gênica global foi realizada utilizando *oligoarrays* (*CodeLink bioarray system*) para determinar um conjunto de novos genes marcadores que sejam preditos de proliferação celular nos tumores com expressão diminuída dos genes *ESR1* e *PGR* e tumores com expressão elevada do *Ki-67*. Nos grupos *ESR1* e *PGR*, sete genes (*GATA3*, *REERG*, *CLAMP*, *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1* e *BIRC5*) foram escolhidos para validação por qRT-PCR. A baixa expressão dos genes *GATA3*, *REERG* e *CLAMP* e a expressão elevada dos genes *AURKB*, *UBE2C* e *GTSE1* foram significativamente associadas com um alto nível

do Ki-67. A baixa expressão do *GATA3* e a expressão aumentada do *AURKB* e *GTSE1* foram estatisticamente associadas com alto grau histológico. Embora não estatisticamente significantes, uma baixa expressão do *REERG* e uma expressão elevada do *UBE2C* foram observadas em tumores de alto grau. A correlação estatística entre os níveis de expressão para todos os genes avaliados validou os achados da análise de *oligoarrays*. Em conclusão, estes resultados corroboraram com a função destes genes em aumentar a taxa de proliferação das células e os revelaram como marcadores potenciais envolvidos na carcinogênese da mama.

Abstract

Breast cancer is the second leading cause of cancer-related morbidity and mortality in women worldwide. Until the late 1990s, the main approach used for identifying prognostically significant groups in breast cancer consisted of testing one or a few markers in a cohort of patients, usually retrospectively. Although a plethora of studies using this approach have been published, only hormone receptors (progesterone and estrogen receptors) and HER-2 have been translated into clinical markers for routine prognostic use in breast cancer management. The identification of novel prognostic and predictive factors has become imperative to further individualize therapy of breast cancer. In this study, 80 invasive breast carcinomas were evaluated to determine transcript and protein expression status and amplification using real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR), immunohistochemistry (IHC), and chromogenic in situ hybridization (CISH), respectively. The aim of this investigation was to compare the sensibility of the different procedures and to correlate the findings with clinical and pathological data. It was analyzed *ESR1*, *ESR2*, and *PGR* mRNA (qRT-PCR) and protein (IHC) expression. Tumor grade and proliferative index Ki-67 was negatively correlated with transcript and protein levels of *ESR1* and *PGR*, suggesting that receptors expression are associated with well-differentiated breast tumors and less directly related to cell proliferation. A significant correlation was observed between lymph node status and *ESR2* protein expression, suggesting that *ESR2* could be a prognostic marker in human breast cancer. To elucidate the molecular profile of *HER-2* status, amplification (CISH), mRNA (qRT-PCR) and protein (IHC) expression were evaluated. CISH allowed the identification of intratumoral heterogeneity in relation to *HER-2* status in three cases. The concordance rate between the results of IHC and qRT-PCR was of 78.9%, while for qRT-PCR and CISH was 91.9%. Based on these findings, CISH and qRT-PCR are useful procedures to investigate *HER-2* gene status. A significant association was found between *HER-2* downexpression (qRT-PCR) and the involvement of less than four lymph nodes, suggesting a prognostic role of this biomarker in breast cancer. In addition, a global gene expression analysis was performed using oligonucleotide microarray (CodeLink bioarray system) to determine a set of new markers that is predictive for cell proliferation rate in *ESR1* and *PGR* negative and Ki-67 high expression tumors. In *ESR1* and *PGR* clusters, seven genes (*GATA3*, *REERG*, *CLAMP*, *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1*, and *BIRC5*) were chosen for validation by qRT-PCR. *GATA3*, *REERG*, and *CLAMP* downexpression and *AURKB*, *UBE2C*, and *GTSE1* overexpression was significantly associated with high Ki-67. *GATA3* downexpression and *AURKB* and *GTSE1* overexpression were statistically associated with high histologic grade. Although no statistically significant, a lower expression of *REERG* and *UBE2C* overexpression were observed in high grade tumors. The statistical correlation between expression levels evaluated for all genes validated oligoarrays analysis findings. In

overall, these results corroborated with the function of these genes in increase the proliferative cells rate and revealed them as potential biomarkers involved in breast carcinogenesis.

Lista de Siglas e Abreviaturas

Genes

<i>AURKB</i>	<i>aurora kinase B</i>
<i>BIRC5</i>	<i>baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)</i>
<i>BRCA1</i>	<i>Breast cancer 1, early onset</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast cancer 2, early onset</i>
<i>CLAMP</i>	<i>calponin-homology and microtubule-associated protein</i>
<i>ESR1</i> ou <i>ER-α</i>	Receptor de estrógeno 1 ou receptor de estrógeno alfa
<i>ESR2</i> ou <i>ER-β</i>	Receptor de estrógeno 2 ou receptor de estrógeno beta
<i>GAPDH</i>	<i>Housekeeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
<i>GATA3</i>	<i>GATA binding protein 3</i>
<i>GTSE1</i>	<i>G-2 and S-phase expressed 1</i>
<i>HER-2</i>	Receptor do fator de crescimento epidermal tipo 2
<i>Ki-67</i>	Antígeno Ki-67 relacionado à proliferação
<i>PGR</i>	Receptor de progesterona
<i>REERG</i>	<i>RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor</i>
<i>SLC25A35</i>	<i>Solute carrier family 25, member 35</i>
<i>SLC29A4</i>	<i>Solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4</i>
<i>TNFRSF21</i>	<i>Tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21</i>
<i>UBE2C</i>	<i>Ubiquitin-conjugating enzyme E2C</i>

Metodologias

CISH	Hibridação <i>in situ</i> cromogênica
FISH	Hibridação <i>in situ</i> fluorescente
IHQ	Imuno-histoquímica
PCR	Reação em cadeia da polimerase
qRT-PCR	PCR quantitativa em tempo real

Geral

AC	Adriamicina, ciclofosfamida
AF-1	Domínio de ativação independente de hormônio
AF2	Domínio multifuncional
CH	<i>Calponin-homology</i>
CMF	Ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil
CT	<i>Fluorescence threshold value</i>
DAB	Cromógeno 3,3'-diaminobenzidina
DBD	Domínio de Ligação ao DNA
EREs	Elementos de resposta ao estrógeno
ESTs	Seqüências expressas
FAC	5-fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida
FEC	5-fluorouracil, 4-epirrubicina, ciclofosfamida
Hinge	Sinal de localização nuclear
HREs	Elementos responsivos ao hormônio
LBD	Domínio de Ligação ao Ligante
PBS	Salina fosfatada tamponada
QR ou RQ	Quantificação relativa
SNR	<i>Signal-to-Noise Ratio</i>

Índice

I. Introdução.....	01
1. Câncer de mama.....	01
2. Epidemiologia do câncer de mama.....	03
3. Marcadores Tumorais.....	04
3.1. Associação dos genes <i>ESR</i> , <i>PGR</i> e <i>HER-2</i> no desenvolvimento e tratamento do câncer de mama.....	06
4. Análise de expressão gênica em larga escala.....	15
4.1. Predição da evolução clínica baseada em dados de <i>microarrays</i>	16
4.2. Predição de tratamento.....	19
5. Referências	21
II. Objetivos.....	32
III. Artigos: versão em português.....	33
1. Avaliação da expressão dos receptores de estrógeno alfa e beta e do receptor de progesterona e a correlação com fatores clínico-patológicos e o marcador de proliferação celular Ki-67 em carcinomas mamários.....	33
Referências.....	50
Tabela 1.....	55
Tabela 2.....	56
Tabela 3.....	57
Figura 1.....	58
Figura 2.....	58
Figura 3.....	59
2. Hibridação <i>in situ</i> cromogênica e PCR quantitativa em tempo real em comparação com a metodologia de imuno-histoquímica para predizer o padrão do <i>HER-2</i> em carcinomas mamários.....	60
Referências.....	77
Tabela 1.....	82
Tabela 2.....	83
Tabela 3.....	83
Figura 1.....	84
Figura 2.....	85
Figura 3.....	85
3. Receptores de estrógeno e progesterona <i>versus</i> o antígeno de proliferação Ki-67 estão associados com perfis de expressão gênica distintos em câncer de mama.....	86

Referências.....	107
Tabela 1.....	114
Tabela 2.....	115
Tabela 3.....	117
Figura 1.....	120
Figura 2.....	121
Figura 3.....	122
IV. Artigos: versão em inglês.....	123
1. Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathological factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers.....	123
References.....	139
Table 1.....	144
Table 2.....	145
Table 3.....	146
Figure 1.....	147
Figure 2.....	147
Figure 3.....	148
2. Chromogenic <i>in situ</i> hybridization and real time reverse transcription-PCR compared to immunohistochemistry to predict the <i>HER-2</i> status in breast carcinomas.....	149
References.....	165
Table 1.....	170
Table 2.....	171
Table 3.....	171
Figure 1.....	172
Figure 2.....	173
Figure 3.....	173
3. Estrogen and progesterone receptor status <i>versus</i> Ki-67 proliferation antigen are associated with remarkably distinct gene expression profiling in breast cancer.....	174
References.....	193
Table 1.....	200
Table 2.....	201
Table 3.....	203
Figure 1.....	206
Figure 2.....	207
Figure 3.....	208
V. Conclusão.....	209

VI. Anexos.....	210
Tabela 1.....	210
Parecer Comitê de Ética.....	216
Termo de Consentimento.....	217
VII. Outros Trabalhos.....	218

Introdução

1. Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres e quando o diagnóstico é precoce, as chances de cura são grandes (Esteva e Hortobagyi, 2004). Estes tumores são histologicamente heterogêneos, constituídos por uma variedade de tipos celulares, incluindo células do carcinoma, estromais, linfoblásticas, endoteliais e por subtipos patológicos distintos.

Dentre os principais tipos de carcinomas mamários estão os tumores ductais *in situ*, lobulares *in situ* e invasivos. Os carcinomas ductais *in situ* são caracterizados pela proliferação de células tumorais dentro do sistema ductal-lobular mamário, sem evidência de invasão no estroma adjacente. Estas lesões podem ser subclassificadas seguindo o modelo estrutural do tecido e os tipos mais freqüentes são designados de comedo, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido. Os carcinomas lobulares *in situ* ocorrem em aproximadamente 10% das pacientes, com uma maior freqüência em mulheres mais velhas (mediana de 64.6 anos *versus* 60.6 anos em mulheres com carcinoma ductal). Eles são caracterizados por uma proliferação sólida de células pequenas e ao contrário dos outros tipos tumorais, as características histológicas são bem homogêneas, facilitando o seu diagnóstico, contudo estes tumores não são detectados por exames macroscópicos. Apesar de estar associado a um fenótipo biológico menos agressivo, a recorrência e o tempo de sobrevida são muito similares aquelas das pacientes com carcinoma ductal invasivo (Arpino et al., 2004). Os carcinomas ductais invasivos são os mais freqüentes e compreendem 65 a 80% dos casos de câncer de mama. Estes são maiores em tamanho e a sua aparência e consistência variam amplamente dependendo da composição da lesão. Ao contrário dos carcinomas *in situ*, o diagnóstico de um carcinoma invasivo é determinado quando as células invadem a membrana basal.

A diversidade no aspecto clínico do câncer de mama é indubitavelmente relacionada a diferenças nas taxas de crescimento do tumor, invasão tumoral, potencial

metastático e outros sinais complexos de crescimento celular e manutenção das células (Chang et al., 2005). Estas alterações são oriundas de um processo de múltiplas etapas caracterizado por alterações genéticas que direcionam a progressão do tecido normal para tumoral (Nowell, 1976; Devilee e Cornelisse, 1994).

Em geral, no mínimo seis alterações genéticas são requeridas para converter o epitélio de mama normal em câncer de mama maligno (Weinberg, 1991; Devilee e Cornelisse, 1994), havendo um aumento da capacidade proliferativa ou de sobrevivência celular em cada evento de alteração genética. No início do desenvolvimento tumoral, as células neoplásicas apresentam motilidade e interação com os componentes da matriz extracelular, como as fibras de colágeno, e com as células não neoplásicas, incluindo fibroblastos e macrófagos. Em seguida, as células do tumor podem realizar o mimetismo vascular (células neoplásicas que podem algumas vezes fazer parte da parede do vaso sanguíneo) e invadir a corrente sanguínea ou linfática. Posteriormente, as células podem entrar em apoptose, em um estado de dormência ou começar a proliferar dentro ou fora dos vasos. Esta evolução do carcinoma está associada a uma cascata de eventos que inclui alterações em genes responsáveis pela angiogênese, invasão vascular linfática, metástases em linfonodo e a distância (Sahai, 2007).

O desenvolvimento do câncer de mama pode passar por vários estágios envolvendo alterações progressivas do tecido normal para hiperplasia epitelial atípica, carcinoma ductal *in situ*, câncer de mama invasivo e eventualmente resulta na doença metastática (Shackney e Silverman, 2003). Contudo, nos últimos anos este conceito tem sido alterado. A progressão do câncer de mama não é mais vista como uma única via, mas sim como uma complexa série de eventos genéticos que levam à vias divergentes e distintas e culminam no tumor invasivo. Os mecanismos moleculares envolvidos neste processo não estão ainda completamente definidos (Simpson et al., 2005).

As alterações genéticas que levam a formação e progressão tumoral ocorrem em duas classes principais de genes que são responsáveis pelo controle da divisão e diferenciação celular, os protooncogenes e os genes supressores tumorais. Estes genes

atuam regulando os mecanismos de crescimento e diferenciação celular normal. Desta forma, alterações na estrutura, no número de cópias ou na expressão destes genes podem levar ao desenvolvimento tumoral (Weinberg, 1991; Harris e Hollstein, 1993).

2. Epidemiologia do câncer de mama

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é considerado a primeira causa de mortalidade por câncer nas mulheres brasileiras, o que é consistente com o padrão detectado mundialmente (Pisani, 1999). A sua incidência é relativamente menos freqüente antes dos 35 anos de idade, aumentando progressivamente após essa faixa etária (Anderson e Badzioch, 1993). A estimativa do número de casos novos de câncer de mama esperados para a população Brasileira, em 2006, foi de 48.930 com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2006).

Estes tumores apresentam diferenças nas taxas de incidência nas diferentes populações. As disparidades entre as diferentes raças/etnias podem ocorrer devido a diferenças na exposição a fatores de risco, estratégias de prevenção e rastreamento, incidência, diagnóstico, tratamento, participação em ensaios clínicos, morbidade, sobrevida e mortalidade (revisado em Tammemagi, 2007). Segundo o *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER) database*, a incidência de casos de câncer de mama diagnosticados entre 2000 e 2004, em 17 áreas geográficas diferentes, foi maior em indivíduos Caucasianos que em Negróides, Espanhóis e Asiáticos. Entretanto, a pior taxa de mortalidade foi registrada em Afro-americanos (<http://seer.cancer.gov>, 2007; Tammemagi, 2007).

Em compilações de dados epidemiológicos, Brody et al. (2007) e Michels et al. (2007) observaram que o alto índice de massa corpórea; consumo regular de álcool; dieta alimentar rica em gorduras, carboidratos e proteínas de origem animal, entre outros, podem estar envolvidos com uma maior incidência de câncer de mama. Outros fatores como a reposição hormonal com exposição prolongada a estrógenos e/ou progesterona no epitélio

mamário (Collins et al., 2005; Conner, 2007), menarca precoce, menopausa tardia (Okobia e Bunker, 2005) e a presença de genes de predisposição/suscetibilidade podem estar envolvidos com o aumento do risco de desenvolver este carcinoma (Peters et al., 2001; Fuqua, 2001; Thompson e Easton, 2004; Oldenburg et al., 2007).

A presença de história familiar de câncer de mama, com acometimento da doença em parentes de primeiro grau, aumenta consideravelmente o risco de desenvolver a doença. Mutações em genes de suscetibilidade, como *BRCA1* e *BRCA2*, sabidamente relacionadas a carcinomas hereditários (revisado em Foulkes, 2006), bem como as mutações em outros genes, como *TP53*, *PTEN*, *LKB1*, *ATM* e *CHEK2*, são relevantes para o desencadeamento da doença (revisado em Antoniou e Easton, 2006).

3. Marcadores Tumorais

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea. O aumento da compreensão da biologia deste câncer levou a avanços clínicos no seu tratamento, principalmente na melhoria de sistemas de rastreamento, como a mamografia, e no tratamento da doença ainda em estágio precoce.

A identificação de subgrupos de pacientes que responderiam a terapias específicas é o objetivo principal da medicina molecular moderna. Entretanto, vários obstáculos dificultam este processo: 1) as vias relacionadas com o processo tumoral, assim como a biologia do câncer, não são completamente compreendidas; 2) os modelos pré-clínicos nem sempre refletem a doença humana e não predizem de forma correta os procedimentos clínicos; 3) há heterogeneidade de genes alvos e de suas funções entre os diferentes indivíduos com tipos de tumores similares, podendo ocorrer efeitos clínicos variáveis e não previsíveis; 4) os agentes farmacêuticos muitas vezes acometem células normais além das neoplásicas; 5) e a eficiência do tratamento pode estar limitada a outros fatores, como resistência intrínseca (Osborne et al., 2004).

Os marcadores tumorais podem ser úteis na detecção do câncer em estágio

precoce, no monitoramento da progressão da doença, na avaliação do risco de recorrência e morte na ausência de tratamento (fatores prognósticos) e para prever a resposta à terapia (fatores preditivos) (Sidransky, 2002; Lonning, 2003). Embora sejam necessários muitos marcadores prognósticos confiáveis para se estimar o risco de recorrência e progressão tumoral e elaborar decisões a respeito de terapia adjuvante, as decisões no tratamento pós-operatório são realizadas rotineiramente por meio de marcadores prognósticos padrões (revisado por Onda et al., 2004). Alguns marcadores são comumente utilizados para auxiliar na predição de uma evolução ruim, como o acometimento de linfonodos axilares, tamanho elevado do tumor, grau histológico 3, idade da paciente inferior a 35 anos, invasão linfo-vascular e aumento da expressão de marcadores de proliferação celular (Cianfrocca e Goldstein, 2004; *Primary Therapy of Early Breast Cancer*, 2005).

Um dos fatores mais informativos para auxiliar na predição da evolução da doença é a ocorrência de metástase em linfonodos regionais. Pacientes com nódulos negativos apresentam um bom prognóstico, com 70% das pacientes sem recorrência. A situação muda dramaticamente para casos com envolvimento de linfonodos, onde 70% delas podem apresentar recorrência (Harris et al., 1996; Ouatat et al., 2003). Considerando que somente uma minoria de pacientes linfonodo-negativas apresenta recorrência, existe uma necessidade crucial em identificar marcadores prognósticos precisos que estratifiquem pacientes com riscos extremamente baixos de recorrência, evitando assim o tratamento desnecessário.

A triagem de marcadores prognósticos moleculares para a identificação da doença em um estágio precoce é lógica e de grande importância para a sobrevivência das pacientes. Contudo, até o momento, apenas três marcadores moleculares são rotineiramente utilizados na clínica em câncer de mama: receptor de estrógeno (*ESR*), receptor de progesterona (*PGR*) e o receptor de fator de crescimento epidermal (*HER-2*) (Murphy et al., 2005). Com base nestes receptores comumente detectados utilizando análise de imuno-histoquímica (IHQ), foram estabelecidas basicamente três classes moleculares: os tumores receptores hormonais (*ESR* e *PGR*) positivos; tumores *HER-2* positivos; e tumores

negativos para todos os marcadores utilizados. Estas classes têm sido integradas na predição de prognóstico e tratamento e ajudam a estratificar os pacientes quanto ao risco de recorrência, especialmente em pacientes com acometimento de linfonodos axilares (Robison et al., 2004).

Por ser o tumor mais freqüente entre as mulheres e por sua incidência ter aumentado consideravelmente nos últimos anos, um grande número de estudos epidemiológicos, genéticos e moleculares é realizado com o intuito de compreender o significado desses marcadores moleculares conhecidos, encontrarem possíveis relações entre eles e principalmente descobrir novos marcadores genéticos que possam tornar a prática clínica mais eficaz. Estes estudos têm por objetivo utilizar, de forma mais coerente, as drogas disponíveis para o tratamento e desenvolver terapias baseadas no conhecimento da biologia do processo tumoral (Giancotti, 2006).

3.1. Associação dos genes *ESR*, *PGR* e *HER-2* no desenvolvimento e tratamento do câncer de mama

Em um tecido mamário normal, o estrógeno promove o desenvolvimento do estroma, o crescimento de um extenso sistema de ductos e a deposição de gordura. Este hormônio inicia o crescimento mamário e é responsável pelo aspecto externo das mamas femininas adultas (Vergote et al., 2000; Clemons e Goss, 2001). Em contraposição, a exposição prolongada ao estrógeno no epitélio ductal parece estar relacionado ao desenvolvimento e progressão do câncer de mama (Clemons e Goss, 2001; Fuqua, 2001; Sommer e Fuqua, 2001; Yoshida et al., 2004).

Acredita-se que a exposição cumulativa ao estrógeno media os efeitos de vários fatores de risco para o câncer de mama e também pode promover a proliferação das células neoplásicas, efeitos genotóxicos e indução de aneuploidias (Russo e Russo, 2006).

Os efeitos de regulação e proliferação causados pelo estrógeno são mediados por dois receptores nucleares distintos, o ESR1 e o ESR2 (Kuiper et al., 1996;

Mosselman et al., 1996; Walker, 1999). Estes receptores, mapeados em 6q25.1 e 14q22-q24, respectivamente, podem formar heterodímeros (Ogawa et al., 1998), sugerindo um possível papel do ESR2 como modulador do ESR1 (Gruvberger-Saal et al., 2007). Em adição, a associação com co-ativadores permite a ligação aos elementos de resposta ao estrógeno (EREs), localizados em regiões promotoras de genes alvos. Este complexo molecular liga-se ao DNA ativando a transcrição de genes responsivos ao estrógeno, que por sua vez podem ser responsáveis pelo crescimento tumoral (revisado em Giancotti, 2006).

Os dois receptores apresentam estrutura protéica muito similar (Figura 1) (Speirs e Walker, 2007). Ambos codificam o domínio de ligação ao DNA com 97% de similaridade, que reconhece e se liga aos EREs e compartilham mais do que 50% de similaridade com o domínio de ligação ao hormônio (Mosselman et al., 1996; Enmark et al., 1997; Speirs e Walker, 2007). Os modelos de transativação dos dois receptores são diferentes, pois quando a transcrição é mediada pela proteína ativadora 1 (AP-1), são necessários os fatores AF-1 e AF-2. Entretanto, o domínio AF-1 funcional está ausente no ESR2 (Sanchez et al., 2002).

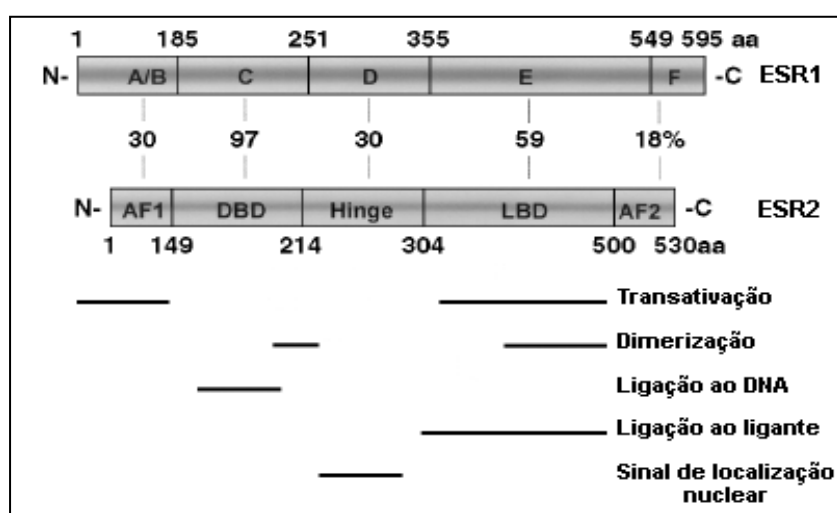


Figura 1. Domínios estruturais e funcionais das proteínas ESR1 e ESR2. Os dois receptores contêm 8 éxons. Estão representados os domínios estruturais (A-F) e funcionais. Está indicada a porcentagem de similaridade de cada ESR, bem como a localização de áreas específicas de ativação. AF-1: Domínio de ativação independente de hormônio; DBD: Domínio de Ligação ao DNA; Hinge: Sinal de localização nuclear; LBD: Domínio de Ligação ao Ligante; AF2: Domínio multifuncional (Baseado em Speirs e Walker, 2007).

Vários relatos em literatura demonstraram que a expressão do ESR é mais elevada no epitélio benigno da mama de pacientes com o carcinoma do que em mulheres que não desenvolveram este tumor, ou mesmo, mulheres pertencentes a grupos de baixo risco em desenvolver o câncer de mama apresentaram nível diminuído de expressão de ESR1 (Khan et al., 1998; Lawson et al., 2002). Estes resultados sugerem que um aumento na expressão do ESR1 é um fator de risco para o desenvolvimento deste carcinoma (Khan et al., 2002) e ainda, que este receptor está envolvido em eventos iniciais da tumorigênese, por alterações moleculares na regulação da expressão do ESR em células de mama pré-neoplásicas (Markopoulos et al., 1988; Ricketts et al., 1991). Outros estudos subseqüentes confirmaram que a exposição ao estrógeno está relacionada ao risco de desenvolver o carcinoma mamário, entretanto, os mecanismos pelos quais o estrógeno contribui para o início e progressão tumoral são complexos e ainda pouco compreendidos (Harvey et al., 1999; Fuqua, 2001; Lawson et al., 2001; Khan et al., 2002; Folkerd et al., 2006).

Em 1998, um estudo colaborativo demonstrou que o perfil de expressão protéica do ESR em carcinomas primários de mama tinha potencial preditivo (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group, 1998). O nível de expressão protéica elevado era indicativo de terapia anti-estrogênica e do aumento do intervalo livre da doença e da sobrevida das pacientes. Atualmente, dois grupos principais de hormonioterápicos são utilizados na clínica; os que modulam a proteína ESR1, como o tamoxifeno, e os que diminuem a síntese de estrógeno por inibir a enzima aromatase, como o letrozol, o anastrozol e o exemestano. Os resultados do *International Breast Cancer Study Group Trial 13-93* (2006) demonstraram claramente a eficácia terapêutica do tamoxifeno em mulheres na pré-menopausa após quimioterapia. Este tratamento diminui o risco de recorrência em aproximadamente 50% das mulheres com tumores ESR1 positivo.

Enquanto muitos carcinomas mamários respondem normalmente ao estrógeno, alguns tumores mais avançados apresentarão a interrupção da expressão do ESR. Isto pode ser em decorrência da inativação do gene após a produção necessária de

fatores de crescimento ou mesmo a ocorrência de mutações no receptor, tornando-o permanentemente ativo. Nestas neoplasias mamárias, a célula não responderá a estimulação do estrógeno e apresentará uma resposta ineficaz às drogas que se baseiam na manipulação das vias mediadas pelo estrógeno, como o tamoxifeno (revisado em Smith, 2006).

O papel do *ESR2* na carcinogênese e progressão do câncer de mama ainda não está claro. Gwendal et al. (2001) sugeriram que o *ESR2* é um importante modulador de proliferação e invasão celular. A perda da expressão deste receptor poderia ser um dos eventos envolvidos na carcinogênese mamária. Resultados preliminares sugerem que o *ESR2* apresenta baixa regulação durante o processo tumoral e é inversamente proporcional à expressão de *ESR1* (Iwao et al., 2000; Knowlden et al., 2000; Bièche et al., 2001; de Cremoux et al., 2002; Jarzabek et al., 2005), ou seja, o nível do transcrito ou da proteína do *ESR2* é mais baixo nos tumores do que no tecido normal (Gustafsson, 1999; Roger et al., 2001; Jarzabek et al., 2005). Em adição, o nível de expressão gênica do *ESR2* apresenta uma maior similaridade entre os tumores do que o *ESR1*. Esta observação sugere que o *ESR2* é mais fortemente regulado nestes tumores, enquanto o *ESR1* apresenta a perda de sua regulação no câncer de mama (Jarzabek et al., 2005).

As lesões com co-expressão dos dois receptores foram associadas a presença de linfonodos acometidos e a tumores de alto grau histológico, ambos indicadores de pior prognóstico (Knowlden et al., 2000; Speirs e Kerin, 2000). Além disso, foi observado que pacientes com expressão protéica positiva dos genes *ESR1* e *ESR2* e tratados com tamoxifeno ou com terapia adjuvante apresentaram uma maior sobrevida livre da doença e uma maior sobrevida global, enquanto as pacientes com tumores *ESR1* e *ESR2* negativos apresentaram um pior prognóstico (Nakopoulou et al., 2004). Entretanto, Cullen et al. (2001) observaram que os anti-estrogênios são capazes de bloquear o efeito estimulador do *ESR1*, mas agem como agonistas na presença de *ESR2*. Estas descobertas sugerem que *ESR2* pode estar envolvido na resistência a esses tratamentos e a análise deste gene ou seu produto pode predizer a sensibilidade/resistência à terapia.

Além do receptor de estrógeno, o gene *PGR*, mapeado em 11q22, também contribui para a primeira categoria de fatores prognósticos no câncer de mama (Surowiak et al., 2004). O seu ligante, o hormônio progesterona, faz parte do grupo das progestinas, um dos hormônios sexuais ovarianos. As progestinas atuam na preparação final do útero para a gravidez e das mamas para a lactação (Pinho, 1997). Os lóbulos e alvéolos da mama desenvolvem-se em pequena extensão sob a influência isolada do estrógeno, mas é a progesterona e a prolactina que proporcionam o crescimento e a função destas estruturas (Clemons e Goss, 2001).

O *PGR* apresenta duas isoformas principais: *PGR-A* e *PGR-B* (Horwitz et al., 1985). Estudos utilizando modelo animal sugerem que as duas isoformas comportam-se, em tecido específico, como ativadores transcricionais distintos (Mulac-Jericevic et al., 2000; 2003). O gene *PGR-B* tem função de promoção e ativação da transcrição, enquanto o gene *PGR-A* é transcricionalmente inativo e atua como um repressor transdominante ligante-dependente da atividade transcricional do receptor hormonal esteróide (Giangrande et al., 1997). *PGR-A* e *PGR-B* ligam-se aos elementos de resposta a progesterona (PREs) no DNA. Entretanto, o *PGR-A* não apresenta um dos três domínios de ativação transcricional que está presente em *PGR-B* (Vegeto et al., 1993). Neste contexto, *PGR-A* pode agir como um potente repressor negativo do *PGR-B* (Chalbos e Galtier, 1994). As duas proteínas são semelhantes, exceto que na *PGR-A* faltam os primeiros 164 aminoácidos presentes na *PGR-B*, e são traduzidas de distintos subgrupos de mRNA transcritos de um único gene sob o controle de dois promotores distintos (Kastner et al., 1990). Alterações na expressão das duas isoformas parecem estar associadas à modulação da ação da progesterona (Ariga et al., 2001). Jacobsen et al. (2005) mostraram que a razão entre a expressão das duas isoformas (*PGR-A*: *PGR-B*), mesmo na ausência da progesterona, influencia na biologia e no tratamento de tumores ESR positivos. Além disso, os autores sugeriram que a isoforma *PGR-A* é funcionalmente dominante em relação à *PGR-B* em momentos de escassez de progesterona e que tumores ricos em *PGR-A* são mais agressivos.

O PGR é uma proteína dependente de estrógeno, isto é, ela é sintetizada devido a estimulação de células alvo com estrógeno (Surowiak et al., 2001; Zaslowski et al., 2005). Aproximadamente 75% dos tumores de mama primários expressam ESR e mais da metade destes expressam concomitantemente o PGR. A detecção de tumores ESR1 positivo / PGR positivo é mais comum do que tumores ESR1 positivo / PGR negativo (Kim et al., 2006).

Pelo fato da transcrição do *PGR* ser aumentada e mantida pelo estrógeno em tumores mamários, a detecção da expressão elevada deste gene em pacientes com câncer de mama apresenta um ensaio funcional, pois isto indica que a via do ESR está intacta, mesmo se os tumores são relatados como ESR negativo. Ao contrário do *ESR1*, o *ESR2* parece não induzir a transcrição do *PGR* (Esteva e Hortobagyi, 2004). Estes achados podem indicar indiretamente que o *ESR2* apresenta uma função menor na definição da resposta ao tratamento hormonal em câncer de mama (Nakopoulou et al., 2004).

A presença de receptores de progesterona juntamente com os de estrógeno nos tumores, prediz a resposta à terapia hormonal com tamoxifeno. Aproximadamente 70% dos tumores ESR positivo / PGR positivo respondem ao tratamento com tamoxifeno, mas somente 34% dos tumores ESR positivo / PGR negativo são responsivos a esta terapia (revisado em Robison et al., 2004).

A ausência de expressão dos genes *ESR* e *PGR* foi correlacionada com recorrência precoce e menor sobrevida das pacientes com câncer de mama (BozcuK et al., 2001; Hayashi et al., 2003). Os tumores de mama PGR negativos apresentam uma taxa de proliferação mais alta e estão mais suscetíveis a expressão elevada de receptores de fator de crescimento, como por exemplo, o *HER-2* (Lebeau et al., 2003; Arpino et al., 2005). Segundo Arpino et al. (2005), alterações na expressão destes receptores poderiam contribuir para a resistência ao tamoxifeno observada em um subgrupo de tumores. Em adição, os tumores com ausência de expressão protéica ou níveis baixos dos transcritos *ESR* e *PGR* estão mais frequentemente associados com tumores de grau histológico 3

(Knowlden et al., 2000; Jarvinen et al., 2000; Bièche et al., 2001; revisado em Simpson et al., 2005).

Entre os marcadores de proliferação celular utilizados na clínica, está o Ki-67, um antígeno nuclear expresso em células que estão em divisão, durante a metade da fase G1, em S e G2 tem seu nível aumentado e apresenta um pico na fase M do ciclo celular (Gerdes et al., 1984). Esta proteína é rapidamente catabolizada no final da fase M e permanece não detectável no restante das células (fase G0 e início da fase G1) (Fitzgibbons et al., 2000). A marcação por IHQ do Ki-67 permite estimar o índice de proliferação celular dos tumores (Collechi et al., 1998). Em tumores de mama invasivos, este antígeno pode ser utilizado para estratificar os pacientes nas categorias de bom a mau prognóstico e ainda, apresenta correlação com a resposta clínica a quimioterápicos (revisado em Tan et al., 2005). Entretanto, o papel preciso do Ki-67 na regulação do ciclo celular permanece desconhecido. Um fato interessante comumente detectado em muitas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas é a existência de uma correlação positiva entre a expressão do ESR1 e do Ki-67 (Chappell et al., 2000). Esta expressão concomitante pode representar uma importante alteração molecular no início do desenvolvimento tumoral. Entretanto, nem todos os tumores apresentam expressão concomitante de ambos os genes (revisado em Ding et al., 2004). Vários autores observaram uma correlação negativa entre a expressão gênica ou protéica do ESR1 (ou do PGR) e o nível do Ki-67 (Ding et al., 2004; Burcombe et al., 2005; Jarzabek et al., 2005). Devido a ausência da expressão do Ki-67, os tumores ESR1 positivos estão significativamente associados ao baixo índice mitótico, sugerindo que a expressão do ESR1 está associada à carcinogênese das neoplasias de mama bem diferenciadas e menos diretamente com a proliferação celular (Ding et al., 2004; Tan et al., 2005). Jarzabek et al. (2005) observaram que células mamárias epiteliais normais que expressam ESR1 não proliferam e não produzem marcadores de proliferação celular. Os autores sugeriram que apesar da participação do ESR1 no processo de proliferação celular, este receptor sozinho pode agir como um fator inibitório de proliferação.

Outro marcador preditivo e/ou prognóstico no câncer de mama é o gene *HER-2*, mapeado em 17q11.2-q12, um receptor do tipo tirosina quinase transmembrânico que participa no crescimento e diferenciação de células normais (Hudziak et al., 1987; Slamon et al., 1989; Seshadri et al., 1996). A via de sinalização induzida pela ativação da oncoproteína *HER-2* pode levar a inibição da apoptose e facilitar a proliferação celular (Pupa et al., 2005).

Arpino et al. (2004) e Come et al. (2006) relataram que o nível de expressão aumentada do *HER-2* está associado com a resistência ao tamoxifeno. Geralmente, a expressão elevada do *HER-2* está correlacionada com a expressão negativa dos receptores hormonais *ESR1* e *PGR* (Arpino et al., 2004; Sagara et al., 2004). Atualmente, as pacientes com níveis aumentados de expressão deste gene e doença invasiva e metastática se beneficiam da terapia com o Trastuzumab (Herceptin[®], Genentech), um anticorpo monoclonal humanizado contra o domínio extracelular do *HER-2*, bloqueando a ação deste receptor (revisado em Robison et al., 2004).

O método de IHQ é o mais utilizado para definir o padrão de expressão do *HER-2*. Entretanto, os resultados de IHQ em amostras de arquivo (tecidos fixados em formalina e em blocos em parafina) têm sido discrepantes, principalmente por ser um ensaio qualitativo e subjetivo a alta variabilidade entre os observadores, além da ocorrência de artefatos técnicos (Li-Ning-T et al., 2005). Alguns estudos indicam que a estratificação dos casos com amplificação gênica, utilizando as técnicas de FISH (hibridação *in situ* fluorescente) e CISH (hibridação *in situ* cromogênica), fornece uma melhor informação prognóstica e está associada a uma melhor resposta terapêutica. Em adição, foi observado que o subgrupo de tumores com escore 2+ não responde ao tratamento com Herceptin, enquanto os casos com amplificação respondem favoravelmente (revisado em Madrid e Lo, 2004). Uma outra metodologia que está sendo utilizada em vários estudos para a análise de expressão do *HER-2* é a PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR), uma tecnologia baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) (Bièche et al., 1999; Pellegrini et al., 2003; Ntoulia et al., 2006). A qRT-PCR é uma técnica eficaz em avaliar um grande número de amostras com quantidades mínimas de tecido. Esta é uma técnica simples e rápida e não

necessita de manipulação do produto após a amplificação, evitando problemas de contaminação.

A amplificação ou expressão aumentada deste gene ocorre em 10-30% dos cânceres de mama (Slamon et al., 1989; Yan, 1998; Bièche et al., 2001) e está associada, na maioria das vezes, com um fenótipo tumoral mais agressivo, pior prognóstico e recidivas em períodos curtos (Slamon et al., 1987; Presset al., 1997; Menard et al., 2001; Owens et al., 2004; Ross et al., 2004). A expressão elevada deste gene está envolvida com o aumento de linfonodos comprometidos e com o surgimento de metástases (Borg et al., 1990; Kallioniemi et al., 1991; Fusun et al., 2005).

A amplificação deste gene promove um aumento no nível de expressão (aproximadamente 100 vezes maior que o nível normal) na superfície das células tumorais. O aumento da expressão parece propiciar a formação de homo e heterodímeros com propriedade de sinalização diferente do padrão normal. As variações na ativação do receptor pelo ligante e a composição dos dímeros de HER-2 levam a diferentes vias de sinalização. A ativação do HER-2 pode causar alteração na expressão de genes que influenciam na transcrição, tradução e estabilidade de diferentes proteínas. Além disso, estas alterações afetam a proliferação, migração, adesão e sobrevivência das células neoplásicas (revisado em Meric-Bernstam e Hung, 2006). Entretanto, o mecanismo da amplificação seletiva do *HER-2* ainda permanece desconhecido (Burstein, 2005).

Até o momento, a informação sobre todos os fatores prognósticos não é precisa e acurada o suficiente para identificar aquelas pacientes que realmente requerem e se beneficiariam da terapia. Embora os indicadores prognósticos convencionais tais como *status* do linfonodo, expressão do receptor de estrógeno ou o grau histológico sejam extremamente valiosos, é ainda particularmente difícil prever quais pacientes desenvolverão metástases e quais possuem um baixo risco de evolução da doença. Desse modo, a maioria das pacientes é rotineiramente tratada com quimioterapia adjuvante ou terapia hormonal para reduzir o risco de metástases à distância. Contudo, 70 a 80% das pacientes tratadas teriam sobrevivido sem o tratamento, e desse modo sofreram as

conseqüências sem necessitarem (National Institute of Health Consensus Development Panel, 2001). Portanto, fatores prognósticos mais refinados são necessários para evitar o tratamento desnecessário das pacientes que não necessitam de tratamento tóxico sistêmico (Reis-Filho et al., 2006). A informação prognóstica que pode identificar aquelas mulheres que não necessitam de quimioterapia, daquelas que tem claro benefício e das que apresentam respostas diversas ao tratamento é a chave para o avanço no tratamento do câncer de mama.

4. Análise de expressão gênica em larga escala

Desde o advento dos anticorpos aplicados em cortes de tecidos tumorais fixados em formalina e em blocos em parafina, foi observada a ascensão e a queda de marcadores biológicos preditivos e prognósticos. Até o final da década de 90 a maneira utilizada para identificar os marcadores biológicos consistia em testar um ou alguns poucos marcadores em amostras tumorais de um grupo de pacientes (Reis-Filho et al., 2006).

A heterogeneidade celular e molecular dos tumores de mama e o grande número de genes potencialmente envolvidos no controle do crescimento, na morte e na diferenciação celular, enfatizam a importância de se estudar as múltiplas alterações genéticas que podem ocorrer nas células tumorais. A análise de expressão gênica tem demonstrado a capacidade de identificar as características que refletem a biologia molecular e o comportamento do tumor, podendo revelar novos marcadores genéticos e os que estão relacionados a recorrência e progressão da doença. Esta análise tem reforçado a idéia que o câncer de mama é uma doença extremamente heterogênea, sendo esse padrão também compartilhado pelo aspecto clínico e de resposta terapêutica.

Atualmente, podem ser testadas centenas a milhares de seqüências representativas de genes em um único experimento. A análise de expressão gênica em larga escala, denominada de *microarray*, permite a avaliação da expressão de um grupo pré-determinado de genes. Esta análise fornece assinaturas genéticas definidas, uma

coleção de genes que classificam os tumores em grupos distintos, sendo consideradas como mais efetivas do que os marcadores prognósticos utilizados atualmente na rotina clínica, pois essas assinaturas permitem englobar as interações gênicas.

Particularmente, os *cDNAs microarrays* são compostos por uma variedade de segmentos de DNA depositados em uma superfície sólida, como por exemplo, uma lâmina de vidro. As seqüências depositadas servem como alvos para hibridação do cDNA, que representa o RNA mensageiro extraído dos tecidos tumorais ou normais, marcados com diferentes fluorocromos. Um outro tipo de *microarrays* são os de oligonucleotídeos, que seguem os mesmos princípios dos *microarrays* de cDNA, embora alguns deles não necessitem de hibridação competitiva com uma amostra de referência (tecido normal) e o nível de expressão é baseado em um modelo algorítmico ao invés de uma razão direta entre as amostras de tumor e normal (revisado em Reis-Filho et al., 2006).

Recentemente, esta tecnologia tem sido utilizada em diversos estudos para analisar a expressão gênica diferencial em larga escala em tumores de mama (Perou et al., 1999; 2000; Sorlie et al., 2001; Ahr et al., 2002; van't Veer et al., 2002; van de Vijver et al., 2002; Sorlie et al., 2003; Sotiriou et al., 2003; Bertucci et al., 2004; Onda et al., 2004; Piccart et al., 2004; Wang et al., 2005; Weigelt et al., 2005; Sorlie et al., 2006; Schuetz et al., 2006; Jumppanen et al., 2007; Ma et al., 2007; Naderi et al., 2007).

4.1. Predição da evolução clínica baseada em dados de microarrays

Um grande número de plataformas *microarray* de expressão está sendo utilizado em estudos recentes para avaliar sua aplicação prognóstica em câncer de mama. Os primeiros estudos, realizados pelos grupos de Perou et al. (1999; 2000) e Sorlie et al. (2001; 2003), demonstraram que os carcinomas mamários poderiam ser classificados em subtipos específicos baseado na similaridade ou diferença de seus perfis de expressão. Os autores realizaram uma análise de *clusterização* hierárquica e classificaram os tumores em quatro grupos principais: os tumores do subtipo luminal, que apresentam expressão elevada do receptor de estrógeno e mostram perfis de expressão similares às células luminais da

glândula mamária normal, com expressão das queratinas 8 e 18; os tumores do subtipo basalóide, que têm expressão negativa dos receptores hormonais e expressam genes geralmente detectados em células do epitélio basal/mioepitelial, como as queratinas 5 e 6; os tumores *HER-2*, que apresentam expressão elevada deste gene com concomitante amplificação gênica; e os tecidos denominados de “mama normal”, que durante a análise de *clusterização* ficaram agrupados com amostras de fibroadenoma e mama normal. A sobrevida das pacientes com tumores que apresentavam expressão elevada de genes regulados pelo estrógeno foi significativamente maior em relação as pacientes com tumores que expressavam baixos níveis de genes regulados pelo estrógeno ou que expressavam o gene *HER-2* (Sorlie et al., 2001). Perou et al. (2000) e Sorlie et al. (2001) expandiram a série de tumores avaliados e mostraram que o subtipo luminal poderia ainda ser subdividido em três grupos: luminal A, B e C. Em comparação com os carcinomas luminais, tem sido observado que os tumores do tipo basalóide apresentam as mais elevadas taxas de proliferação e uma pior evolução clínica (Sorlie et al., 2001; 2003).

Mais recentemente, Sorlie et al. (2006) avaliaram seis tumores do tipo luminal A e seis tumores do subtipo basalóide para determinar uma assinatura gênica específica para cada subtipo de neoplasia. Entre os genes envolvidos com o grupo luminal A estavam alguns marcadores previamente identificados, como o *ESR1*, *GATA3* e *LIV-1* (Sorlie et al., 2003), bem como o *EMP-2*. Os tumores basalóides apresentaram co-expressão dos genes *KRT17*, *LAMC2*, *LBR*, *DSC2*, *MRAS* e *CDCA7*.

Van't Veer et al. (2002) identificaram uma assinatura gênica que incluía 70 genes envolvidos na regulação do ciclo celular, invasão, metástase e angiogênese. Esta assinatura poderia classificar pacientes jovens (<55 anos) sem acometimento de linfonodos em dois grupos: de bom prognóstico, sem recorrência após cinco anos de seguimento; e prognóstico ruim, com recorrência/metástase antes dos cinco anos. Estes 70 genes foram validados pelos mesmos autores em 295 pacientes com carcinoma de mama primário e concluíram que este modelo de expressão gênica é mais eficaz do que os sistemas

baseados em critérios clínicos e histológicos em prever a evolução da doença em pacientes jovens com câncer de mama (van de Vijver et al., 2002).

Esta assinatura de 70 genes, comercialmente disponível em *MammaPrint array* (Agendia BV, Amsterdam, The Netherlands), será utilizada pela Organização Europeia para Pesquisa e Tratamento do Câncer em um estudo denominado MINDACT (*microarray in node negative disease may avoid chemotherapy*). Neste estudo, uma comparação prospectiva com as ferramentas atuais de critérios clínico-patológicos será realizada em um grupo de 6000 pacientes sem acometimento de linfonodos (revisado em Fu e Jeffrey, 2007). Anteriormente, um teste primário foi realizado por Piccart et al. (2004) com um grupo de 301 pacientes, acompanhados por, no mínimo, 10 anos. Este estudo demonstrou que o perfil de assinatura dos 70 genes constituía um forte fator prognóstico. Entretanto, a magnitude do efeito foi menor do que relatado previamente.

Uma sucessão de outros estudos também demonstrou modelos de expressão gênica compatíveis com características de pior prognóstico. Entre estes, Sorlie et al. (2003) identificaram um grupo de pior prognóstico caracterizado pela presença de uma assinatura celular basal (ou mioepitelial). Em um grupo de 115 tumores de mama sem envolvimento de linfonodos, Wang et al. (2005) encontraram uma assinatura de 60 genes para pacientes ESR positivo e de 16 genes para os ESR negativo. Baseado na estratificação realizada por van't Veer et al. (2002) (pacientes sem acometimento de linfonodos), foi observada uma sobreposição de apenas três genes. Segundo os autores, a diferença no grupo de pacientes, técnicas e materiais utilizados pode ser uma explicação plausível para esta grande discordância entre os experimentos. Entretanto, foi observada uma considerável sobreposição nestes dois trabalhos quando consideradas as vias genéticas comuns envolvidas na progressão tumoral (Wang et al., 2005).

Outra informação prognóstica importante é a graduação histológica do câncer de mama. Ma et al. (2003) encontraram duas assinaturas distintas para diferenciar tumores de baixo grau (I) quando comparados com os de alto grau (III), baseado em um ensaio de

DNA *microarray*. Posteriormente, Sotiriou et al. (2006) identificaram uma assinatura de 97 genes que designaram de *gene expression grade index* (GGI). Esta lista foi composta principalmente por genes envolvidos na regulação do ciclo celular e na proliferação. Os tumores de grau II foram divididos em dois grupos, com risco baixo e elevado de recorrência, demonstrando que o GGI pode ser utilizado para classificar de forma mais acurada os tumores intermediários.

Estudos em larga escala avaliaram também o modelo de expressão dos tecidos específicos acometidos por metástases. Utilizando um modelo de linhagem celular ou tumores primários, com e sem metástase óssea, vários autores identificaram um grupo de genes responsáveis pelo aparecimento de metástase óssea e pulmonar (Kang et al., 2003; Woelfle et al., 2003; Minn et al., 2005; Smid et al., 2006). A habilidade em prever o sítio específico da metástase, baseado em modelos de expressão gênica de tumores primários, pode permitir uma intervenção terapêutica específica e auxiliar no aumento da sobrevida da paciente (revisado em Fu e Jeffrey, 2007).

4.2. Predição de tratamento

Com os avanços da biologia molecular será possível ter um modelo de expressão gênica discriminatório na predição do tratamento do câncer de mama de forma mais eficaz e segura. Vários estudos têm por objetivo determinar uma assinatura gênica referente a resposta dos pacientes a um quimioterápico ou hormonioterápico específico.

Chang et al. (2003) utilizaram 24 biópsias mamárias e demonstraram que com um classificador de 92 genes é possível prever, com acurácia, a resposta das pacientes ao tratamento com docetaxel neoadjuvante. Em uma análise de validação, os autores classificaram corretamente 10 de 11 pacientes responsivas e 11 de 13 não responsivas a droga. Resultados semelhantes foram encontrados por Iwao-koizumi et al. (2005) que determinaram uma assinatura de 85 genes, com 80% de exatidão. As duas análises foram realizadas por diferentes procedimentos, Chang et al. (2003) utilizaram uma

plataforma de 12.625 sondas (HgU95-Av2 GeneChip, Affymetrix), enquanto Iwao-koizumi et al. (2005) usaram uma metodologia baseada na quantificação competitiva pela reação em cadeia da polimerase (ATAC-PCR) contendo 2.453 genes. Estes estudos apresentaram sobreposição dos genes calreticulina, glutathione peroxidase 4 e sintase ATP. Iwao-koizumi et al. (2005) sugeriram que esta baixa sobreposição é decorrência da baixa probabilidade (2%) de que os 2.453 genes estejam presentes na plataforma da Affymetrix.

Um outro estudo, realizado por Ayers et al. (2004), avaliou a resposta à terapia neoadjuvante com paclitaxel, fluorouracil, doxorubicina e ciclofosfamida (T/FAC) em 42 amostras. Os experimentos foram realizados com uma plataforma contendo 30.721 clones. Um modelo de 74 genes foi observado e demonstrou 78% de acurácia, sugerindo a identificação de um perfil de expressão gênica envolvido com a predição da resposta à quimioterapia (revisado em Abramovitz e Leyland-Jones, 2006).

Jansen et al. (2005) avaliaram, em uma plataforma de 18.000 seqüências, amostras de pacientes com carcinoma primário de mama com expressão positiva do receptor de estrógeno. Dentre as pacientes, 52 responderam à terapia e 60 apresentaram progressão da doença. Oitenta e um genes estavam diferencialmente expressos entre as responsivas e as não responsivas ao tamoxifeno, sendo que 44 genes selecionados foram capazes de prever resistência ao tamoxifeno com 77% de exatidão.

De forma global, as análises de *microarray* em tumores de mama têm anunciado uma nova era da classificação molecular dos tumores, com a identificação de subtipos específicos que produzem novas abordagens na predição da evolução da doença e na resposta a terapia. Embora os resultados sejam promissores, este tipo de investigação é limitado à avaliação das seqüências plotadas. Há a necessidade de padronizações quanto aos ensaios moleculares e clínicos antes que os *microarrays* sejam utilizados como ferramentas para as decisões clínicas (Abramovitz e Leyland-Jones, 2006; Reis-Filho et al., 2006).

5. Referências

- ABRAMOVITZ M, LEYLAND-JONES B. A systems approach to clinical oncology: focus on breast cancer. *Proteome Sci* 4:5, 2006.
- AHR A, KARN T, SOLBACH C, SEITER T, STREBHARDT K, HOLTRICH U, KAUFMANN M. Identification of high risk breast cancer patients by gene expression profiling. *Lancet* 359:131-132, 2002.
- ANDERSON DE, BADZIOCH MD. Familial effects of prostate and other cancers on lifetime breast cancer risk. *Breast Cancer Res Treat.* 28:107-113, 1993.
- ANTONIOU AC, EASTON DF. Models of genetic susceptibility to breast cancer. *Oncogene* 25:5898-5905, 2006.
- ARIGA N, SUZUKI T, MORIYA T, KIMURA M, INOUE T, OHUCHI N, SASANO H. Progesterone receptor A and B isoforms in the human breast and its disorders. *Jpn J Cancer Res* 92:302-308, 2001.
- ARPINO G, BARDOU VV, CLARK GM, ELLEDGE RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res* 6:149-156, 2004.
- ARPINO G, WEISS H, LEE AV, SCHIFF R, DE PLACIDO S, OSBORNE CK, ELLEDGE RM. Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst* 97:1254-1261, 2005.
- AYERS M, SYMMANS WF, STEC J, DAMOKOSH AI, CLARK E, HESS K, LECOCKE M, METIVIER J, BOOSER D, IBRAHIM N, VALERO V, ROYCE M, ARUN B, WHITMAN G, ROSS J, SNEIGE N, HORTOBAGYI GN, PUSZTAI L. Gene expression profiles predict complete pathologic response to neoadjuvant paclitaxel and fluorouracil, doxorubicin, and cyclophosphamide chemotherapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 22:2284-2293, 2004.
- BERTUCCI F, FINETTI P, ROUGEMONT J, CHARAFE-JAUFFRET E, NASSER V, LORIOD B, CAMERLO J, TAGETT R, TARPIN C, HOUVENAEGHEL G, NGUYEN C, MARANINCHI D, JACQUEMIER J, HOULGATTE R, BIRNBAUM D, VIENS P. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. *Cancer Res.* Dec. 64:8558-8565. 2004.
- BIÈCHE I, ONODY P, LAURENDEAU I, OLIVI M, VIDAUD D, LIDEREAU R, VIDAUD M. Real-time reverse transcription-PCR assay for future management of ERBB2-based clinical applications. *Clin Chem* 45:1148-1156, 1999.
- BIÈCHE I, PARFAIT B, LAURENDEAU I, GIRAULT I, VIDAUD M, LIDEREAU R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 20:8109-8115, 2001.
- BORG A, TANDON AK, SIGURDSSON H, CLARK GM, FERNÖ M, FUQUA SA, KILLANDER D, MCGUIRE WL. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. *Cancer Res* 50:4332-4337, 1990.
- BOZCUK H, USLU G, PEŞTERELI E, SAMUR M, OZDOĞAN M, KARAVELI S, SARGIN F, SAVAŞ B. Predictors of distant metastasis at presentation in breast cancer: a study also evaluating associations among common biological indicators. *Breast Cancer Res Treat* 68:239-248, 2001.
- BRODY JG, RUDEL RA, MICHELS KB, MOYSICH KB, BERNSTEIN L, ATTFIELD KR, GRAY S. Environmental pollutants, diet, physical activity, body size, and breast cancer: where do we stand in research to identify opportunities for prevention? *Cancer* 109:2627-2634, 2007.

- BURCOMBE RJ, MAKRIS A, RICHMAN PI, DALEY FM, NOBLE S, PITTAM M, WRIGHT D, ALLEN SA, DOVE J, WILSON GD. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 92:147-155, 2005.
- BURSTEIN HJ. The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers. *N Engl J Med* 353:1652-1654, 2005.
- CHALBOS D, GALTIER F. Differential effect of forms A and B of human progesterone receptor on estradiol-dependent transcription. *J Biol Chem* 269:23007-23012, 1994.
- CHANG JC, HILSENBECK SG, FUQUA SA. Genomic approaches in the management and treatment of breast cancer. *Br J Cancer* 92:618-624, 2005.
- CHANG JC, WOOTEN EC, TSIMELZON A, HILSENBECK SG, GUTIERREZ MC, ELLEDGE R, MOHSIN S, OSBORNE CK, CHAMNESS GC, ALLRED DC, O'CONNELL P. Gene expression profiling for the prediction of therapeutic response to docetaxel in patients with breast cancer. *Lancet* 362:362-369, 2003.
- CHAPPELL SA, JOHNSON SM, SHAW JA, WALKER RA. Expression of oestrogen receptor alpha variants in non-malignant breast and early invasive breast carcinomas. *J Pathol* 192:159-165, 2000.
- CIANFROCCA M, GOLDSTEIN LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist* 9:606-616, 2004.
- CLEMONS M, GOSS P. Estrogen and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 344:276-285, 2001.
- COLLECHI P, BALDINI E, GIANNESI P, NACCARATO AG, PASSONI A, GARDIN G, RONCELLA M, EVANGELISTA G, BEVILACQUA G, CONTE PF. Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumour proliferativy activity, bcl-2 expression and the relationship between tumours regression and biological markers. *Eur J Cancer* 34:1701-1704, 1998.
- COLLINS JA, BLAKE JM, CROSIGNANI PG. Breast cancer risk with postmenopausal hormonal treatment. *Hum Reprod Update* 11:545-560, 2005.
- COME SE, BUZDAR AU, INGLE JN, ARTEAGA CL, BROWN M, DOWSETT M, HILSENBECK SG, KUMAR R, JOHNSTON SRD, LEE AV, PAIK S, PRITCHARD KI, WINER EP, HART C. Proceedings of the fifth international conference on recent advances and future directions in endocrine therapy for breast cancer: conference summary statement. *Clin Cancer Res* 12:997-1000, 2006.
- CONNER P. Breast response to menopausal hormone therapy aspects on proliferation, apoptosis and mammographic density. *Ann Med* 39:28-41, 2007.
- CULLEN R, MAGUIRE TM, McDERMOTT EW, HILL AD, O'HIGGINS NJ, DUFFY MJ. Studies on oestrogen receptor-alpha and -beta mRNA in breast cancer. *Eur J Cancer* 37:1118-1122, 2001.
- DE CREMOUX P, TRAN-PERENNOU C, ELIE C, BOUDOU E, BARBAROUX C, POUPON MF, DE RYCKE Y, ASSELAIN B, MAGDELÉNAT H. Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. *Biochem Pharmacol* 64:507-515, 2002.
- DEVILEE P, CORNELISSE CJ. Somatic genetic changes in human breast cancer. *Biochim Biophys Acta* 1198: 113-130, 1994.

- DING SL, SHEU L-F, YU J-C, YANG TL, CHEN B, LEU FJ, SHEN CY. Expression of estrogen Receptor- α and Ki67 in relation to pathological and molecular features in early-onset infiltrating ductal carcinoma. *J Biomed Sci* 11:911-919, 2004.
- EARLY BREAST CANCER TRIALISTS COLLABORATIVE GROUP: Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. *Lancet* 351:1451-1467, 1998.
- ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, GRANDIEN K, LAGERCRANTZ S, LAGERCRANTZ J, FRIED G, NORDENSKJÖLD M, GUSTAFSSON JA. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 82:4258-4265, 1997.
- ESTEVA FJ, HORTOBAGYI GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 6:109-118, 2004.
- FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, THOR AD, ALLRED DC, CLARK GM, RUBY SG, O'MALLEY F, SIMPSON JF, CONNOLLY JL, HAYES DF, EDGE SB, LICHTER A, SCHNITT SJ. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 124:966-978, 2000.
- FOLKERD EJ, MARTIN LA, KENDALL A, DOWSETT M. The relationship between factors affecting endogenous oestradiol levels in postmenopausal women and breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:250-255, 2006.
- FOULKES WD. BRCA1 and BRCA2: chemosensitivity, treatment outcomes and prognosis. *Fam Cancer* 5:135-142, 2006.
- FU J, JEFFREY SS. Transcriptomic signatures in breast cancer. *Mol Biosyst* 3:466-472, 2007.
- FUQUA S. The role estrogen receptor in breast cancer metastasis. *J Mam Gland Neopl* 6:407-417, 2001.
- FUSUN T, SEMSI A, CEM U, MEVLUT T, ZAFER K, KAZIM U, SELCUK B. Association of HER-2/neu overexpression with the number of involved axillary lymph nodes in hormone receptor positive breast cancer patients. *Exp Oncol* 27:145-149, 2005.
- GERDES J, LEMKE H, BAISCH H, WACKER HH, SCHWAB U, STEIN H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 133:1710-5, 1984.
- GIANCOTTI V. Breast cancer markers. *Cancer Lett* 243:145-159, 2006.
- GIANGRANDE PH, POLLIO G, McDONNELL DP. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. *J Biol Chem* 272:32889-32900, 1997.
- GRUVBERGER-SAAL SK, BENDAHL PO, SAAL LH, LAAKSO M, HEGARDT C, EDEN P, PETERSON C, MALMSTROM P, ISOLA J, BORG A, FERNO M. Estrogen receptor beta expression is associated with tamoxifen response in ERalpha-negative breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 13:1987-1994, 2007.
- GUSTAFSSON JA. Estrogen receptor beta-a new dimension in estrogen mechanism of action. *J Endocrinol* 163:379-383, 1999.
- GWENDAL L, DAMIEL B, ANNICK L, CORINE C, FRANC O, VIGNON ER. Inhibits Proliferation and Invasion of Breast Cancer Cells. *Endocrinol* 142:4120-4130, 2001.

- HARRIS CC, HOLLSTEIN M. Clinical implications of the p53 tumor-suppressor gene. *N Engl J Med* 329:1318-1327, 1993.
- HARRIS JR, LIPPMAN ME, MORROW M, HELLMAN S. In: *Diseases of the breast*. 1^o ed. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia, New York, 1996.
- HARVEY JM, CLARK GM, OSBORNE CK, ALLRED DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 17:1474-1481, 1999.
- HAYASHI SI, EGUCHI H, TANIMOTO K, YOSHIDA T, OMOTO Y, INOUE A, YOSIDA N, YAMAGUCHI Y. The expression and function of estrogen receptor a and b in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-Related Cancer* 10:193-202, 2003.
- HORWITZ KB, FRANCIS MD, WEI LL. Hormone-dependent covalent modification and processing of human progesterone receptors in the nucleus. *DNA* 4:451-460, 1985.
- HUDZIAK RM, SCHLESSINGER J, ULRICH A. Increased expression of the putative growth-factor receptor p185her2 causes transformation and tumorigenesis of nih-3t3 cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 84:7159-7163, 1987.
- INCA (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER). Estimativa da incidência e mortalidade por câncer no Brasil 2006. Disponível em: <http://www.inca.gov.br>. Acesso em 11 de abril de 2006.
- INTERNATIONAL BREAST CANCER STUDY GROUP. Tamoxifen after adjuvant chemotherapy for premenopausal women with lymph node-positive breast cancer. International Breast Cancer Study Group Trial 13-93. *J Clin Oncol* 24:1332-1341, 2006.
- IWAO K, MIYOSHI Y, EGAWA C, IKEDA N, TSUKAMOTO F, NOGUCHI S. Quantitative analysis of estrogen receptor-alpha and -beta messenger RNA expression in breast carcinoma by real-time polymerase chain reaction. *Cancer* 89:1732-1738, 2000.
- IWAO-KOIZUMI K, MATOBA R, UENO N, KIM SJ, ANDO A, MIYOSHI Y, MAEDA E, NOGUCHI S, KATO K. Prediction of docetaxel response in human breast cancer by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 23:422-431, 2005.
- JACOBSEN BM, SCHITTONI SA, RICHER JK, HORWITZ KB. Progesterone-independent effects of human progesterone receptors (PRs) in estrogen receptor-positive breast cancer: PR isoform-specific gene regulation and tumor biology. *Mol Endocrinol* 19:574-587, 2005.
- JANSEN MP, FOEKENS JA, VAN STAVEREN IL, DIRKZWAGER-KIEL MM, RITSTIER K, LOOK MP, MEIJER-VAN GELDER ME, SIEUWERTS AM, PORTINGEN H, DORSSERS LC, KLIJN JG, BERNS EM. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. *J Clin Oncol* 23:732-740, 2005.
- JARVINEN TAH, PELTO-HUIKKO M, HOLLI K, ISOLA J. Estrogen Receptor b Is Coexpressed with ERa and PR and Associated with Nodal Status, Grade, and Proliferation Rate in Breast Cancer. *Am J Pathol* 156, 2000.
- JARZABEK K, KODA M, KOZLOWSKI L, MITTRE H, SULKOWSKI S, KOTTLER ML, WOLCZYNSKI S. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of oestrogen receptors alpha and beta in human primary breast cancer: correlation with proliferation marker Ki-67 and clinicopathological factors. *Eur J Cancer* 41:2924-2934, 2005.

- JUMPPANEN M, GRUVBERGER-SAAL S, KAURANIEMI P, TANNER M, BENDAHL PO, LUNDIN M, KROGH M, KATAJA P, BORG A, FERNÖ M, ISOLA J. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Res* 9:16, 2007.
- KALLIONIEMI OP, HOLLI K, VISAKORPI T, KOIVULA T, HELIN HH, ISOLA JJ. Association of c-erbB-2 protein over-expression with high rate of cell proliferation, increased risk of visceral metastasis and poor long-term survival in breast cancer. *Int J Cancer* 49:650-655, 1991.
- KANG CM, CHO HN, AHN JM, LEE SS, JEOUNG DI, CHO CK, BAE S, LEE SJ, LEE YS. Alteration of gene expression during radiation-induced resistance and tumorigenesis in NIH3T3 cells revealed by cDNA microarrays: involvement of MDM2 and CDC25B. *Carcinogenesis* 25:123-132, 2004.
- KANG Y, SIEGEL PM, SHU W, DROBNJAK M, KAKONEN SM, CORDÓN-CARDO C, GUISE TA, MASSAGUÉ J.A. A multigenic program mediating breast cancer metastasis to bone. *Cancer Cell*. 3:537-49, 2003.
- KASTNER P, KRUST A, TURCOTTE B, STROPP U, TORA L, GRONEMEYER H, CHAMBON P. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J* 9:1603-1614, 1990.
- KHAN SA, ROGERS MA, KHURANA KK, MEGUID MM, NUMANN PJ. Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. *J Natl Cancer Inst* 90:37-42, 1998.
- KHAN SA, YEE KA, KAPLAN C, SIDDIQUI JF. Estrogen receptor alpha expression in normal human breast epithelium is consistent over time. *Int J Cancer* 102:334-337, 2002.
- KIM HJ, CUI X, HILSENBECK SG, LEE AV. Progesterone receptor loss correlates with human epidermal growth factor receptor 2 overexpression in estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res* 12:1013-1018, 2006.
- KNOWLDEN JM, GEE JM, ROBERTSON JF, ELLIS IO, NICHOLSON RI. A possible divergent role for the oestrogen receptor alpha and beta subtypes in clinical breast cancer. *Int J Cancer* 89:209-212, 2000.
- KUIPER GG, ENMARK E, PELTO-HUIKKO M, NILSSON S, GUSTAFSSON JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5925-5930, 1996.
- LAWSON JS, FIELD AS, TRAN DD, HOUSSAMI N. Hormone replacement therapy use dramatically increases breast oestrogen receptor expression in obese postmenopausal women. *Breast Cancer Res* 3:342-345, 2001.
- LAWSON JS, FIELD AS, TRAN DD, KILLEEN J, MASKARENIC G, ISHIKURA H, TRICHOPOULOS D. Breast cancer incidence and estrogen receptor alpha in normal mammary tissue: an epidemiologic study among Japanese women in Japan and Hawaii. *Int J Cancer* 97:685-687, 2002.
- LEBEAU A, UNHOLZER A, AMANN G, KRONAWITTER M, BAUERFEIND I, SENDELHOFERT A, IFF A, LOHRS U. EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. *Breast Cancer Res Treat* 79:187-198, 2003.
- LI-NING-TE, RONCHETTI R, TORRES-CABALA C, MERINO MJ. Role of chromogenic in situ hybridization (CISH) in the evaluation of HER2 status in breast carcinoma: comparison with immunohistochemistry and FISH. *Int J Surg Pathol* 13:343-351 2005.

LINKSMA XJ, SALUNGA R, TUGGLE JT, GAUDET J, ENRIGHT E, MCQUARY P, PAYETTE T, PISTONE M, STECKER K, ZHANG BM, ZHOU YX, VARNHOLT H, SMITH B, GADD M, CHATFIELD E, KESSLER J, BAER TM, ERLANDER MG, SGROI DC. Gene expression profiles of human breast cancer progression. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:5974-5979, 2003.

LONNING PE. Study of suboptimum treatment response: lessons from breast cancer. *Lancet Oncol* 4:177-185, 2003.

MA MQ, ZHANG K, WANG HY, SHIH FY. ELB-Q: a new method for improving the robustness in DNA microarray image quantification. *IEEE Trans Inf Technol Biomed*, 11:574-582, 2007.

MA XJ, SALUNGA R, TUGGLE JT, GAUDET J, ENRIGHT E, MCQUARY P, PAYETTE T, PISTONE M, STECKER K, ZHANG BM, ZHOU YX, VARNHOLT H, SMITH B, GADD M, CHATFIELD E, KESSLER J, BAER TM, ERLANDER MG, SGROI DC. Gene expression profiles of human breast cancer progression. 1: *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:5974-5979, 2003.

MADRID MA, LO RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res* 6:593-600, 2004.

MARKOPOULOS C, BERGER U, WILSON P, GAZET JC, COOMBES RC. Oestrogen receptor content of normal breast cells and breast carcinomas throughout the menstrual cycle. *Br Med J (Clin Res Ed)* 296:1349-1351, 1988.

MENARD S, FORTIS S, CASTIGLIONI F, AGRETI R, BALSARI A. HER2 as a prognostic factor in breast cancer. *Oncology* 61:67-72, 2001.

MERIC-BERNSTAM F, HUNG MC. Advances in Targeting Human Epidermal Growth Factor Receptor-2 Signaling for Cancer Therapy. *Clin Cancer Res* 12:6326-6330, 2006.

MICHELIS KB, MOHLLAJEE AP, ROSET-BAHMANYAR E, BEEHLER GP, MOYSICH KB. Diet and breast cancer: a review of the prospective observational studies. *Câncer* 109: 2712-2749, 2007.

MINN AJ, GUPTA GP, SIEGEL PM, BOS PD, SHU W, GIRI DD, VIALE A, OLSHEN AB, GERALD WL, MASSAGUÉ J. Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436:518-524, 2005.

MOSELMAN S, POLMAN J, DIJKEMA R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 392:49-53, 1996.

MULAC-JERICEVIC B, LYDON JP, DEMAYO FJ, CONNEELY OM. Defective mammary gland morphogenesis in mice lacking the progesterone receptor B isoform. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:9744-49, 2003.

MULAC-JERICEVIC B, MULLINAX RA, DEMAYO FJ, LYDON JP, CONNEELY OM. Subgroup of reproductive functions of progesterone mediated by progesterone receptor-B isoform. *Science* 289:1751-4, 2000.

MURPHY N, MILLAR E, LEE CS. Gene expression profiling in breast cancer: towards individualising patient management. *Pathology* 37:271-277, 2005.

NADERI A, TESCHENDORFF AE, BARBOSA-MORAIS NL, PINDER SE, GREEN AR, POWE DG, ROBERTSON JF, APARICIO S, ELLIS IO, BRENTON JD, CALDAS C. A gene-expression signature to predict survival in breast cancer across independent data sets. *Oncogene* 26:1507-1516, 2007

NAKOPOULOU L, LAZARIS AC, PANAYOTOPOULOU EG, GIANNOPOULOU I, GIVALOS N, MARKAKI S, KERAMOPOULOS A. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol* 57:523-528, 2004.

- NATIONAL CANCER INSTITUTE'S SURVEILLANCE, EPIDEMIOLOGY, AND END RESULTS (SEER) DATABASE. Disponível em: <http://seer.cancer.gov>. Acesso em 05 de outubro de 2007.
- NATIONAL INSTITUTE OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL. National Institutes of health consensus development conference statement. Diagnosis and management of dental caries throughout life. *J Am Dent Assoc* 132:1153-1161, 2001.
- NOWELL PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 194: 23-28, 1976.
- NTOULIA M, KAKLAMANIS L, VALAVANIS C, KAFOUSI M, STATHOPOULOS E, ARAPANTONI P, MAVROUDIS D, GEORGOULIAS V, LIANIDOU ES. HER-2 DNA quantification of paraffin-embedded breast carcinomas with LightCycler real-time PCR in comparison to immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Clin Biochem* 39:942-946, 2006.
- OGAWA S, INOUE S, WATANABE T, HIROI H, ORIMO A, HOSOI T, OUCHI Y, MURAMATSU M. The complete primary structure of human estrogen receptor beta (hER beta) and its heterodimerization with ER alpha in vivo and in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 243:122-126, 1998.
- OKOBIA MN, BUNKER CH. Epidemiological risk factors for breast cancer: a review. *Niger J Clin Pract* 8:35-42, 2005.
- OLDENBURG RA, MEIJERS-HEIJBOER H, CORNELISSE CJ, DEVILEE P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? *Crit Rev Oncol Hematol* 63:125-149, 2007.
- ONDA M, EMI M, NAGAI H, NAGAHATA T, TSUMAGARI K, FUJIMOTO T, AKIYAMA F, SAKAMOTO G, MAKITA M, KASUMI F, MIKI Y, TANAKA T, TSUNODA T, NAKAMURA Y. Gene expression patterns as marker for 5-year postoperative prognosis of primary breast cancers. *J Cancer Res Clin Oncol* 130:537-545, 2004.
- OSBORNE C, WILSON P, TRIPATHY D. Oncogenes and tumor suppressor genes in breast cancer: potential diagnostic and therapeutic applications. *Oncologist* 9:361-377, 2004.
- OUATAS T, HALVERSON D, STEEG PS. Dexamethasone and medroxyprogesterone acetate elevate Nm23-H1 metastasis suppressor gene expression in metastatic human breast carcinoma cells: new uses for old compounds. *Clin Cancer Res* 9:3763-72, 2003.
- OWENS MA, HORTEN BC, DA SILVA MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. *Clin Breast Cancer* 5:63-69, 2004.
- PELLEGRINI C, FALLENI M, MARCHETTI A, CASSANI B, MIOZZO M, BUTTITTA F, RONCALLI M, COGGI G, BOSARI S. HER-2/Neu alterations in non-small cell lung cancer: a comprehensive evaluation by real time reverse transcription-PCR, fluorescence in situ hybridization, and immunohistochemistry. *Clin Cancer Res* 9:3645-3652, 2003.
- PEROU CM, JEFFREY SS, VAN DE RIJN M, REES CA, EISEN MB, ROSS DT, PERGAMENSCHIKOV A, WILLIAMS CF, ZHU SX, LEE JC, LASHKARI D, SHALON D, BROWN PO, BOTSTEIN D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:9212-9207, 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 CF, ZHU SX, LONNING PE, BORRESEN-DALE AL, BROWN PO, BOTSTEIN D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*

- 406:747-752, 2000.
- PETERS J, LOUD J, DIMOND E, JENKINS J. Cancer Genetics Fundamentals. Cancer Nurs 24:446-461, 2001.
- PICCART MJ, LOI S, VAN'T VEER LJ, et al. Multi-center external validation study of the Amsterdam 70-gene prognostic signature in node negative untreated breast cancer: are results still outperforming the clinical pathological criteria? 27th Annual San Antonio breast cancer symposium December 8-11, 2004. Breast Cancer Res Treat 88:abstract 38, 2004.
- PINHO PLV. Fisiologia Feminina antes da gravidez e os hormônios femininos. In: GUYTON AC, HALL JE. Tratado de fisiologia médica. Editora Guanabara Koogans S.A., p. 930-933, 1997.
- PISANI T, ANTONACI A, SINOPOLI NT, MOTTOLESE M, VECCHIONE A, GIOVAGNOLI MR. Cytological and immunocytochemical evaluation of thyroid and breast masses in patients with a previous neoplasm: case reports. Cytopathology 10:180-185, 1999.
- PRESSET MF, BERNSTEIN L, THOMAS PA, MEISNER LF, ZHOU JY, MA Y, HUNG G, ROBINSON RA, HARRIS C, EL-NAGGAR A, SLAMON DJ, PHILLIPS RN, ROSS JS, WOLMAN SR, FLOM KJ. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. J Clin Oncol 15:2894-2904, 1997.
- PRIMARY THERAPY OF EARLY BREAST CANCER. 9th International Conference. January 26-29, 2005. St Gallen, Switzerland. Breast. 14:S1-56, 2005.
- PUPA SM, TAGLIABUE E, ME'NARD S, ANICHINI A. HER-2: A Biomarker at the Crossroads of Breast Cancer Immunotherapy and Molecular Medicine. J Cell Physiol 205:10-18, 2005.
- REIS-FILHO JS, WESTBURY C, PIERGA JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. J Clin Pathol 59:225-231, 2006.
- REIS-FILHO JS, WESTBURY C, PIERGA JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. J Clin Pathol. 2006 Mar;59:225-231.
- RICKETTS D, TURNBULL L, RYALL G, BAKHSHI R, RAWSON NS, GAZET JC, NOLAN C, COOMBES RC. Estrogen and progesterone receptors in the normal female breast. Cancer Res. 51:1817-1822, 1991.
- RIES LAG, MELBERT D, KRAPCHO M, MARIOTTO A, MILLER BA, FEUER EJ, CLEGG L, HORNER MJ, HOWLADER N, EISNER MP, REICHMAN M, EDWARDS BK. SEER Cancer Statistics Review, 1975-2004, National Cancer Institute. Bethesda, MD. Disponível em: http://seer.cancer.gov/csr/1975_2004/, acesso em 12 de novembro de 2007.
- ROBISON JE, PERREARD L, BERNARD PS. State of the science: molecular classifications of breast cancer for clinical diagnostics. Clin Biochem 37:572-578, 2004.
- ROGER P, SAHLA ME, MÄKELÄ S, GUSTAFSSON JA, BALDET P, ROCHEFORT H. Decreased expression of estrogen receptor beta protein in proliferative preinvasive mammary tumors. Cancer Res 61:2537-2541, 2001.
- ROSS JS, FLETCHER JA, BLOOM KJ, LINETTE GP, STEC J, SYMMANS WF, PUSZTAI L, HORTOBAGYI GN. Targeted therapy in breast cancer: The HER-2/neu gene and protein. Mol Cell Proteomics 3:379-398, 2004.

- RUSSO J, RUSSO IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 102:89-96, 2006.
- SAGARA Y, MIMORI K, YOSHINAGA K, TANAKA F, NISHIDA K, OHNO S, INOUE H, MORI M. Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. *Br J Cancer* 91:959-965, 2004.
- SAHAI E. Illuminating the metastatic process. *Nat Rev Cancer* 7:737-749, 2007.
- SANCHEZ R, NGUYEN D, ROCHA W, WHITE JH, MADER S. Diversity in the mechanisms of gene regulation by estrogen receptors. *Bioessays* 24:244-254, 2002.
- SCHUETZ CS, BONIN M, CLARE SE, NIESELT K, SOTLAR K, WALTER M, FEHM T, SOLOMAYER E, RIESS O, WALLWIENER D, KUREK R, NEUBAUER HJ. Progression-specific genes identified by expression profiling of matched ductal carcinomas in situ and invasive breast tumors, combining laser capture microdissection and oligonucleotide microarray analysis. *Cancer Res.* 66:5278-5286, 2006.
- SESHADRI R, MCLEAY WR, HOORSFALL DJ, MCCAUL K. Prospective study of the prognostic significance of epidermal growth factor receptor in primary breast cancer. *Int J Cancer* 69:23-27, 1996.
- SHACKNEY SE, SILVERMAN JF. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. *Adv Anat Pathol* 10:278-290, 2003.
- SIDRANSKY D. Emerging molecular markers of cancer. *Nat Rev Cancer* 2:210-209, 2002.
- SIMPSON PT, REIS-FILHO JS, GALE T, LAKHANI SR. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 205:248-254, 2005.
- SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, LEVIN WJ, ULLRICH A, MCGUIRE WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 235:177-182, 1987.
- SLAMON DJ, GODOLPHIN W, JONES LA, HOLT JA, WONG SG, KEITH DE, LEVIN WJ, STUART SG, UDOVE J, ULDRICH A, PRESS MF. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 244:707-712, 1989.
- SMID M, WANG Y, KLIJN JG, SIEUWERTS AM, ZHANG Y, ATKINS D, MARTENS JW, FOEKENS JA. Genes associated with breast cancer metastatic to bone. *J Clin Oncol* 24:2261-2267, 2006.
- SMITH IE. Trastuzumab for early breast cancer. *Lancet* 367:107, 2006.
- SOMMER S, FUQUA SA. Estrogen receptor and breast cancer. *Semin Cancer Biol* 11:339-352, 2001.
- SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:10869-10874, 2001.
- SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, DENG S, JOHNSEN H, PESICH R, GEISLER S, DEMETER J, PEROU CM, LONNING PE, BROWN PO, BORRESEN-DALE AL, BOTSTEIN D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:8418-8423, 2003.
- 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* 26:127, 2006.

- SOTIRIOU C, NEO SY, McSHANE LM, KORN EL, LONG PM, JAZAERI A, MARTIAT P, FOX SB, HARRIS AL, LIU ET. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:10393-10398, 2003.
- SOTIRIOU C, WIRAPATI P, LOI S, HARRIS A, FOX S, SMEDS J, NORDGREN H, FARMER P, PRAZ V, HAIBE-KAINS B, DESMEDT C, LARSIMONT D, CARDOSO F, PETERSE H, NUYTEN D, BUYSE M, VAN DE VIJVER MJ, BERGH J, PICCART M, DELORENZI M. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst* 98:262-272, 2006.
- SPEIRS V, KERIN MJ. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg* 87:405-409, 2000.
- SPEIRS V, WALKER RA. New perspectives into the biological and clinical relevance of oestrogen receptors in the human breast. *J Pathol* 211:499-506, 2007.
- SUROWIAK P, DZIEGIEL P, ZABEL M, MATKOWSKI R, KORNAFEL J. Analysis of estrogen receptor (ER) and estrogen-dependent pS2 protein expression in cells of mammary ductal carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 39:141-142, 2001.
- SUROWIAK P, PALUCHOWSKI P, WYSOCKA T, WOJNAR A, ZABEL M. Steroid receptor status, proliferation and metallothionein expression in primary invasive ductal breast cancers. *Pathol Oncol Res* 10:207-211, 2004.
- TAMMEMAGI CM. Racial/ethnic disparities in breast and gynecologic cancer treatment and outcomes. *Curr Opin Obstet Gynecol* 19:31-36, 2007.
- TAN P-H, BAY B-H, YIP G, SELVARAJAN S, TAN P, WU J, LEE CH, LI KB. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol* 18:374-381, 2005.
- THOMPSON D, EASTON D. The genetic epidemiology of breast cancer genes. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 9:221-236, 2004.
- VAN DE VIJVER MJ, HE YD, VAN'T VEER LJ, DAI H, HART AA, VOSKUIL DW, SCHREIBER GJ, PETERSE JL, ROBERTS C, MARTON MJ, PARRISH M, AT SMA D, WITTEVEEN A, GLAS A, DELAHAYE L, VAN DER VELDE T, BARTELINK H, RODENHUIS S, RUTGERS ET, FRIEND SH, BERNARDS R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med* 347:1999-2009, 2002.
- VAN'T VEER LJ, DAI H, VAN DE VIJVER MJ, HE YD, HART AA, MAO M, PETERSE HL, VAN DER KOOY K, MARTON MJ, WITTEVEEN AT, SCHREIBER GJ, KERKHOVEN RM, ROBERTS C, LINSLEY PS, BERNARDS R, FRIEND SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 415:530-536, 2002.
- VEGETO E, SHAHBAZ MM, WEN DX, GOLDMAN ME, O'MALLEY BW, McDONNELL DP. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol* 7:1244-1255, 1993.
- VERGOTE I, NEVEN P, VAN DAM P, SERREYN R, DE PRINS F, DE SUTTER P, ALBERTYN G. The oestrogen receptor and its selective modulators in gynaecological and breast cancer. *Eur J Cancer* 36:S1-9, 2000.
- WALKER RA. Estrogen receptor and its potential role in breast cancer development. *J Pathol* 188:229-230, 1999.

- WANG Y, KLIJN JG, ZHANG Y, SIEUWERTS AM, LOOK MP, YANG F, TALANTOV D, TIMMERMANS M, MEIJER-VAN GELDER ME, YU J, JATKOE T, BERNIS EM, ATKINS D, FOEKENS JA. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365:671-679, 2005.
- WEIGELT B, HU Z, HE X, LIVASY C, CAREY LA, EWEND MG, GLAS AM, PEROU CM, VAN'T VEER LJ. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res.* 65:9155-9158, 2005.
- WEINBERG RA. Tumor suppressor genes. *Science* 254:1138-1146, 1991.
- WOELFLE U, CLOOS J, SAUTER G, RIETHDORF L, JÄNICKE F, VAN DIEST P, BRAKENHOFF R, PANTEL K. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. *Cancer Res* 63:5679-5684, 2003.
- YAN DUEN-HWA. Targetin human breast cancer cells that overexpress HER-2/neu mRNA by an antisense iron responsive element. *Biochim Biophys Res Communications* 246:353-358, 1998.
- YOSHIDA N, OMOTO Y, INOUE A, EGUCHI H, KOBAYASHI Y, KUROSUMI M, SAJI S, SUEMASU K, OKAZAKI T, NAKACHI K, FUJITA T, HAYASHI S. Prediction of prognosis of estrogen receptor-positive breast cancer with combination of selected estrogen-regulated genes. *Cancer Sci* 95:496-502, 2004.
- ZASLAWSKI R, SUROWIAK P, DZIEGIEL P, PRETNIK L, ZABEL M. Analysis of the expression of estrogen and progesterone receptors, and of PCNA and Ki-67 proliferation antigens, in uterine myomata cells in relation to the phase of the menstrual cycle. *Med Sci Monit* 7:908-913, 2005.

Objetivos

Gerais

- Avaliar a expressão gênica e protéica dos receptores hormonais (ESR1, ESR2, PGR e HER-2) e o padrão de amplificação do *HER-2* em amostras de câncer de mama invasivo e comparar os achados com características clínicas e histopatológicas. Utilizar os resultados da análise protéica do ESR1 e PGR versus Ki67 (marcador de índice proliferativo) para a obtenção de uma assinatura genética relacionada à proliferação celular em um subconjunto destas amostras.

Específicos

- Comparar os níveis de transcrito (utilizando a RT-PCR e a qRT-PCR) e de proteína (IHQ) dos genes *ESR1*, *ESR2* e *PGR* em relação ao tamanho do tumor, acometimento de linfonodos, grau, expressão protéica do HER-2 e nível do Ki-67;
- Avaliar a concordância entre a amplificação gênica (CISH), a expressão do transcrito (qRT-PCR) e da proteína (IHQ), bem como a relevância destes procedimentos para a determinação do padrão do *HER-2*. Correlacionar os resultados com características clinico-patológicas, como tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos, grau histológico e padrão do Ki-67;
- Avaliar a expressão diferencial de genes utilizando a técnica de *microarray* de oligonucleotídeos para determinar marcadores preditivos de proliferação celular em tumores ESR1 e PGR negativos e com alta expressão do Ki-67.

Artigo 1

Avaliação da expressão dos receptores de estrógeno alfa e beta e do receptor de progesterona e a correlação com fatores clínico-patológicos e o marcador de proliferação celular Ki-67 em carcinomas mamários

Fábíola E. Rosa MSc^{a*}, José R. F. Caldeira MD, PhD^{b,a*}, Joice Felipes MSc^c, Fernanda B. Bertonha^a, Francisco C. Quevedo MD^d, Maria A. C. Domingues MD, PhD^e, Francisco A. Moraes Neto MD^d, Silvia R. Rogatto PhD^f

^a Departamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, São Paulo

^b Departamento de Mastologia, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo

^c Departamento de Genética e Biologia Celular, UEM, Maringá, Paraná

^d Departamento de Patologia, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo

^e Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, São Paulo

^f Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP - Universidade Estadual de São Paulo, Botucatu, São Paulo, Brasil.

* Ambos autores contribuíram igualmente

Palavras-chave: câncer de mama; receptor de estrógeno; receptor de progesterona; expressão do RNAm; imuno-histoquímica

Correspondência para:

Silvia Regina Rogatto, PhD

Laboratório NeoGene - Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina - UNESP

Botucatu, São Paulo, Brasil

CEP: 18618-000

Telephone: 55-14-3811 6271

Fax: 55-14-3811 6271

E-mail: rogatto@fmb.unesp.br

Running Title: Receptores hormonais no câncer de mama

Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brasil.

Resumo

Para desvendar o perfil molecular do *status* dos receptores esteróides hormonais, nós analisamos a expressão gênica e protéica do *ER- α* , *ER- β* e *PGR* em 80 carcinomas de mama utilizando os métodos da reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa (RT-PCR), RT-PCR quantitativa (qRT-PCR) e imuno-histoquímica (IHQ). A análise qualitativa do RNAm mostrou expressão positiva do *ER- α* , *ER- β* e *PGR* em 48%, 59% e 48% dos carcinomas mamários, respectivamente. O aumento de expressão do transcrito dos genes *ER- α* , *ER- β* e *PGR* foi observado em 51%, 0% e 12% dos casos, respectivamente, enquanto a expressão protéica moderada ou forte foi detectada em 68%, 78% e 49% dos casos, respectivamente. O grau histológico foi correlacionado negativamente com os níveis gênico e protéico do *ER- α* ($P=0.0169$ e $P=0.0006$, respectivamente) e do *PGR* ($P=0.0034$ e $P=0.0005$, respectivamente). Igualmente, o marcador de proliferação celular Ki-67 foi associado negativamente aos níveis do transcrito e da proteína do *ER- α* ($P=0.0006$ e $P<0.0001$, respectivamente) e do *PGR* ($P=0.0258$ e $P=0.0005$, respectivamente). Estes achados sugerem que a expressão do *ER- α* e do *PGR* está associada com tumores de mama bem diferenciados e menos diretamente relacionada com a proliferação celular. Uma diferença estatisticamente significativa foi observada entre o acometimento de linfonodo e a expressão protéica do *ER- β* ($P=0.0208$). Em tumores *ER- α* negativo, nós detectamos uma correlação entre a expressão protéica do *ER- β* e o nível elevado do Ki-67. Estes dados sugerem que o *ER- β* poderia ser um marcador prognóstico em câncer de mama humano.

1. Introdução

O câncer de mama é o tumor mais comum em mulheres e é altamente curável se diagnosticado em estágio precoce. Os fatores prognósticos tradicionais incluem o acometimento de linfonodo axilar, tamanho do tumor, grau nuclear e grau histológico [1].

O ER- α foi extensivamente estudado como um marcador prognóstico e preditivo no câncer de mama, tornando este receptor nuclear o principal alvo para o tratamento do carcinoma mamário com os moduladores do receptor de estrógeno seletivos ou a mais nova geração de inibidores de aromatase [2]. Os pacientes com tumores ER- α positivo apresentam sobrevidas livre e global da doença, significativamente prolongadas quando tratados com moduladores seletivos do receptor de estrógeno e inibidores da aromatase [3,4]. Entretanto, aproximadamente 30% dos tumores ER- α positivo não são responsivos ao hormônio, enquanto 5-15% dos tumores ER- α negativo respondem a terapia hormonal [5]. A base molecular para a associação entre a expressão do ER- α , resposta hormonal e prognóstico do câncer de mama permanecem desconhecidos.

A descoberta da isoforma ER- β [6,7] levou os pesquisadores a reavaliarem o modelo simplista, a priori, da ação do estrógeno. O ER- β , como o ER- α , é um fator de transcrição induzido por um ligante, que modula a expressão de genes-alvo específicos. Em nível estrutural, ambas as isoformas dos receptores codificam o domínio de ligação ao DNA com 97% de similaridade, o qual reconhece e se liga aos elementos de resposta ao estrógeno dentro do promotor de genes-alvo; as duas isoformas também contêm um domínio de ligação ao hormônio, que exhibe >50% de similaridade [7,8]. Ao contrário, o domínio de ativação independente de hormônio (AF-1) apresenta menor similaridade de seqüência, sugerindo que os dois receptores têm funções celulares distintas. A afinidade de ligação do ER- β pelo estrógeno é semelhante àquela do ER- α , mas ao contrário deste, anti-estrógenos podem se ligar ao ER- β e ativar a transcrição pela via não clássica de sinalização do ER, ligando-se a fatores transcricionais ativadores da proteína 1 [9]. Estes achados levaram os investigadores a especular o papel do ER- β na progressão do câncer de mama e no

desenvolvimento da resistência anti-estrogênica. Os dois receptores formam heterodímeros quando expressos e foi sugerido que a taxa do ER- α /ER- β representa um balanço dinâmico entre os sinais de promoção e inibição do crescimento dentro das células [10].

O significado da expressão do PGR em câncer de mama foi menos reconhecido. Foi demonstrado que o PGR é uma proteína dependente de estrogênio, isto é, ela é sintetizada devido a estimulação de células-alvo com estrogênio [11,12]. Tumores de mama ER- α negativo e PGR positivo estão associados com prognóstico ruim [13]. A detecção de aumento de expressão do PGR em tumores funciona como um indicador funcional de que a via do ER está intacta, mesmo se o tumor for ER- α negativo [1]. Na ausência de hormônios, ambos, PGR e ER- α estão inativamente ligados a um complexo extenso de proteínas *heat shock* dentro do citoplasma de células alvo. A ligação do hormônio resulta na dissociação destas proteínas, permitindo a dimerização do receptor e subsequente ligação aos elementos responsivos ao hormônio (HRE), que são seqüências conservadas de 13pb localizadas em regiões promotoras de genes-alvo regulados por hormônio [14]. Uma vez ligado ao HRE, os receptores atuam como fatores de transcrição pela interação com a maquinaria geral de transcrição [15] ou pelo recrutamento de fatores de transcrição para a região promotora [16].

O ensaio mais comumente utilizado na rotina clínica para a avaliação da expressão protéica do ER- α e do PGR é a imuno-histoquímica (IHQ). Diferente de outros ensaios químicos, a IHQ não necessita que amostras de tecido sejam destruídas e apresenta a distribuição do produto protéico no tecido. Desta forma, tornou-se a metodologia preferida para determinar o nível de expressão protéica em amostras de carcinoma mamário. Entretanto, as interpretações intensivas, o tempo gasto durante a análise e a variabilidade entre os laboratórios em relação aos métodos de obtenção e preservação do tecido, recuperação do antígeno e às definições de positividade de expressão, são considerados fatores negativos para a IHQ [1]. Apesar destes problemas aparentes, a IHQ é amplamente utilizada, automatizada e aplicável para a conduta clínica.

Recentemente, a tecnologia baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) mostrou-se eficaz para avaliar seqüências específicas de RNAm, especialmente aquelas presentes em número baixo de cópias, em um pequeno número de células ou em uma quantidade ínfima de tecido, bem como seqüências de RNAm expressas em populações de células mistas. A PCR é um método simples, rápido e sensível para a análise de expressão gênica [17,18]. A proposta deste estudo foi comparar os níveis de transcrito (utilizando a RT-PCR a e qRT-PCR) e de proteína (IHQ) do *ER- α* , *ER- β* e *PGR* em pacientes Brasileiras com carcinoma mamário em relação ao tamanho do tumor, acometimento de linfonodo, grau, expressão protéica do HER-2 e nível do Ki-67.

2. Material e Métodos

2.1. Pacientes

Oitenta amostras de carcinomas mamários foram obtidas entre 2000 e 2004 provenientes do Hospital Amaral Carvalho, Jaú (SP, Brasil). As pacientes foram selecionadas consecutivamente e o critério para inclusão neste estudo foi a ausência prévia de câncer de mama diagnosticado histologicamente. As pacientes foram submetidas à ressecção segmental ou mastectomia e nenhuma delas recebeu radio ou quimioterapia antes da cirurgia. Todas as pacientes foram avisadas dos procedimentos e assinaram o termo de consentimento informado. As informações de história familiar de câncer, particularmente as de parentes de primeiro e segundo graus foram anotadas e, quando possível, a ocorrência do câncer foi confirmada por prontuários médicos ou em certidões de óbito. O Comitê de Ética Brasileiro aprovou este estudo (CONEP 694/1999).

O seguimento clínico após a cirurgia variou de 23 a 83 meses; as pacientes foram seguidas a cada quarto meses após a cirurgia. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, as amostras tumorais foram congeladas a -80°C . Os fragmentos de tecido congelado foram avaliados histologicamente e microdissecados para garantir a presença de pelo menos 90% de células neoplásicas. A classificação histológica foi realizada de acordo

com a Classificação Internacional de Doença em Oncologia, o *WHO* [19], e o estadió clínico foi determinado pela classificação *UICC TNM* [20]. A malignidade dos carcinomas infiltrativos foi avaliada pelo sistema de graduação de Scarff-Bloom e Richardson [21].

As pacientes receberam tratamentos quimioterápicos diferentes: AC (adriamicina, ciclofosfamida); FEC (5-fluorouracil, 4-epirrubicina, ciclofosfamida), FAC (5-fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida); CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil) (100% ou 70% da dose de acordo com a idade e a evolução clínica das pacientes). Sessenta a três pacientes (79%) receberam radioterapia e 57 casos ER- α positivo e/ou PGR positivo (71%), como determinado pela análise de imuno-histoquímica, foram tratados com tamoxifeno (20 mg/dia) ao final do tratamento quimioterápico, por 60 meses. As pacientes com intolerância ou efeitos colaterais (pós-menopausa) foram tratadas com inibidores de aromatase, como o anastrozole (1 mg/dia) ou letrozole (2.5 mg/dia). Um resumo das informações clínicas e patológicas está apresentado na Tabela 1.

2.2. Isolamento do RNA total e transcrição reversa

O RNA total foi extraído de tecido tumoral congelado e pulverizado utilizando o *Rneasy mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram estocadas em água destilada livre de RNase, a -70°C. A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA, 18S e 28S, foram visualizadas em luz ultravioleta. Para evitar contaminação com DNA, as amostras foram digeridas com 1 unidade de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25 mM de EDTA pH 8.0. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA) por 15 min em temperatura ambiente e a enzima foi inativada pelo aquecimento das reações a 70°C por 10 min. O RNA foi transcrito em um volume final de 20 μ l contendo 5x *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM de cada dNTP, 0.5 μ g/ μ l de Oligo

(dT)₁₈, 0.1 M ditioneitol e 200 unidades da transcriptase reversa *SuperScript™ II* (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min e a reação foi subseqüentemente inativada por 15 min a 70°C. Na análise qualitativa, os controles negativos consistiram de reações com os mesmos reagentes, exceto a ausência da enzima de transcriptase reversa. O cDNA foi estocado a -70°C.

2.3. RT-PCR Qualitativa

A eficiência da transcriptase reversa foi avaliada pela amplificação paralela do gene *housekeeping glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)*. Os iniciadores para a amplificação dos genes *ER-α*, *ER-β* e *GAPDH* foram desenhados utilizando o *software Primer 3* (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). As seqüências dos iniciadores e o tamanho dos fragmentos amplificados estão apresentados a seguir: *ER-α* (F)5'-atcctgatgattggtctcgtct-3' e (R)5'-ggatatggttccttctctccaga-3' (270 pb); *ER-β* (F)5'-gctcatctttgctccagatcttg-3' e (R)5'-caatcacccaaccaaagcatc-3' (266 pb); *GAPDH* (F)5'-cgtcttcaccaccatggaga-3' e (R)5'-cggccatcacgccacagttt-3' (300 pb). Os iniciadores do *PGR-AB* foram construídos de acordo com Ariga et al [22]: (F)5'-acagaattcatgagccgggtccgggtgcaag-3' e (R)5'-acaagatctccaccagagcccgagggtt-3' (247 pb). Uma alíquota (2µl) de cada reação da transcrição reversa foi amplificada em um termociclador PTC-200 (Peltier Thermal Cycler - MJ Research, Miami, Florida, USA) em um volume total de reação de 25 µl contendo 10x *PCR Buffer* (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 50 mM MgCl₂, 1.25 mM de cada dNTP, 10 mM de cada iniciador e 1 unidade de *Taq DNA Polymerase Recombinant* (Invitrogen™ Life Technologies, Brazil). As condições da PCR consistiram de uma desnaturação inicial a 94°C por 10 min, com 45 ciclos de amplificação subseqüentes por 45 s a 94°C, 45 s a 60°C e 45 s a 72°C. O produto de PCR foi avaliado em um gel de agarose 2%, corado com brometo de etídio e visualizado em luz

ultravioleta. Todas as reações de PCR negativas foram realizadas em duplicata, incluindo a extração de RNA, síntese de cDNA e PCR para excluir erros técnicos.

2.4. RT-PCR Quantitativa

Quarenta e sete carcinomas de mama foram avaliados por qRT-PCR. Quatro amostras de mama normais de pacientes submetidas à redução mamária e confirmadas histopatologicamente como normais foram usadas como controle.

A amplificação por PCR foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems). Os iniciadores e as sondas *TaqMan* para os genes *ER-α*, *ER-β*, *PGR* e o gene referência, *GAPDH*, foram desenhados e sintetizados de acordo com o sistema *Assay-by-Design* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os dados quantitativos foram analisados utilizando o *software Sequence Detection System* (v1.0; Applied Biosystems). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 25µl, seguindo as instruções do fabricante. Uma curva-padrão relativa com diluições seriadas de cDNA de placenta (100, 50, 25, 12.5 e 8ng/uL) foi construída para cada iniciador. As curvas-padrão dos genes alvo e de referência mostraram resultados semelhantes de eficiência (> 90%). A quantificação relativa foi dada pela razão entre o valor médio do gene alvo e o valor médio do gene referência (*GAPDH*) em cada amostra. A quantidade relativa de produto gerado pela PCR para cada conjunto de iniciadores foi determinada com base no valor de Ct. A quantificação relativa foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$ (CT: *fluorescence threshold value*; ΔCT : CT do gene-alvo menos CT do gene-referência; $\Delta\Delta CT$: ΔCT da amostra tumoral menos ΔCT da amostra-controle).

2.5. Imuno-histoquímica

Os níveis de proteína do ER-α e do PGR foram analisados em 80 casos e a expressão protéica do ER-β em 43 destes casos. Tecidos fixados em formalina e embebidos

em parafina foram seccionados (3 μ m) e estes cortes foram montados em lâminas com organossilano (3-aminopropil-trietoxi-silano) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). As lâminas foram desparafinizadas em xilol, gradualmente re-hidratadas em uma série de álcool e lavadas em solução de salina fosfatada tamponada (PBS). A atividade da peroxidase intrínseca foi bloqueada com peroxidase de hidrogênio e os cortes foram incubados com o anticorpo primário. As reações de imuno-histoquímica foram realizadas utilizando o anticorpo RTU-ER-6F11 (Novocastra, Newcastle, UK) (diluição 1:50), o *monoclonal anti-human estrogen receptor β 1* (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark) (diluição 1:60) e o *monoclonal anti-human progesterone receptor 1A6* (DAKO, Carpinteria, CA, USA) (diluição 1:50). Após a incubação por 1 h, os cortes foram lavados em PBS, incubados por 30 min com o anticorpo biotinilado secundário e incubados por 30 min com o complexo peroxidase estreptoavidina (LSAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA). A reação foi revelada com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e contracorada com hematoxilina. Lâminas para o controle negativo e positivo foram incluídas em cada ensaio. O escore de positividade para o ER- α e o PGR foi realizado visualmente pela estimativa da porcentagem de coloração nuclear positiva em $\geq 10\%$ das células neoplásicas e as amostras foram agrupadas em: intensidade fraca (1+), moderada (2+) e forte (3+). A expressão negativa do ER- β foi definida como fraca em menos de 2/3 das células tumorais, enquanto a expressão positiva foi definida como coloração detectável em mais de 2/3 das células neoplásicas; coloração positiva foi dividida em moderadamente positiva (2+) e intensamente corada (3+). As lâminas foram distribuídas aleatoriamente para três observadores independentes (FCQ, FAMN e MACD). Qualquer discrepância entre as classificações das amostras foram solucionadas por uma revisão e o resultado final foi determinado por um consenso entre os observadores. Nas áreas de tecido bem preservado, a fração de regiões infiltrantes do tumor foi avaliada. O nível do Ki-67 foi analisado em todos os casos, mas 16 casos foram não-reativos. A mediana do índice de marcação do Ki-67, incluída neste estudo, foi utilizada como um limite para distinguir tumores com baixa ($\leq 25\%$) e alta ($> 25\%$) proliferação celular

[23]. O acometimento de linfonodos, grau histológico e tamanho do tumor foram determinados em 79, 75 e 79 amostras, respectivamente.

2.6. Análise Estatística

Os testes Exato de Fisher e Qui-quadrado foram utilizados para analisar as associações entre a expressão do *ER- α* , *ER- β* e do *PGR* e todas as variáveis clinico-patológicas. As seis pacientes com perda do seguimento clínico foram consideradas vivas nos cálculos estatísticos. Devido ao grande número de comparações dentro do mesmo grupo de pacientes, a correção de *Bonferroni* foi aplicada para ajustar os valores de *P*. Este tipo de ajuste apresentou um nível de significância de 0.0006 para cada um dos oito testes realizados.

A correlação entre os resultados de IHQ e de qRT-PCR foi avaliada utilizando o teste de correlação de *Spearman*. A expressão dos receptores, determinada por qRT-PCR, foi comparada com as características clinico-patológicas usando *One-way Analysis of Variance* (ANOVA); as diferenças foram testadas para significância pelo teste de *Mann-Whitney* para duas categorias e pelo teste de *Kruskal-Wallis* para três categorias. Resultados estatisticamente significativos foram considerados quando o $P < 0.05$.

3. Resultados

A amostra estudada consistiu de 80 carcinomas mamários femininos, dos quais a maioria apresentou neoplasia mamária de grau histológico II e III e acometimento de linfonodo axilar. A maioria das pacientes possuía idade superior a 50 anos (67.5%), sendo que a média foi de 59.8 ± 15.5 (variando de 30 a 94 anos), a maioria dos tumores era maior que 2 cm (72%) e a metade deles apresentou baixa taxa de proliferação (Tabela 1). Quinze casos (19%) apresentaram expressão elevada do HER-2 (escore 2+ e 3+) por análise de IHQ. A média do seguimento clínico foi de 52.3 ± 19.8 meses. Durante este intervalo, seis pacientes morreram por causas não relacionadas, duas apresentaram recidiva na mesma

mama, oito desenvolveram metástase (duas metástase óssea e seis metástase pulmonar) e em seis pacientes o seguimento clínico foi perdido.

Expressão do ER- α , ER- β e do PGR

Pela análise de RT-PCR foi observado expressão positiva do *ER- α* em 48% dos casos, enquanto 59% apresentaram expressão do *ER- β* e 48% expressão do *PGR*. A técnica de RT-PCR quantitativa em tempo real mostrou aumento de expressão do *ER- α* , *ER- β* e do *PGR* em 51%, 0% e 12% dos casos, respectivamente. Níveis mais elevados do transcrito do *ER- α* comparado ao do *ER- β* foram observados em 29/43 casos (67%). A expressão protéica positiva foi detectada por IHQ para o ER- α , ER- β e o PGR em 68%, 77% e 49% dos casos, respectivamente. Os escores (1+, 2+ e 3+) para a expressão protéica do ER- α , ER- β , PGR e do Ki-67 estão apresentados na Figura 1.

Correlação entre a expressão gênica e protéica

Discrepâncias entre os resultados de RT-PCR e IHQ foram detectadas para o *ER- α* , *ER- β* e o *PGR* em 30%, 60% e 29% dos casos, respectivamente, enquanto a comparação entre as análises de qRT-PCR e IHQ revelaram discrepâncias para o *ER- α* , *ER- β* e o *PGR* em 22%, 64% e 12% dos casos, respectivamente (Tabela 2). Embora estatisticamente significativo, um baixo coeficiente de correlação foi observado entre os níveis do transcrito e da proteína para o *ER- α* ($P < 0.0001$, $r = 0.6393$). O nível de expressão do transcrito apresentou correlação positiva com a expressão da proteína para o *PGR* ($P < 0.0001$, $r = 0.8278$), mas nenhuma correlação foi encontrada para o *ER- β* ($P = 0.9673$, $r = 0.0068$).

Nenhuma correlação foi observada entre o nível dos transcritos do *ER- α* e do *ER- β* por qRT-PCR ($P = 0.6310$, $r = 0.07831$). Entretanto, uma correlação positiva foi encontrada entre o nível de expressão dos transcritos do *ER- α* e do *PGR* ($P < 0.0001$, $r = 0.6674$). As

comparações entre as análises de IHQ e qRT-PCR para todos os genes estão apresentadas na Figura 2.

Expressão do transcrito e da proteína e as variáveis clínico-histopatológicas

Nenhuma correlação significativa foi observada entre a expressão de qualquer um dos receptores por RT-PCR e idade, acometimento de linfonodos, estadio, grau histológico, tamanho tumoral, escore do HER-2, índice de proliferação celular ou história familiar de câncer (Tabela 3). Nenhuma correlação estatística foi encontrada entre a co-expressão do *ER- α* e do *ER- β* (por IHQ e RT-PCR) e acometimento de linfonodos ou grau histológico. A expressão elevada do *ER- α* e do *PGR*, detectada por qRT-PCR, estava estatisticamente associada a tumores de grau histológico II ($P=0.0169$ e $P=0.0034$, respectivamente) e expressão baixa de Ki-67 ($P=0.0006$ e $P=0.0258$, respectivamente) (Figura 3). Nenhuma correlação foi observada para o gene *ER- β* .

Os resultados da comparação entre os dados de IHQ e as variáveis clínicas foram muito semelhantes aos dados de qRT-PCR. Os níveis de expressão das proteínas do *ER- α* e do *PGR* mostraram uma correlação positiva com grau histológico ($P=0.0006$ e $P=0.0005$, respectivamente). Da mesma forma, foi detectada uma associação significativa entre a expressão protéica do *ER- α* ($P<0.0001$) e do *PGR* ($P=0.0005$) em tumores com baixo índice proliferativo (Ki-67 $\leq 25\%$). Em adição, nós observamos uma associação significativa entre os tumores de grau histológico III e níveis elevados de Ki-67 ($P<0.0001$) (Tabela 3). Foi detectada uma correlação significativa entre a expressão protéica do *ER- β* e ausência de envolvimento de linfonodo axilar ($P=0.0208$) (Tabela 3, Figura 3).

A expressão protéica concomitante do *ER- α* e do *PGR*, detectada por IHQ, foi observada em 32 casos (40%). Dentre os 30 casos que apresentaram seguimento clínico por mais de 24 meses, 25 foram tratados com tamoxifeno e dois deles não responderam a terapia endócrina e desenvolveram metástase pulmonar. Três casos apresentaram expressão protéica negativa de ambos, *ER- α* e *PGR*, e expressão elevada do *ER- α* por

qRT-PCR; dois foram tratados com tamoxifeno e apresentaram uma evolução favorável por mais de 40 meses. Independente do tratamento, em um subgrupo de pacientes que progrediu para metástase em menos de 24 meses, seis pacientes eram ER- α positivo (2+ ou 3+) por IHQ e tinham expressão elevada do transcrito por qRT-PCR.

Dezoito pacientes apresentaram história familiar de câncer, incluindo carcinomas de mama (sete casos), cabeça e pescoço, útero, esôfago, intestino e outras neoplasias. Duas pacientes com história familiar de câncer de mama tinham uma mutação no *BRCA2* (dados não apresentados) e apresentaram níveis diminuídos de RNAm e expressão protéica negativa do PGR.

4. Discussão

Muitos carcinomas mamários, assim como o tecido normal de onde eles são originados, são sensíveis ao estrógeno. A avaliação da expressão do receptor do hormônio esteróide em um tumor primário é o principal fator utilizado para prever a resposta endócrina. Especialmente em pacientes com ausência de envolvimento de linfonodos, o tamanho do tumor, grau histológico e idade são considerados fatores importantes para a determinação do risco, influenciando a seleção do tipo de terapia, juntamente com a resposta endócrina. Lamentavelmente, o sucesso da terapia adjuvante pode ser somente determinado quando as pacientes permanecem livres da doença por vários anos.

O método atual utilizado para determinar o tratamento do câncer de mama é baseado na avaliação protéica dos genes *ER- α* e *PGR* por IHQ. O conhecimento do nível protéico do ER- β poderia conceder informações adicionais em resposta a várias terapias endócrinas para o câncer de mama. Embora a quantificação da expressão do RNAm por meio de RT-PCR quantitativa em tempo real apresente o potencial de tornar-se uma metodologia padrão em termos de sua performance, acurácia, sensibilidade, extensão ampla de leitura e análise em larga escala [revisado em 24], nossos achados mostraram que

este procedimento pode ser útil na avaliação dos genes *ER- α* e *PGR*, mas não é aplicável para o *ER- β* .

A comparação entre a expressão protéica e gênica confirmou as discrepâncias previamente descritas por outros autores [25-27]. Uma maior semelhança e consistência entre os níveis de expressão protéica e gênica foi encontrado pela metodologia de qRT-PCR. Em 11 casos, nós observamos a ausência de expressão da proteína do PGR em paralelo com níveis positivos de RNAm do *PGR*. A discrepância entre estes resultados pode ser devido a identificação de ambas as isoformas (PGRA e PGRB) por RT-PCR, mas somente a isoforma PGRA por IHQ, então a expressão do RNAm poderia refletir os níveis da isoforma PGRB.

A hipótese para explicar resultados falso-negativos por RT-PCR é uma quantidade insuficiente de cDNA para uma amplificação confiável ou o efeito de células normais ou a estratégia de extração do RNA total, que pode ter limitado a amplificação dos transcritos de interesse. As discrepâncias encontradas nos outros casos, resultados falso-negativos por IHQ, poderia refletir a heterogeneidade intratumoral ou a variação do conteúdo tumoral entre os tecidos, mesmo durante a extração do RNAm ou quando fixados e processados para a avaliação histológica [28]. Outra possível causa para a discrepância pode ser devido a variações na eficiência de tradução ou na taxa de degradação do RNAm e da proteína, assim a expressão da proteína não é diretamente proporcional a expressão do transcrito [29].

A principal discrepância entre a expressão gênica e protéica foi a do gene *ER- β* . Saji et al [30] relatou previamente uma discordância marcante entre a expressão da proteína e do RNAm do *ER- β* . O nível baixo de expressão do *ER- β* , quando comparado aos genes *ER- α* e *PGR*, provavelmente contribui para as dificuldades na padronização dos métodos de IHQ e PCR em tempo real para determinar o nível do *ER- β* . Embora Jarzabek et al [26] encontraram uma correlação positiva entre a expressão protéica e gênica do *ER- β* , os níveis de RNAm eram baixos. Nenhuma explicação clara destas diferenças foi identificada até o

momento. Murphy et al [31] propuseram uma possível regulação diferencial do nível da proteína *versus* o do RNA ou a probabilidade da expressão de outras isoformas potenciais do *ER-β* (conhecidas e desconhecidas) em tecidos mamários, cujas proteínas cognatas seriam detectadas pelo anticorpo, mas não identificadas e mensuradas em ensaios de RT-PCR.

Resultados contraditórios têm sido relatados incluindo a presença ou ausência de correlação entre os níveis do ER [24-26,32]. Em nosso estudo, uma correlação positiva foi observada entre a expressão do *ER-α* e do *PGR*. De forma semelhante, de Cremoux et al [25] encontraram uma associação estatisticamente significativa entre a expressão do *ER-α* e do *PGR*, tanto nos níveis de proteína como nos do transcrito.

Nenhuma correlação estatisticamente significativa foi encontrada entre a co-expressão do *ER-α* e do *ER-β*, por RT-PCR ou IHQ, e o acometimento de linfonodos ou grau histológico. Em contraste, Speirs e Kerin [33] observaram que lesões que co-expressam o *ER-α* e o *ER-β* estão significativamente associadas a tumores com envolvimento de linfonodos e que apresentam uma tendência a graus mais elevados. Nakopoulou et al [34] mostraram que tanto a sobrevida livre da doença como a global eram significativamente mais longas em pacientes com tumores duplamente positivos para *ER-β/ER-α*. De acordo com Cullen et al [35], as terapias anti-estrogênicas são capazes de bloquear os efeitos estimuladores do *ER-α*, mas atuam como agonistas na presença do *ER-β*. Estes achados sugerem que o *ER-β* poderia estar envolvido na mediação da resistência ao tamoxifeno em câncer de mama [2,35].

Os tumores de grau III estavam significativamente associados à ausência de expressão da proteína ou expressão diminuída do transcrito dos genes *ER-α* e *PGR*. Concordante aos nossos achados, alguns autores mostraram que tumores de alto grau estão geralmente associados com expressão protéica negativa do *ER-α* e do *PGR* [24,36]. Estes dados sugerem que a ausência da expressão do destes receptores está correlacionada a tumores humanos de mama pobremente diferenciados.

A marcação por imuno-histoquímica do Ki-67, um antígeno nuclear expresso em células que estão em divisão e não naquelas da fase G0, permite a estimativa do índice de proliferação tumoral. O papel preciso do Ki-67 na regulação do ciclo celular permanece desconhecido. O nosso estudo mostrou uma correlação estatística entre alto grau histológico e expressão elevada do Ki-67. A correlação com alto grau histológico é predita, pois a classificação do grau apresenta o escore mitótico como um dos seus componentes. Em adição, as respostas mais elevadas à quimioterapia foram observadas em pacientes que apresentavam tumores proliferando rapidamente [37-39]. O nível elevado de Ki-67 estava presente em 31 de 64 casos (48%); dois deles recidivaram durante a quimioterapia e dois desenvolveram metástase pulmonar durante o tratamento com tamoxifeno. Embora as células positivas para o Ki-67 sejam consideradas como contribuintes do índice de proliferação, algumas delas podem ser eliminadas por apoptose antes de alcançar a fase de mitose [40].

Os tumores com Ki-67 elevado foram associados significativamente a tumores exibindo níveis baixos de RNAm e níveis indetectáveis de proteína dos genes *ER- α* e *PGR*. Relatos recentes mostraram correlação significativa entre Ki-67 elevado e ausência de expressão protéica do PGR [41] e do ER- α [26]. Em um outro estudo, os autores observaram que 81% dos carcinomas ductais infiltrantes de grau I eram ER- α positivo, sendo que 23% deles era Ki-67 positivo [42]. Nossos resultados concordam com os relatos prévios que indicam que tumores ER- α positivos com ausência de expressão do Ki-67 estão significativamente associados à uma contagem mitótica baixa, sugerindo que a expressão do ER- α está associada à tumorigênese em carcinomas mamários bem diferenciados e pouco relacionada diretamente à proliferação celular [42,43]. Jarzabek et al [26] mostraram que células mamárias epiteliais normais que expressam o ER- α não proliferam e não produzem marcadores de proliferação. Estes dados sugerem que o ER- α poderia atuar como um fator inibidor da proliferação. Em um estudo recente, Skiliris et al [44] analisaram tumores de mama ER- α negativo, mas que expressavam a proteína ER- β e demonstraram

que estes tumores estão significativamente associados à expressão elevada do Ki-67. De forma semelhante a estes resultados, verificamos em nosso estudo um subgrupo de 23 pacientes ER- α negativo, dos quais 20 mostraram expressão do ER- β (2+ ou 3+) e 15 apresentaram níveis elevados de Ki-67.

Uma associação significativa foi detectada entre a expressão positiva da proteína ER- β e a ausência de envolvimento de linfonodos. Da mesma forma, Jarvinen et al [45] mostraram que a expressão positiva do ER- β era mais comum em tumores sem acometimento de linfonodos. Estes resultados sugerem que a expressão do ER- β pode ser um indicador favorável de prognóstico em câncer de mama.

Embora o seguimento clínico das pacientes fosse curto para avaliar a resposta ao tratamento, seis pacientes que expressaram o ER- α por IHQ e qRT-PCR progrediram para metástase independentemente do tratamento. Estas pacientes apresentaram escore 2+ e 3+ para a expressão protéica do HER-2. Gago et al [46] mostraram que pacientes que co-expressam o HER-2 e o ER- α apresentaram tanto sobrevida livre da doença como global mais curtas. Os autores observaram que pacientes que receberam tamoxifeno como a única forma de terapia, bem como as que receberam quimioterapia adjuvante padrão seguida por tamoxifeno apresentaram um prognóstico ruim.

Dezoito casos do nosso estudo apresentaram historia familiar de câncer, sendo que sete deles relataram câncer de mama em parentes de primeiro grau. Relatos recentes demonstraram que as neoplasias desenvolvidas em portadores de mutações no *BRCA1* e no *BRCA2* diferem em termos de suas características histopatológicas [47]. Dois dos sete casos mostraram mutação no *BRCA2* (dados não apresentados) com concomitante expressão negativa da proteína PGR e nível diminuído do transcrito deste gene. De forma geral, os tumores de portadores de mutações no *BRCA2* são frequentemente PGR negativo [48,49].

Em conclusão, nossos resultados sugerem que os níveis protéicos do ER- α e do PGR estão mais firmemente regulados nas células tumorais do que os níveis de RNAm e

apóiam a seleção da análise de IHQ na identificação de associações clínicas com fatores prognósticos e/ou preditivos. Nós demonstramos uma associação significativa entre os níveis de expressão do *ER- α* e do *PGR* em tumores com baixo índice proliferativo. Uma correlação significativa foi observada entre o acometimento de linfonodos e a expressão protéica do *ER- β* . Em tumores *ER- α* negativo, nós detectamos uma correlação entre a expressão da proteína do *ER- β* e níveis altos de Ki-67. Estes dados sugerem que o *ER- β* pode ser um marcador prognóstico em carcinomas mamários primários.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer a José Eduardo Corrente por sua contribuição nas análises estatísticas e a Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves por sua assistência na técnica de IHQ. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil.

5. Referências

- [1] Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:109–118.
- [2] Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, et al. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10: 7490–7499.
- [3] Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992;339:1–15.
- [4] Baum M, Buchanan M, Baselga J, et al. The future of breast cancer research in danger. *Eur J Cancer* 2002;38:2210–2213.
- [5] Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:3–22.
- [6] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925–5930.

- [7] Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392:49–53.
- [8] Enmark E, Pelto-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258–4265.
- [9] Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ERalpha and ERbeta at AP1 sites. *Science* 1997;277:1508–1510.
- [10] Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74:245–248.
- [11] Surowiak P, Dziegiel P, Zabel M, Matkowski R, Kornafel J. Analysis of estrogen receptor (ER) and estrogen-dependent pS2 protein expression in cells of mammary ductal carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39:141–142.
- [12] Zaslawski R, Surowiak P, Dziegiel P, Pretnik L, Zabel M. Analysis of the expression of estrogen and progesterone receptors, and of PCNA and Ki-67 proliferation antigens, in uterine myomata cells in relation to the phase of the menstrual cycle. *Med Sci Monit* 2005;7:908–913.
- [13] Keshgegian AA, Cnaan A. Estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive breast carcinoma: poor clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:970–973.
- [14] Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989;56:335–344.
- [15] Ing NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem* 1992;267:17617–17623.
- [16] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 2000;65:227–251.
- [17] Köhler T, Laßner D, Rost A-K, et al. Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction: nonradioactive PCR methods. Springer-Verlag: Berlin; 1995.
- [18] Ninomiya I, Endo Y, Yonemura Y, Sasaki T. Reverse transcription/quantitative PCR to detect changes in gene expression in disease. In: Latchman DS, (ed). *PCR Applications in Pathology: principles and practice*: Oxford University Press: New York; 1995.
- [19] WHO World Health Organization: *International of Diseases for Oncology*, 2nd edn. World Health Organization, Geneva, 1990.
- [20] UICC União Internacional Contra o Câncer: *Classificação dos tumores malignos*, 5° ed. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro-Brasil, 1998.

- [21] Bloom MJC, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer: a study of 1709 cases. *Br J Cancer* 1957;11:358–377.
- [22] Ariga N, Suzuki T, Moriya T, et al. Progesterone receptor A and B isoforms in the human breast and its disorders. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:302–308.
- [23] Weikel W, Beck T, Mitze M, Knapstein PG. Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:149–154.
- [24] Bièche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 2001;20:8109–8115.
- [25] de Cremoux P, Tran-Perennou C, Elie C, et al. Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. *Biochem Pharmacol* 2002;64:507–515.
- [26] Jarzabek K, Koda M, Kozlowski L, et al. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of estrogen receptors α and β in human primary breast cancer: correlation with proliferative marker Ki-67 and clinicopathological factors. *Eur J Cancer* 2005;41:2924–2934.
- [27] Labuhn M, Vuaroqueaux V, Fina F, et al. Simultaneous quantitative detection of relevant biomarkers in breast cancer by quantitative real-time PCR. *Int J Biol Markers* 2006;21:30–39.
- [28] Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, et al. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol* 2002;198:450–457.
- [29] Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S, et al. Evaluation of oestrogen receptor beta wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers. *Eur J Cancer* 2002;38:380–386.
- [30] Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor β in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:s21–s26.
- [31] Murphy LC, Leygue E, Niu Y, Snell L, Ho S-M, Watson PH. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer. *Br J Cancer* 2002;87:1411–1416.
- [32] Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2371–2374.

- [33] Speirs V, Kerin MJ. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg* 2000;87:405–409.
- [34] Nakopoulou L, Lazaris AC, Panayotopoulou EG, et al. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol* 2004;57:523–528.
- [35] Cullen R, Maguire TM, McDermott EW, et al. Studies on oestrogen receptor-alpha and -beta mRNA in breast cancer. *Eur J Cancer* 2001;37:1118–1122.
- [36] Simpson PT, Reis-Fiho JS, Gale T, Lakhani S. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005;205:248–254.
- [37] Remvikos Y, Beuzeboc P, Zajdela A, et al. Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1383–1387.
- [38] Bottini A, Berruti A, Bersiga A, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on Ki67 labelling index, c-erbB-2 expression and steroid hormone receptor status in human breast tumours. *Anticancer Res* 1996;16:3105–3110.
- [39] Collecchi P, Baldini E, Giannessi P, et al. Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumour proliferative activity, bcl-2 expression and the relationship between tumour regression and biological markers. *Eur J Cancer* 1998;34:1701–1714.
- [40] Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology* 2006;48:674–682.
- [41] Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, et al. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 2005;92:147–155.
- [42] Ding SL, Sheu L-F, Yu J-C, et al. Expression of estrogen Receptor- α and Ki67 in relation to pathological and molecular features in early-onset infiltrating ductal carcinoma. *J Biomed Sci* 2004;11:911–919.

- [43] Tan P-H, Bay B-H, Yip G, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol* 2005;18:374–381.
- [44] Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC. Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer* 2006;95:616–626.
- [45] Jarvinen TAH, Peltö-Huikko M, Holli K et al. Estrogen receptor beta is co-expressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation in breast cancer. *Am J Pathol* 2000;156:29–35.
- [46] Gago FE, Fanelli MA, Ciocca DR. Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;98:36–40.
- [47] Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: morphological aspects. *Breast Cancer Res* 1999;1:31–35.
- [48] Loman N, Johannsson O, Bendahl PO, Borg A, Fernö M, Olsson H. Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer* 1998;83:310–319.
- [49] Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Nevanlinna H. Histopathological features of breast tumours in BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 2005;7:R93–100.

Tabela 1. Características clínico-patológicas das amostras de câncer de mama.

Características	Número de pacientes (%)
Idade	
≤50	26 (32.5)
>50	54 (67.5)
História Familiar de Câncer	
Sim	18 (22.5)
Não	62 (77.5)
Tipo Histológico	
Ductal infiltrante	72 (90)
Lobular infiltrante	4 (5)
Outros	4 (5)
Acometimento de Linfonodos	
Negativo	32 (40.5)
Positivo	47 (59.5)
Nd	1
Tamanho do Tumor (cm)	
0 – 2	22 (27.9)
>2 – 5	52 (65.8)
>5	5 (6.3)
Nd	1
Estadio Clínico	
I	13 (16.25)
IIA	26 (32.5)
IIB	27 (33.75)
IIIA	4 (5)
IIIB	10 (12.5)
Grau Histológico	
I	9 (12)
II	31 (41)
III	35 (47)
Fase S	
Baixa (≤ 25%)	33 (41.3)
Alta (> 25%)	31 (38.7)
Nr	16 (20.0)
Nível do HER-2	
0	45 (56.25)
1+	20 (25)
2+	6 (7.5)
3+	9 (11.25)

Nd: não determinado; Nr: não reativo.

Tabela 2. Comparação da análise de IHQ com as metodologias de RT-PCR e qRT-PCR da expressão dos genes *ER- α* e *PGR* em amostras de câncer de mama.

Genes	RT-PCR	IHQ			
		0	1+	2+	3+
ER-α	+	4	5	10	19
	-	22	2	8	10
ER-β	+	-	3	8	6
	-	-	3	11	12
PGR	+	11	1	8	18
	-	30	2	3	7
	qRT-PCR				
ER-α	Baixo	14	1	0	1
	Normal	2	0	0	1
	Elevado	3	3	8	7
ER-β	Baixo	-	6	14	15
	Normal	-	0	2	2
	Elevado	-	0	0	0
PGR	Baixo	22	1	1	3
	Normal	1	0	2	8
	Elevado	0	0	0	5

Tabela 3. Relação entre a expressão do ER- α , ER- β e do PGR e idade da paciente, acometimento de linfonodos, estágio e grau histológico.

Características	n	ER- α + (%)			PGR + (%)				ER- β + (%)		
		RT	P	IHQ	P	RT	P	IHQ	P	RT	P
Total	80	38		54		38		39		47	
Idade											
≤50	26	10 (38)	0.3405	17 (65)	0.8030	12 (46)	1.000	13 (50)	1.000	19 (73)	0.0915
>50	54	28 (52)		37 (68)		26 (48)		26 (48)		28 (52)	
Status de Linfonodo											
Negativo	32	15 (47)	0.6917	20 (62)	0.3007	15 (47)	0.8146	15 (47)	0.8590	20 (62)	0.8368
Positivo (1 a 4)	32	17 (53)		25 (78)		16 (50)		17 (53)		19 (59)	
Positivo (>4)	15	6 (40)		9 (60)		6 (40)		7 (47)		8 (53)	
Nd	1										
Estadio Clínico											
I	13	7 (54)	0.2903	8 (61)	0.5166	5 (38)	0.4046	6 (46)	0.8472	8 (61)	0.8524
IIA	26	12 (46)		18 (69)		13 (50)		14 (54)		15 (58)	
IIB	27	15 (55)		20 (74)		15 (55)		13 (48)		15 (55)	
IIIA	4	2 (50)		3 (75)		2 (50)		2 (50)		3 (75)	
IIIB	10	2 (20)		5 (50)		3 (30)		4 (40)		6 (60)	
Grau Histológico											
I	9	4 (44)	0.3327	9 (100)	0.0006	6 (67)	0.2202	8 (89)	0.0005	4 (44)	0.6491
II	31	18 (58)		26 (84)		16 (52)		19 (61)		19 (61)	
III	35	14 (40)		15 (43)		13 (37)		9 (26)		21 (60)	
Tamanho do Tumor (cm)											
0 - 2	22	14 (64)	0.1311	16 (73)	0.7882	10 (45)	0.8064	13 (59)	0.3232	14 (64)	0.7991
>2 - 5	52	21 (40)		35 (67)		25 (48)		24 (46)		28 (54)	
>5	5	3 (60)		3 (60)		3 (60)		2 (40)		5 (100)	
Fase S											
Baixa (≤ 25%)	33	19 (58)	0.1441	30 (91)	<0.0001	18 (54)	0.0841	23 (70)	0.0005	19 (58)	0.4474
Alta (> 25%)	31	12 (39)		9 (29)		10 (32)		8 (26)		21 (68)	
Nr	16	7		12		10		8		7	
Status do HER-2											
0	45	21 (47)	0.2904	32 (71)	0.1535	23 (51)	0.1923	23 (51)	0.8873	27 (60)	0.9255
1+	20	12 (60)		15 (75)		11 (55)		9 (45)		11 (55)	
2+	6	1 (17)		3 (50)		1 (17)		3 (50)		3 (50)	
3+	9	4 (44)		4 (44)		3 (33)		4 (44)		6 (67)	
História Familiar de Câncer											
Sim	18	5 (28)	0.0663	12 (67)	1.000	7 (39)	0.4357	7 (39)	0.4258	8 (44)	0.1833
Não	62	33 (53)		42 (68)		31 (50)		32 (52)		39 (63)	

Nd=não determinado; Nr=não reativo; RT=RT-PCR; IHQ=imuno-histoquímica; Em negrito, valores estatisticamente significativos após a correção de Bonferroni do valor de P ($P<0,0006$).

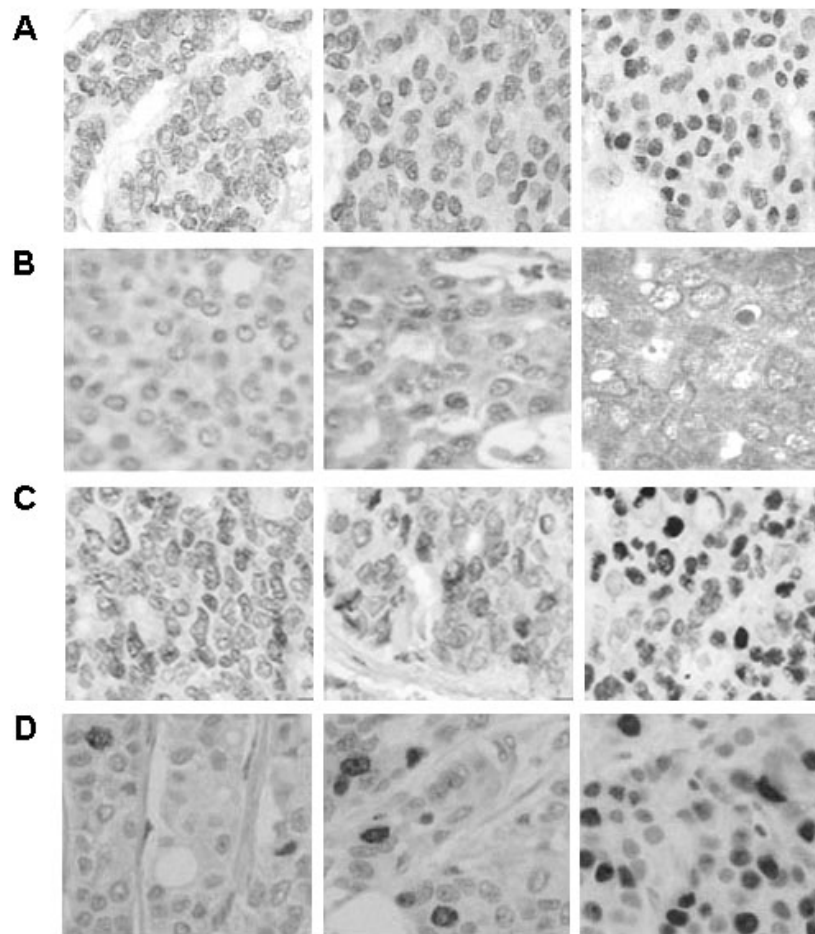


Figura 1. Células de carcinomas mamários mostrando marcação nuclear por imunohistoquímica do ER- α , PGR e do Ki-67 e marcação citoplasmática da proteína do ER- β . (A) ER- α ; (B) ER- β ; (C) PGR; (D) Ki-67. O escore positivo da marcação está indicado como 1+, 2+ e 3+. Para a análise do Ki-67: < 10%, 10%-25% e > 25%.

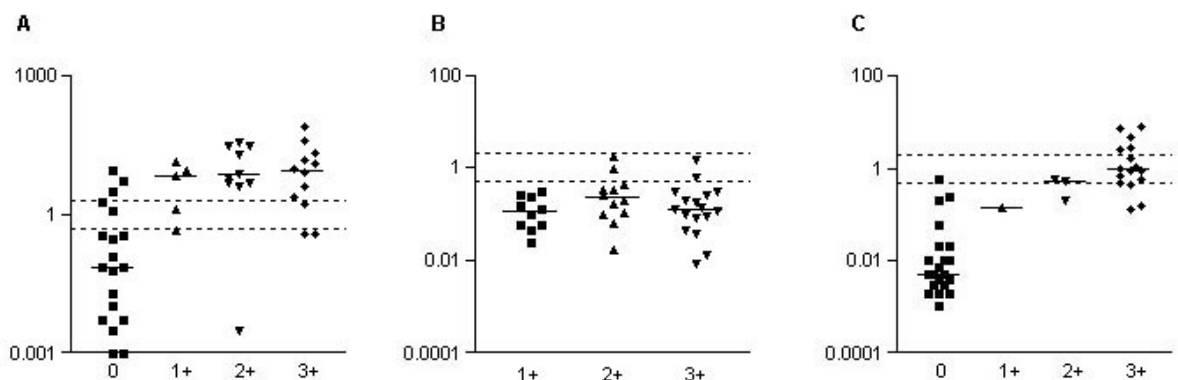


Figura 2. Comparação entre o status de imuno-histoquímica e os valores individuais de qRT-PCR. Os valores da expressão do transcrito estão indicados em escala logarítmica. As barras indicam o valor da mediana. (A) ER- α ; (B) ER- β ; (C) PGR.

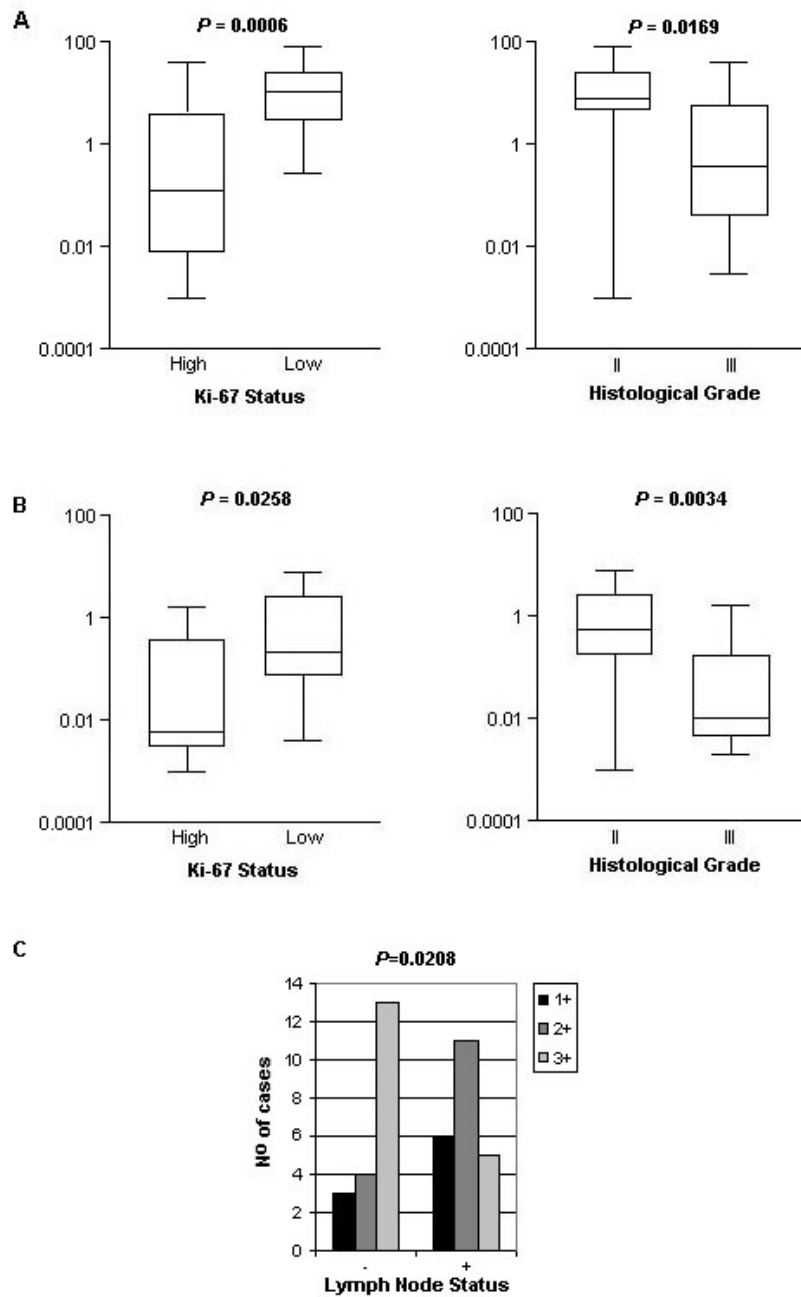


Figura 3. (A) Nível do transcrito do *ER- α* em comparação com a expressão do Ki-67 e com o grau histológico. (B) Nível do transcrito do *PGR* em comparação com a expressão do Ki-67 e grau histológico. (C) Correlação significativa entre a proteína do ER- β (1+, 2+, 3+ pela IHQ) e envolvimento de linfonodos. Valores de *P* estão presentes.

Artigo 2

Hibridação *in situ* cromogênica e PCR quantitativa em tempo real em comparação com a metodologia de imuno-histoquímica para predizer o padrão do *HER-2* em carcinomas mamários

Fabíola E. Rosa MSc^a, Sara M. Silveira^a, Cássia G. T. Silveira MSc^a, Nádia A. Bérghamo PhD^b, Francisco A. Moraes Neto MD^c, Maria A. C. Domingues MD, PhD^d, José R. F. Caldeira MD, PhD^e, Silvia R. Rogatto PhD^b

^aDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo

^bDepartamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo

^cDepartamento de Patologia, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo

^dDepartamento de Patologia, Faculdade de Medicina, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo

^eDepartamento de Mastologia, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo, Brasil.

Palavras-chave: câncer de mama; gene *HER-2*; expressão do RNAm; imuno-histoquímica; hibridação cromogênica *in situ*.

Correspondência para:

Silvia Regina Rogatto, PhD

Laboratório NeoGene - Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina - UNESP
Botucatu, São Paulo, Brasil

CEP: 18618-000

Telefone: 55-14-3811 6271

Fax: 55-14-3811 6271

E-mail: rogatto@fmb.unesp.br

Running Title: Expressão e amplificação do *HER-2* em câncer de mama

Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brasil.

Resumo

A avaliação do gene *HER-2* é constantemente realizada para o diagnóstico de pacientes com câncer de mama. Para elucidar o perfil molecular do *HER-2*, nós analisamos a expressão gênica e protéica em 75 carcinomas invasivos de mama por PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) e imuno-histoquímica (IHQ), respectivamente. As amplificações foram avaliadas em 43 destas amostras pela hibridação cromogênica *in situ* (CISH). A comparação dos resultados pelos três procedimentos mostrou uma discordância maior nos casos com escores 0 ou 1+ pela IHQ que mostraram alto nível de amplificação (15.4%) e expressão elevada (≥ 2.00) do *HER-2* (20%); e casos com escore 2+ que não apresentaram amplificação (50%) pela CISH e mostraram expressão diminuída (< 2.00) do *HER-2* (38.5%) pela qRT-PCR. A taxa de concordância entre os resultados de IHQ e qRT-PCR foi de 78.9%, enquanto para qRT-PCR e CISH foi de 91.9%; somente dois casos com alto nível de amplificação pela CISH apresentaram expressão diminuída do *HER-2* pela qRT-PCR. Em adição, a técnica de CISH permitiu a identificação da heterogeneidade intratumoral em relação ao padrão do *HER-2* em três casos. Entre os 37 casos avaliados pelas três metodologias, 83.8% mostraram concordância. Nos casos discordantes, a concordância foi observada entre os resultados de qRT-PCR e CISH. Baseado nestes achados, a qRT-PCR foi mais precisa e reprodutível que a IHQ. Além disso, a CISH se apresentou como um procedimento alternativo e útil para investigar amplificações envolvendo o gene *HER-2*. A comparação com os dados clinico-patológicos revelaram uma associação significativa entre as amostras com expressão diminuída do *HER-2* (qRT-PCR) e o envolvimento de menos do que quatro linfonodos. Estes dados, em concordância com os da literatura, sugerem um papel prognóstico deste marcador em câncer de mama.

1. Introdução

O câncer de mama é a neoplasia mais comum em mulheres, sendo altamente curável se diagnosticada precocemente. Os fatores prognósticos tradicionais incluem o acometimento de linfonodo axilar, tamanho do tumor, grau nuclear e grau histológico. Comumente, as metodologias utilizadas na prática clínica em câncer de mama são aquelas que identificam um ensaio terapêutico específico. A terapia hormonal, por exemplo, é baseada na avaliação do receptor de estrógeno (ESR) e do receptor de progesterona (PGR). Já a terapia com trastuzumab (HerceptinTM, Genentech, Inc, San Francisco, CA, USA), um anticorpo monoclonal humanizado, é baseada no padrão do HER-2.

O receptor do fator de crescimento epidermal tipo 2 (gene *HER-2*, *HER-2/neu*, *c-erb B2*) codifica uma proteína receptora de membrana pertencente à família de receptores de fatores de crescimento com atividade tirosina quinase [1,2].

O *HER-2* participa na patogênese de um número significativo de tumores, incluindo o câncer de mama. Ele está alterado em aproximadamente 20-30% dos carcinomas mamários e se manifesta como amplificação gênica e/ou expressão elevada da proteína [3-5]. Estas alterações estão associadas com sobrevidas livre e global da doença mais curtas e à resistência à terapia antiestrogênica com tamoxifeno e outros agentes quimioterápicos, sendo indiferente ao padrão de linfonodos ou ao nível da expressão do receptor hormonal [3,4,6,7]. Além disso, pacientes com câncer de mama apresentando amplificação ou expressão elevada do *HER-2* podem se beneficiar do tratamento baseado em antracíclicos, bem como com o trastuzumab (HerceptinTM) [8].

A escolha da terapia em pacientes com carcinoma mamário depende da discriminação do padrão do HER-2. Dados laboratoriais confiáveis são essenciais para que o tratamento seja benéfico aos tumores de mama avançados e para se evitar efeitos cardiotóxicos potenciais em mulheres com ausência de amplificação e aumento da expressão deste gene [9]. Os ensaios comumente utilizados na prática clínica para a avaliação do padrão do HER-2 é a imuno-histoquímica (IHQ) e a hibridação *in situ* fluorescente (FISH), ambos aprovados pelo FDA (*U.S. Food and Drug Administration*).

Entretanto, controvérsias consideráveis existem a respeito da acurácia destes métodos. Mais recentemente, a metodologia de CISH (hibridação cromogênica *in situ*) emergiu como uma alternativa à FISH, pois os sinais oriundos da CISH são permanentes, a morfologia dos cortes histológicos é mantida e a avaliação do padrão do *HER-2* nos tumores mamários é possível utilizando microscopia óptica convencional. A CISH é uma metodologia útil para confirmar resultados ambíguos da IHQ [10]. Em adição, a tecnologia baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido utilizada com sucesso na avaliação de seqüências específicas de RNAs, especialmente aquelas presentes em baixo número de cópias, em um número pequeno de células, ou em quantidades mínimas de tecido, bem como em RNAs expressos em populações de células mistas. A PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR) é um método quantitativo insensível a variabilidade entre observadores e de fácil padronização. Este procedimento é uma alternativa para avaliar o padrão do *HER-2* em carcinomas mamários humanos. A limitação da técnica é devido à heterogeneidade tumoral e à amplificação do *HER-2* em carcinomas não invasivos que podem ser evitadas com o uso de microdissecção a laser, embora isto pareça impraticável em um serviço de diagnóstico clínico [reviewed in Ref. 11].

A proposta deste estudo foi avaliar a concordância entre a detecção da amplificação gênica pela CISH, a expressão gênica (qRT-PCR) e protéica (IHQ), bem como avaliar a relevância desta técnica para a determinação do padrão do *HER-2* em carcinomas mamários. Em adição, os dados foram correlacionados com características clinico-patológicas, como tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos, grau histológico e padrão do Ki-67.

2. Material e Métodos

2.1. Pacientes

Setenta e cinco amostras de câncer de mama provenientes do Hospital Amaral Carvalho, Jaú (SP, Brasil) foram coletadas no período entre 2000 e 2004. As pacientes foram selecionadas consecutivamente e o critério para inclusão neste estudo foi a ausência

prévia de câncer de mama diagnosticado histologicamente. As pacientes foram submetidas à ressecção segmental ou mastectomia e nenhuma delas recebeu radio ou quimioterapia antes da cirurgia. Todas as pacientes foram avisadas dos procedimentos e assinaram o termo de consentimento informado. As informações de história familiar de câncer, particularmente as de parentes de primeiro e segundo graus foram anotadas e, quando possível, a ocorrência do câncer foi confirmada por prontuários médicos ou em certidões de óbito. O Comitê de Ética Brasileiro aprovou este estudo.

O seguimento clínico após a cirurgia variou de 23 a 83 meses; as pacientes foram acompanhadas a cada quatro meses após a cirurgia. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, uma parte das amostras tumorais foi congelada a -80°C . Os fragmentos de tecido congelado foram avaliados histologicamente e microdissecados para garantir a presença de pelo menos 90% de células neoplásicas. A classificação histológica foi realizada de acordo com a Classificação Internacional de Doença em Oncologia, o *WHO* [12], e o estadio clínico foi determinado pela classificação *UICC TNM* [13]. A malignidade dos carcinomas infiltrativos foi avaliada pelo sistema de graduação de Scarff-Bloom e Richardson [14]. Um resumo das informações clínicas e patológicas está apresentado na Tabela 1.

Após cirurgia, as pacientes receberam tratamentos quimioterápicos diferentes: AC (adriamicina, ciclofosfamida); FEC (5-fluorouracil, 4-epirrubicina, ciclofosfamida), FAC (5-fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida); CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil) (100% ou 70% da dose de acordo com a idade e a evolução clínica das pacientes). Cinquenta e cinco pacientes (73%) receberam radioterapia e 51 casos ESR1 positivo e/ou PGR positivo (68%), como determinado pela análise de imuno-histoquímica, foram tratados com tamoxifeno (20 mg/dia) ao final do tratamento quimioterápico, por 60 meses. As pacientes com intolerância ou efeitos colaterais (pós-menopausa) foram tratadas com inibidores de aromatase, como o anastrozole (1 mg/dia) ou letrozole (2.5 mg/dia).

2.2. Hibridação Cromogênica *In Situ* (CISH)

A CISH para o *HER-2* foi realizada em 43 amostras. Os cortes de tecido com 4 µm foram preparados de acordo com as instruções do kit *Zymed SPoT-Light HER2 CISH* (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA). Os cortes foram desparafinizados e aquecidos em tampão de pré-tratamento (*Spot-Light tissue pretreatment kit*, Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) a 97°C por 15 min e foram imediatamente lavados com água deionizada entre 20-25°C por 2 min. A digestão enzimática foi realizada com a aplicação da enzima de pré-tratamento (*Spot-Light tissue pretreatment kit*, Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) por 6 min a temperatura ambiente. As lâminas foram então lavadas em água deionizada por 2 min e desidratadas em um gradiente de etanol. A sonda do *HER-2* marcada com digoxigenina foi aplicada às lâminas. As lâminas foram cobertas com lamínulas, coladas com *rubber cement* e então desnaturadas em uma placa quente (95°C) por 5 min. A hibridação foi realizada *overnight* a 37°C em uma câmara úmida. As lâminas foram lavadas em citrato de salina padrão 0.5 X a 75°C por 5 min e então mergulhadas 3X em água deionizada por 2 min. As reações foram bloqueadas com H₂O₂ 3% em etanol absoluto, seguido por um tratamento em PBS/Tween 20. A imunodeteção foi feita utilizando o Kit comercial de detecção *Spot-Light CISH* (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA), de acordo com as instruções do fabricante. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina, mergulhadas em água deionizada e cobertas com a solução *Histomount™ Mounting* (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA).

Os sinais do gene *HER-2* foram pontuados nos cortes histológicos em pelo menos 200 células tumorais utilizando um microscópio óptico convencional (Olympus BX40, Japan). As lâminas foram aleatoriamente distribuídas para três observadores independentes (SMS, CGTS e NAB). Qualquer discrepância entre as classificações das amostras foi solucionada por uma revisão e o resultado final foi determinado por um consenso entre os observadores. Em adição, áreas diferentes, individualmente identificadas, do tumor foram analisadas. Os tumores foram classificados conforme o número de sinais por núcleo em: (a) sem

amplificação, aquelas células tumorais com dois a cinco sinais por núcleo; (b) amplificação de baixo nível, quando seis a dez sinais por núcleo foram detectados em mais do que 50% das células tumorais ou quando um pequeno agrupamento de sinal foi encontrado; (c) amplificação de alto nível, definido quando mais do que 10 cópias por núcleo ou grandes agrupamentos foram encontrados em mais do que 50% das células neoplásicas.

2.3. Extração de RNA total e transcrição reversa

O RNA total foi extraído do tecido tumoral congelado e pulverizado utilizando o *Rneasy mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram estocadas em água destilada livre de RNase, a -70°C. A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA, 18S e 28S, foram visualizadas em luz ultravioleta. Para evitar contaminação com DNA, as amostras foram digeridas com 1 unidade de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies, Rockville, MD, USA) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25 mM de EDTA pH 8.0. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (Peltier - Effect Cycling, MJ Research, Inc., USA) por 15 min em temperatura ambiente e a enzima foi inativada pelo aquecimento das reações a 70°C por 10 min. O RNA foi transcrito em um volume final de 20µl contendo 5x *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM de cada dNTP, 0.5µg/µl de Oligo (dT)₁₈, 0.1 M ditiotreitól e 200 unidades da transcriptase reversa *SuperScript™ II* (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min e a reação foi subsequente inativada por 15 min a 70°C. O cDNA foi estocado a -70°C.

2.4. RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Setenta e cinco carcinomas de mama foram avaliados pela qRT-PCR. Quatro amostras de mama normais de pacientes submetidas à redução mamária e confirmadas histopatologicamente como normais foram usadas como controle.

A amplificação por PCR foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os iniciadores e a sonda *TaqMan* para o gene *HER-2* e o gene referência, *GAPDH*, foram desenhados e sintetizados de acordo com o sistema *Assay-by-Design* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os dados quantitativos foram analisados utilizando o *software Sequence Detection System* (v1.0; Applied Biosystems). As reações de PCR foram realizadas em um volume total de 10µl, seguindo as instruções do fabricante. Uma curva-padrão relativa com diluições seriadas de cDNA de placenta (100, 50, 25, 12.5 e 8ng/uL) foi construída para cada iniciador. As curvas-padrão dos genes alvo e referência mostraram resultados semelhantes de eficiência (> 90%). A quantificação relativa foi dada pela razão entre o valor médio do gene alvo e o valor médio do gene referência (*GAPDH*) em cada amostra. A quantidade relativa do produto gerado pela PCR para cada conjunto de iniciadores foi determinada com base no valor de Ct. A quantificação relativa foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O nível de expressão relativa do *HER-2* foi comparado com o valor dos controles normais. A expressão aumentada foi definida como o valor médio entre a razão *HER-2*/gene referência, com $QR \geq 2.00$.

2.5. Imuno-histoquímica (IHQ)

O nível de proteína HER-2 foi analisado em 75 casos. Tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina foram seccionados (3 µm) e com estes cortes foram montados lâminas utilizando organossilano (3-aminopropil-trietoxi-silano) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). As lâminas foram desparafinizadas em xilol, gradualmente re-hidratadas em uma série de álcool e lavadas em solução de salina fosfatada tamponada (PBS). A atividade da peroxidase intrínseca foi bloqueada com peroxidase de hidrogênio e os cortes foram

incubados com o anticorpo primário. As reações de imuno-histoquímica para o HER-2 foram realizadas utilizando o anticorpo monoclonal de coelho (SP3 Clone) (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA) (diluição 1:100). Após a incubação por 1 h, os cortes foram lavados em PBS, incubados primeiramente por 30 min com o anticorpo biotilado secundário e em seguida com o complexo peroxidase estreptoavidina (LSAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA) por 30 min. A reação foi revelada com o cromógeno 3,3'-diaminobenzidina (DAB) e contracorada com hematoxilina. Lâminas para o controle negativo e positivo foram incluídas em cada ensaio. Os resultados foram classificados em: 0, expressão negativa; 1+, marcação fraca ou incompleta; 2+, marcação fraca e completa em mais de 10% das células tumorais, e marcação forte e completa em menos que 10% das células neoplásicas; e 3+, marcação forte e completa em mais que 10% das células neoplásicas. As lâminas foram distribuídas aleatoriamente para dois observadores independentes (FAMN e MACD). Qualquer discrepância entre as classificações das amostras foi solucionada por uma revisão e o resultado final foi determinado por um consenso entre os observadores. Somente o componente invasivo da neoplasia foi avaliado e classificado. O nível do Ki-67 foi analisado em todos os casos, mas 13 casos foram não-reativos. A mediana do índice de marcação do Ki-67, incluída neste estudo, foi utilizada como um limite para distinguir tumores com baixa ($\leq 25\%$) e alta ($> 25\%$) proliferação celular [15].

Os carcinomas de mama foram classificados nos subtipos luminal A, luminal B, basalóide e tumores *HER-2*, baseado nas definições de IHQ dos marcadores ESR1, PGR e HER-2, de acordo com Ihemelandu et al. [16]. A expressão protéica do ESR1 e PGR foi realizada como descrito por Rosa et al. [17].

2.6. Análise Estatística

A comparação entre a expressão do *HER-2* (qRT-PCR and IHQ), número de cópias do gene (CISH) e várias características clinico-patológicas foi calculada utilizando o teste de

Qui-quadrado. As seis pacientes com perda do seguimento clínico foram consideradas vivas nos cálculos estatísticos.

A correlação entre as três metodologias foi avaliada utilizando *One-way Analysis of Variance* (ANOVA); as diferenças foram testadas para significância pelo teste de *Mann-Whitney* para duas categorias e pelo teste de *Kruskal-Wallis* para três categorias. Resultados estatisticamente significativos foram considerados quando o $P < 0.05$. A concordância foi obtida considerando: (a) amplificação pela CISH e expressão aumentada do transcrito ($QR \geq 2.00$) e escore 2+ ou 3+; (b) sem amplificação pela CISH e expressão diminuída do transcrito ($QR < 2.00$) e escore 0 ou 1+.

3. Resultados

A amostra estudada consistiu de 75 carcinomas mamários femininos, dos quais a maioria apresentava neoplasia mamária de grau histológico II e III e acometimento de linfonodo axilar. Setenta tumores eram carcinomas ductais infiltrativos e cinco lobulares infiltrativos. A maioria das pacientes possuía idade superior a 50 anos (64%), sendo que a média foi de 58 ± 15.5 (variando de 30 a 94 anos); a maior parte dos tumores era maior que 2 cm (73.3%) e a metade deles apresentou baixa taxa de proliferação. A média de seguimento clínico foi de 49.8 ± 20.1 meses. Durante este intervalo, cinco pacientes morreram por causas não relacionadas, duas apresentaram recidiva na mesma mama, oito desenvolveram metástase (duas metástase óssea e seis metástase pulmonar) e em seis pacientes o seguimento clínico foi perdido.

As amostras de câncer de mama foram submetidas à avaliação da amplificação do gene *HER-2* e de sua expressão protéica utilizando CISH e IHC, respectivamente, realizada em cortes histológicos (Figure 1). A expressão do transcrito foi avaliada pela qRT-PCR em amostras a fresco após microdissecção. Os dados obtidos por todos os procedimentos estão apresentados nas Tabelas 2 e 3.

A CISH foi realizada em 40 amostras citológicas de 43 pacientes; nas três restantes a marcação apresentou resultados inconclusivos (sinais de cor parda que eram indistinguíveis). Nas outras amostras, os detalhes da morfologia eram evidentes e os agrupamentos grandes de cópias gênicas foram facilmente visualizados com objetiva de menor aumento. As características do núcleo foram mantidas. Células epiteliais normais e linfócitos mostraram um ou dois sinais do *HER-2* por núcleo. Vinte e quatro de 37 tumores (64.9%) apresentaram ausência de amplificação pela CISH, enquanto 13 amostras (35.1%) mostraram amplificação de alto nível do *HER-2*. Áreas diferentes do tumor foram avaliadas em todos os casos e a análise final mostrou concordância entre as regiões, exceto em três casos. Estes três casos apresentaram disparidades no padrão de hibridação, representando áreas diferentes do tumor, como apresentado na Figura 2. O primeiro caso (Figura 2A) apresentou ausência de amplificação (número equivalente de células com diploidia e polissomia) em uma área e alto nível de amplificação em mais de 50% das células em outra região. O segundo caso (Figure 2B) mostrou ausência de amplificação (polissomia) em ambas as áreas, mas em uma delas foi também observado amplificação de baixo nível. O terceiro caso (Figure 2C) mostrou ausência de amplificação; entretanto, uma área apresentou uma taxa elevada de polissomia e outra uma prevalência de células diplóides. Um número superior a 400 células foi avaliado para cada um desses casos.

A expressão relativa do *HER-2* foi avaliada pela qRT-PCR em 75 amostras comparadas a quatro tecidos normais de mama e variou entre QR=0.05 e 20.43. O aumento de expressão (QR \geq 2.00) foi observado em 29 dos 75 casos (38.7%). Em adição, os carcinomas foram classificados de acordo com os subtipos luminal A, luminal B, basalóide e tumores *HER-2*. Foi observado que o nível de expressão do *HER-2* foi significativamente maior nos carcinomas do tipo luminal B e tumores *HER-2* quando comparados com os subtipos luminal A e basalóide ($P < 0.0001$, dados não apresentados), confirmando a classificação por IHQ.

Entre os 75 casos analisados pela IHQ, 50 (66.7%) apresentaram um escore de 0 ou 1+. A marcação de 2+ compreendeu 13 amostras (17.3%) e 12 casos (16.0%) apresentaram um escore de 3+.

Análise da CISH em comparação com a IHQ: A taxa de concordância entre CISH e IHQ foi de 83.8% (31 casos). Quatro de 26 casos (15.4%) apresentando escore de 0 ou 1+ mostraram amplificação de alto nível pela CISH. Duas de quatro amostras (50%) com escore 2+ pela IHQ apresentaram amplificação de alto nível pela CISH. Todos os casos com escore 3+ pela IHQ mostraram amplificação pela CISH (sete casos).

Resultados de qRT-PCR comparados aos da IHQ: O nível de transcrito do *HER-2* foi significativamente mais baixo nos casos apresentando baixa expressão protéica do *HER-2* (escore 0 ou 1+) do que naqueles com expressão protéica elevada (escore 3+) (mediana RQ=0.93 e RQ=6.60, respectivamente) (Figure 3A). Dez de 50 casos (20%) apresentando um escore de 0 ou 1+ pela IHQ mostraram expressão elevada pela qRT-PCR. Oito (61.5%) de 13 amostras com escore 2+ apresentaram expressão aumentada pela qRT-PCR. Onze (91.7%) de 12 casos com escore 3+ pela IHQ apresentaram aumento de expressão do transcrito do *HER-2*. A concordância entre qRT-PCR e IHQ foi observada em 59 casos (78.7%).

Análise da qRT-PCR em comparação com a CISH: A concordância entre as metodologias de qRT-PCR e CISH foi observada em 34 casos (91.9%). O nível de expressão do *HER-2* pela qRT-PCR foi significativamente mais baixo nos casos com ausência de amplificação do gene *HER-2* pela CISH do que nos casos mostrando amplificação de alto nível (mediana RQ=0.75 e RQ=4.69, respectivamente) (Figure 3B). Nenhum dos 24 casos sem amplificação pela CISH apresentou expressão elevada do *HER-2*. Onze de 13 casos (84.6%) com amplificação de alto nível mostraram expressão elevada do *HER-2* pela qRT-PCR.

Entre os 37 casos avaliados pelas três metodologias, 31 (83.8%) apresentaram concordância entre os resultados. As discrepâncias foram encontradas em seis casos; quatro casos com escore 0 ou 1+ pela IHQ mostraram expressão elevada do *HER-2* e

amplificação pela CISH; e dois casos com escore 2+ pela IHQ apresentaram $QR < 2.00$ e ausência de amplificação pela CISH.

Os resultados do *HER-2* foram comparados às características clínico-patológicas (Table 1). Nenhuma correlação estatística foi observada com idade, tamanho tumoral, estadio clínico, grau histológico, taxa de proliferação e história familiar de câncer. Foi detectada uma correlação marginalmente significativa com envolvimento de linfonodos: 82.6% dos casos com $QR < 2.00$ mostraram associação com o envolvimento de menos de quatro linfonodos ($P=0.0915$). A comparação dos valores individuais da quantificação relativa do *HER-2* entre as duas classes de acometimento de linfonodos (<4 e ≥ 4) apresentou uma correlação significativa ($P=0.0350$), confirmando a associação entre casos com $QR < 2.00$ e envolvimento de menos do que quatro linfonodos (Figure 3C).

Entre os quatro carcinomas lobulares avaliados pelas três metodologias, dois apresentaram resultados discordantes: um caso mostrou amplificação de alto nível pela CISH, expressão elevada do *HER-2* pela qRT-PCR e escore negativo pela IHQ; a outra amostra mostrou ausência de amplificação pela CISH, $QR < 2.00$ pela qRT-PCR e escore 2+ pela análise de IHQ. Os dois casos restantes apresentaram ausência de amplificação, $QR < 2.00$ e escore negativo. O caso avaliado exclusivamente pelas técnicas de qRT-PCR e IHQ apresentou $QR < 2.00$ e escore negativo, respectivamente. Os valores individuais da quantificação relativa do *HER-2* pela qRT-PCR foram comparados entre os carcinomas ductais e lobulares e nenhuma associação significativa foi observada (mediana $QR=1.34 \pm 3.83$ e $QR=1.7 \pm 1.02$, respectivamente; $P=0.7375$, dados não apresentados).

4. Discussão

O gene *HER-2* tem sido extensivamente estudado como um marcador prognóstico e preditivo em carcinomas mamários, tornando este receptor um alvo valioso para o tratamento destas neoplasias [18]. O padrão do *HER-2* é predominantemente avaliado pela IHQ em decorrência de sua facilidade de execução e seu baixo custo. Entretanto, uma

significativa variação de sensibilidade e especificidade foi observada entre vários anticorpos comerciais [reviewed in Ref. 19]. Em adição, a FISH é utilizada para aqueles casos que são fracamente positivos pela análise de IHQ. A limitação deste procedimento é o uso de microscópio de fluorescência e suas implicações. A CISH é uma metodologia alternativa, em que é necessário um microscópio óptico convencional, permite uma interpretação mais rápida da análise e a revisão mais detalhada da morfologia tecidual. Uma vantagem adicional da CISH é que os sinais da sonda são permanentes e as lâminas podem ser arquivadas por longos períodos [20]. A RT-PCR quantitativa em tempo real apresenta o potencial de tornar-se uma metodologia padrão em termos de seu desempenho, acurácia, sensibilidade, extensão ampla de leitura e análise em larga escala [21, 22].

A comparação entre os resultados da CISH e IHQ revelaram que das 24 amostras com escore 0 ou 1+ pela IHQ, quatro apresentaram amplificação gênica pela CISH e expressão elevada pela qRT-PCR (mediana QR=4.09 ± 4.33). Metade das amostras com escore 2+ não mostraram amplificação pela CISH e tinham QR<2.00 pela qRT-PCR. Muitos estudos mostraram uma alta concordância entre a IHQ e a CISH; frequentemente, os casos discordantes tinham escore 2+ [22-25]. Em nosso estudo, todas as amostras com escore 3+ pela IHQ apresentaram amplificação do *HER-2* pela CISH. De fato, >90% dos tumores com escore 3+ pela IHQ apresentam amplificação do gene *HER-2* [26,27]. Os resultados gerados pela CISH e IHQ mostraram uma concordância de 83.8%. De forma semelhante, outros estudos apresentaram uma concordância variando de 85% a 95.3% [20,22,28]. Existem algumas diferenças no rastreamento do tecido entre estas duas técnicas. Enquanto o teste de IHQ requer que no mínimo 10% das células neoplásicas sejam reativas para ser consideradas positivas, a classificação dos tumores pela CISH necessita de um número superior a 50% das células tumorais mostrando um aumento no número de cópias gênicas para ser considerada amplificação (de acordo com os critérios utilizados no presente estudo). É concebível que estas diferenças poderiam causar alguns resultados discordantes como os observados entre as análises de IHQ e CISH.

Os resultados do presente estudo revelaram uma correlação significativa entre os níveis de expressão gênica e protéica. Estes dados estão de acordo com vários relatos em literatura que mostraram uma boa correlação entre a expressão gênica e protéica [22,29-32]. Dez amostras com escore 0 ou 1+ pela IHQ mostraram expressão elevada do *HER-2* pela qRT-PCR; quatro delas foram avaliadas pela CISH e apresentaram amplificação gênica. A análise quantitativa do transcrito revelou duas classes de expressão aumentada do *HER-2*: cinco casos mostraram uma mediana de $QR=4.09 \pm 4.33$ e cinco outros casos apresentaram mediana de $QR=2.19 \pm 0.21$, um valor muito próximo do valor de corte selecionado (2.00). Ntoulia et al. [22] relataram resultados similares (expressão elevada pela qRT-PCR e escore negativo pela IHQ) e concluíram que o valor de corte poderia ser mais alto ($QR>2.2$) para ser considerado significativo. De forma semelhante, Tse et al. [31] utilizaram um valor de corte de $QR>2.2$ para considerar a expressão elevada do *HER-2* positiva na comparação entre as metodologias de qRT-PCR, Elisa, IHQ e FISH realizadas em cortes embebidos em parafina provenientes de tumores mamários

Atualmente, a técnica mais utilizada para avaliar o gene *HER-2* em casos com escore 2+ é a FISH. Entretanto, a qRT-PCR surgiu como uma metodologia alternativa para avaliar o padrão do *HER-2*. Nós demonstramos que 61.5% das amostras com escore 2+ tinham expressão elevada pela qRT-PCR. De forma semelhante, Ntoulia et al. [22] mostraram uma concordância de 75%. Entre as nossas amostras, quatro de 12 pacientes que apresentaram resultados discordantes (escore 2+ e $QR<2.00$) tinham um prognóstico favorável, indicando que a avaliação do *HER-2* pela qRT-PCR poderia ser realizada nos tumores com escore 2+ como uma técnica relevante para a conduta clínica destas pacientes. Das pacientes mostrando escore 2+ e $QR\geq 2.00$ (oito casos), três apresentaram metástase, uma óssea e duas pulmonares.

A maior taxa de concordância (11 de 12 casos) foi observada entre os casos com escore 3+ pela IHQ e expressão elevada pela qRT-PCR. Somente uma amostra que apresentou escore 3+ e amplificação do *HER-2* mostrou expressão baixa do transcrito. Este

caso, com resultado falso-negativo pela qRT-PCR, provavelmente é resultado da diluição de células contendo amplificação gênica entre células não neoplásicas [33], embora a amostra tenha sido submetida a microdissecção.

A concordância entre os resultados de IHQ e qRT-PCR foi de 78.9%. A discordância entre as duas metodologias pode incluir diferenças entre os tecidos utilizados nos experimentos (tecido tumoral embebido em parafina e a fresco, respectivamente). Outra causa possível pode ser decorrente de erros entre os observadores devido à subjetividade não somente da interpretação da IHQ, mas também da análise de qRT-PCR, particularmente nos primeiros ciclos, que dependem não somente da temperatura de *melting* do *amplicon*, mas também do comportamento das seqüências genômicas ao lado do fragmento de interesse [34,35].

A comparação entre os dados de qRT-PCR e CISH mostrou que a mediana da expressão gênica estava correlacionada com o número de cópias do gene. Recentemente, Ntoulia et al. [22] e Bergqvist et al. [36] demonstraram uma correlação significativa entre o nível do transcrito e a amplificação do *HER-2* em carcinomas mamários avaliados pela CISH. A amplificação do gene *HER-2* é o mecanismo genético mais prevalente que leva a expressão elevada deste gene. Os casos discordantes (8.1%) apresentando amplificação de alto nível sem expressão elevada do *HER-2* mostraram escores de 2+ e 3+ pela IHQ. Tse et al. [31] e Vinatzer et al. [32] verificaram o número de cópias do gene *HER-2* pela FISH e compararam os resultados com a qRT-PCR. Os autores mostraram uma concordância entre as análises de 90% e 77%, respectivamente.

No presente estudo, foi observada uma alta correlação entre os três procedimentos utilizados para avaliar o *HER-2* em carcinomas mamários. A correlação entre CISH e qRT-PCR foi mais alta do que CISH e IHQ, e qRT-PCR e IHQ (91.9, 83.8 e 78.9%, respectivamente) para todas as amostras avaliadas. Estes resultados concordam com o estudo de Ntoulia et al. [22] que concluíram que a qRT-PCR é mais precisa e reprodutível que a IHQ.

Nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão do HER-2 pela IHQ ou número de cópias do gene e dados clínico-patológicos. Entretanto, uma associação significativa foi observada entre acometimento de linfonodos e a expressão do transcrito do *HER-2* pela qRT-PCR. Peiró et al. [37] analisaram o padrão do HER-2 pela IHQ e pela CISH e observaram uma correlação com grau histológico e invasão linfo-vascular, mas nenhuma associação foi encontrada com idade, tamanho tumoral e nível do Ki-67. De forma semelhante, a ausência de correlação entre o padrão do HER-2 e características clínicas e patológicas foi relatada em outros estudos [25,35].

Foi observado que carcinomas com os subtipos luminal B e tumores HER-2 mostraram expressão do transcrito mais elevada que os tumores luminal A e basalóide (mediana QR=3.6 ± 4.77 e QR=0.93 ± 1.90, respectivamente) (P<0.0001), como descrito em análises de expressão em larga escala utilizando *microarrays* [38,39].

Nenhuma diferença estatística foi observada entre os carcinomas ductais e lobulares avaliados pela qRT-PCR; provavelmente isto se deve ao número restrito de pacientes no grupo de tumores lobulares. Entre os carcinomas lobulares, a amplificação pela CISH foi observada em um caso, seguida pela expressão elevada do transcrito do *HER-2* e escore negativo pela IHQ. Li-Ning-T et al. [40] avaliaram cinco tumores lobulares invasivos e nenhum deles mostrou amplificação pela metodologia da CISH, entretanto dois casos apresentaram escore 2+ pela IHQ.

Três casos apresentaram padrões de hibridação desiguais pela CISH, representando áreas diferentes do tumor. Em dois casos (Figure 2B e C) foi possível discriminar, nas duas áreas, um perfil de ausência de amplificação, embora tenham sido encontrados resultados discordantes (diploidia e polissomia). O outro caso (Figure 2A) apresentou ausência de amplificação (diploidia e polissomia) e amplificação de alto nível. A questão é se as células mostrando níveis diferentes de amplificação fazem a diferença ou qual seria o valor de porcentagem de células neoplásicas amplificadas a ser utilizada para classificar os tumores em ausência ou presença de amplificação. Estudos posteriores devem ser realizados para

esclarecer a heterogeneidade tumoral envolvida na amplificação detectada em relação ao significado prognóstico e preditivo do *HER-2* em câncer de mama.

Em conclusão, nossos resultados sugerem que a avaliação do *HER-2* pode ser realizada pelas análises de CISH e qRT-PCR. A CISH combina as vantagens da IHQ e da FISH e é uma alternativa promissora para a FISH, enquanto a qRT-PCR é confiável, semi-automatizada e rápida. Ambas as metodologias podem ser realizadas na maioria dos laboratórios de patologia e ainda, apresentam vantagens do ponto de vista econômico. Em adição, nossos dados confirmam que a expressão elevada do *HER-2* está associada com um prognóstico ruim em carcinomas mamários humanos.

Agradecimentos

Os autores gostariam de agradecer ao patologista Dr. Francisco Carlos Quevedo e Adalberto Campanha por suas contribuições nas análises de imuno-histoquímica; Dr. Fausto Viterbo por conceder as amostras normais de mama para a análise da PCR quantitativa em tempo real; Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves por sua assistência na técnica de CISH; e a Invitrogen, São Paulo, Brasil por conceder o kit *Zymed SPoT-Light HER2 CISH*. Este estudo foi financiado pelo Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brasil.

5. Referências

- [1] Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230:1132-1139.
- [2] King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985;229:974-976.
- [3] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.

- [4] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712
- [5] Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erb-B2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999;112(Suppl 1):S53-67.
- [6] Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996;14:2702-2708.
- [7] Tetu B, Brisson J, Plante V, Bernard P. p53 and c-erbB-2 as markers of resistance to adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Mod Pathol* 1998;11:823-830.
- [8] Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-2648.
- [9] Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 2002;95:1592-1600.
- [10] Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15:657-665.
- [11] Hauser-Kronberger C, Dandachi N. Comparison of chromogenic in situ hybridization with other methodologies for HER2 status assessment in breast cancer. *J Mol Histol* 2004;35:647-653.
- [12] WHO World Health Organization: International Classification of Diseases for Oncology, 2nd edn. World Health Organization, Geneva, 1990.
- [13] UICC União Internacional Contra o Câncer: Classificação dos tumores malignos, 5° ed. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro-Brasil, 1998.
- [14] Bloom MJC, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer: a study of 1709 cases. *Br J Cancer* 1957;11:358-377.
- [15] Weikel W, Beck T, Mitze M, Knapstein PG. Immunohistochemical evaluation of growth fractions in

- human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:149-154.
- [16] 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* 2007;143:109-118.
- [17] Rosa FE, Caldeira JRF, Felipes J, Bertonha FB, Quevedo FC, Domingues MAC, Moraes Neto FA, Rogatto SR. Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathological factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers. *Hum Pathol* 2007 (*in press*).
- [18] Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:56-62.
- [19] Vanden Bempt I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen M, Wlodarska I, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Real-time reverse transcription-PCR and fluorescence in-situ hybridization are complementary to understand the mechanisms involved in HER-2/neu overexpression in human breast carcinomas. *Histopathology* 2005;46:431-441.
- [20] Kim GY, Oh YL. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in cytological samples of breast carcinoma. *Cytopathology* 2004;15:315-320.
- [21] Bièche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 2001;20:8109-8115.
- [22] Ntoulia M, Kaklamanis L, Valavanis C, Kafousi M, Stathopoulos E, Arapantoni P, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. HER-2 DNA quantification of paraffin-embedded breast carcinomas with LightCycler real-time PCR in comparison to immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Clin Biochem* 2006;39:942-946.
- [23] Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. *Pathol Int* 2001;51:579-584.
- [24] Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest* 2002;82:1007-1014.

- [25] Madrid MA, Lo RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res* 2004;6:R593-600.
- [26] Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol* 2005;36:250-261.
- [27] Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A, Piccart MJ, Larsimont D. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005;11:4393-4399.
- [28] Di Palma S, Collins N, Faulkes C, Ping B, Ferns G, Haagsma B, Layer G, Kissin MW, Cook MG. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2007;60:1067-1068.
- [29] Schlemmer BO, Sorensen BS, Overgaard J, Olsen KE, Gjerdrum LM, Nexø E. Quantitative PCR--new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:511-522.
- [30] Bossard C, Bieche I, Le Doussal V, Lidereau R, Sabourin JC. Real-time RT-PCR: a complementary method to detect HER-2 status in breast carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:4679-4683.
- [31] Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, Capeau J. Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clin Chem* 2005;51:1093-1101.
- [32] Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, Kaserer K, Schreiber M. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2005;11:8348-8357.
- [33] Lehmann U, Glockner S, Kleeberger W, von Wasielewski HF, Kreipe H. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2000;156:1855-1864.

- [34] Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem* 2000;46:1738-1743.
- [35] Kim YR, Choi JR, Song KS, Chong WH, Lee HD. Evaluation of HER2/neu status by real-time quantitative PCR in breast cancer. *Yonsei Med J* 2002;43:335-340.
- [36] Bergqvist J, Ohd JF, Smeds J, Klaar S, Isola J, Nordgren H, Elmberger GP, Hellborg H, Bjohle J, Borg AL, Skoog L, Bergh J. Quantitative real-time PCR analysis and microarray-based RNA expression of HER2 in relation to outcome. *Ann Oncol* 2007;18:845-850.
- [37] Peiró G, Aranda FI, Adrover E, Niveiro M, Alenda C, Payá A, Seguí J. Analysis of HER2 by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry in lymph node-negative breast carcinoma: Prognostic relevance. *Hum Pathol* 2007;38:26-34.
- [38] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-10874.
- [39] Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:9155-9158.
- [40] Li-Ning-T E, Ronchetti R, Torres-Cabala C, Merino MJ. Role of chromogenic in situ hybridization (CISH) in the evaluation of HER2 status in breast carcinoma: comparison with immunohistochemistry and FISH. *Int J Surg Pathol* 2005;13:343-351.

Tabela 1. Comparação das características clínico-patológicas com os resultados de qRT-PCR (qPCR), IHQ e CISH.

Características (n) ^a	qPCR		P *	IHQ		P *	CISH		P *
	<2.00	≥2.00		0/1+	2/3+		≤5	>10	
Idade									
≤50 (28)	15	13	0.2569	17	11	0.3651	9	5	0.9541
>50 (48)	32	16		34	14		15	8	
Acometimento de									
Linfonodos									
<4 (57)	38	19	0.0915	40	17	0.4723	21	9	0.1756
≥4 (32)	8	10		11	7		3	4	
ND (1)	0	1		0	1		0	0	
Tamanho do Tumor (cm)									
0 – 2 (19)	10	9	0.2953	11	8	0.2745	5	5	0.1883
>2 (56)	37	19		40	16		19	7	
ND (1)	0	1		0	1		0	1	
Estadio Clínico									
I/IIA/IIIB (65)	41	24	0.5901	44	21	0.7912	21	9	0.1756
IIIA/IIIB (11)	6	5		7	4		3	4	
Grau Histológico									
I/II (36)	22	14	0.9237	23	13	0.6767	10	6	1.000
III (35)	21	14		24	11		10	6	
ND (5)	4	1		4	1		4	1	
Fase S									
Baixa (≤ 25%) (32)	19	13	0.5354	21	11	0.7209	11	6	0.5133
Alta (> 25%) (31)	16	15		19	12		8	7	
NR (13)	12	1		11	2		5	0	
História Familiar de Câncer									
Sim (15)	7	8	0.1769	10	5	0.9678	4	3	0.6346
Não (61)	40	21		41	20		20	10	

^a Número de casos avaliados pela qRT-PCR e IHQ, enquanto 37 casos foram avaliados usando CISH.

* Teste do Qui-quadrado.

ND: não determinado; NR: não reativo.

Tabela 2. Razão *HER-2*/ gene referência pela qRT-PCR em relação a IHQ e a CISH.

	n (%)	qRT- PCR		Razão <2.00 n (%)	Razão ≥2.00 n (%)
		Razão do <i>HER-2</i> (variação) *	P		
IHQ					
0 or 1+	50 (66.7)	0.93 (0.05-12.24)	<0.0001 ^a	40 (80.0)	10 (20.0)
2+	13 (17.3)	2.69 (1.15-8.39)		5 (38.5)	8 (61.5)
3+	12 (16.0)	6.60 (1.07-20.43)		1 (8.3)	11 (91.7)
Total	75				
CISH					
Ausência de amplificação	24 (64.9)	0.75 (0.05-1.95)	<0.0001 ^b	24 (100)	0 (0.0)
Amplificação de alto nível	13 (35.1)	4.69 (1.07-20.43)		2 (15.4)	11 (84.6)
Total	37				

* Média da razão *HER-2*/ gene referência.

^a Teste de *Kruskal-Wallis*.

^b Teste de *Mann-Whitney*.

Tabela 3. Comparação entre os resultados de IHQ e CISH.

IHQ	CISH		Total
	Ausência de amplificação (%)	Amplificação de alto nível (%)	
0 or 1+	22 (84.6)	4 (15.4)	26
2+	2 (50.0)	2 (50.0)	4
3+	0 (0.0)	7 (100)	7
Total	24	13	37

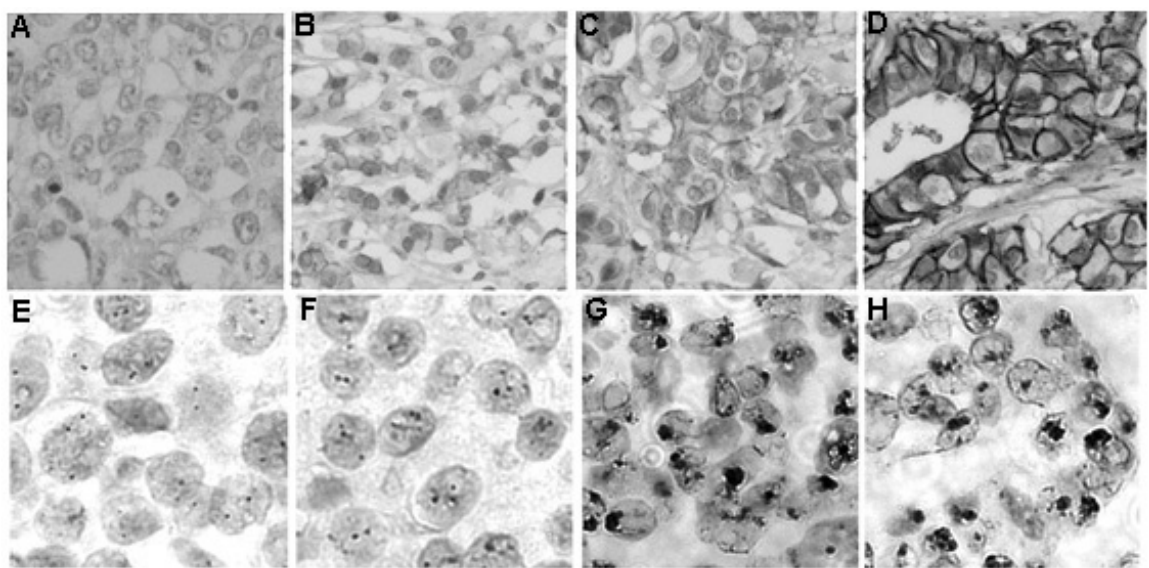


Figura 1. Células neoplásicas de mama mostrando os resultados de imuno-histoquímica e hibridação cromogênica *in situ* do *HER-2*. (A-D) IHQ: expressão protéica do *HER-2* com os escores 0 (A), 1+ (B), 2+ (C) e 3+ (D); (E-H) CISH: gene *HER-2* detectado em núcleos com dois sinais (E), mais que dois sinais (F) e amplificação de alto nível (G-H).

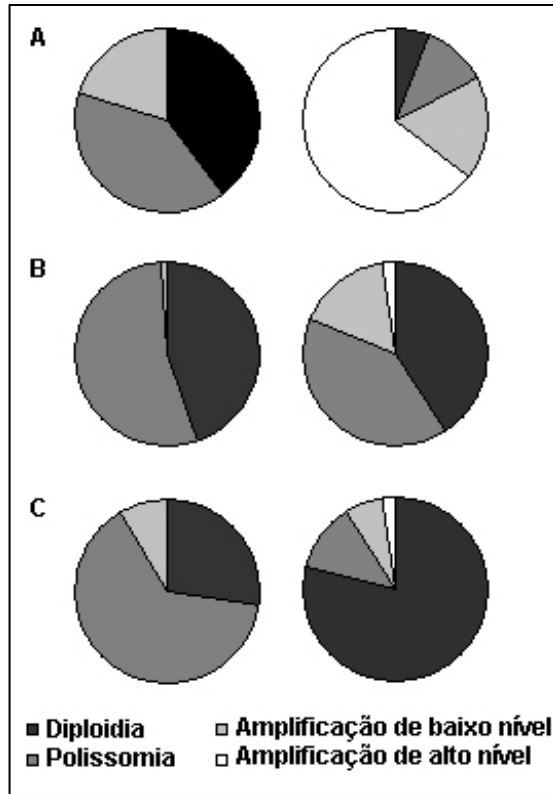


Figura 2. Heterogeneidade intratumoral detectada pela hibridação cromogênica *in situ* em duas áreas diferentes de três tumores de mama (A, B e C). Diploidia, polissomia, amplificação de baixo e alto nível foram observadas em diferentes áreas de um mesmo tumor.

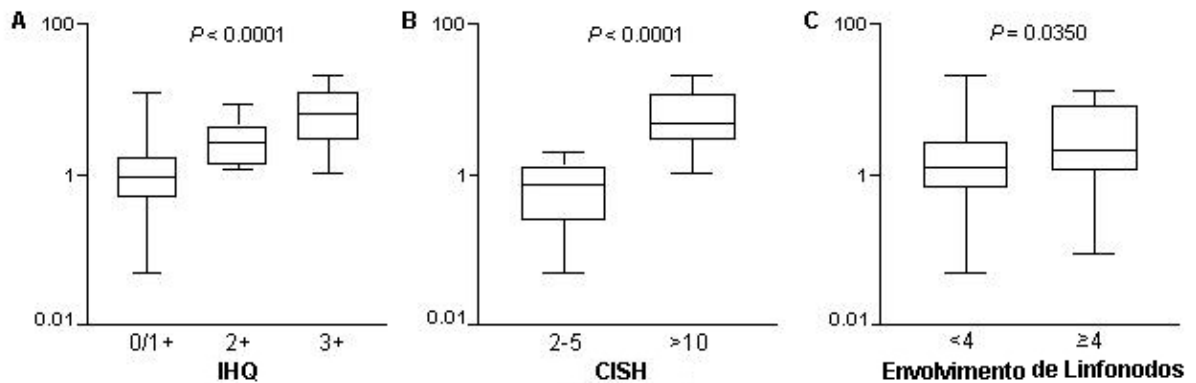


Figura 3. (A) Correlação entre os níveis de expressão do transcrito e da proteína (1+, 2+, e 3+); (B) Associação entre os níveis de expressão do transcrito e amplificação (2-5 sinais e >10 sinais ou grandes agrupamentos); (C) correlação significativa entre a expressão do transcrito do *HER-2* e acometimento de linfonodos (<4 nódulos e ≥4 nódulos). Os valores da expressão do transcrito pela qRT-PCR estão indicados em escala logarítmica. As barras indicam os valores das medianas. Os valores de *P* estão apresentados.

Artigo 3

Receptores de estrógeno e progesterona *versus* o antígeno de proliferação Ki-67 estão associados com perfis de expressão gênica distintos em câncer de mama

Fabíola E. Rosa MSc^{a*}, Renata A. Canevari PhD^{b*}, Francisco A. Moraes Neto MD^c, José R. F. Caldeira MD, PhD^d, Eduardo M. R. Reis PhD^{e*}, Sergio Verjovski-Almeida PhD^e, Sílvia R. Rogatto PhD^b

^aDepartamento de Genética, Instituto de Biociências, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

^bDepartamento de Urologia, Faculdade de Medicina, UNESP – Universidade Estadual Paulista, Botucatu, São Paulo.

^cDepartamento de Patologia, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo.

^dDepartamento de Mastologia, Hospital Amaral Carvalho, Jaú, São Paulo.

^eInstituto de Química, USP – Universidade de São Paulo, São Paulo, Brasil.

* Os autores contribuíram igualmente.

Palavras-chave: câncer de mama; *microarray*; expressão do RNAm; Ki-67; receptores hormonais.

Correspondência para:

Sílvia Regina Rogatto, PhD

Laboratório NeoGene - Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina - UNESP
Botucatu, São Paulo, Brasil

CEP: 18618-000

Telefone: 55-14-3811 6271

Fax: 55-14-3811 6271

E-mail: rogatto@fmb.unesp.br

Running Title: Perfil de expressão gênica baseado na expressão dos receptores hormonais e do Ki-67 em câncer de mama

Financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) e Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brasil.

Resumo

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea. A determinação da expressão dos receptores de estrógeno e progesterona é crucial para o delineamento de estratégias terapêuticas. Entretanto, a investigação de rotina da expressão do ESR1 e do PGR utilizando cortes histológicos de tecidos fixados em formalina mostrou uma grande variabilidade entre diferentes laboratórios, principalmente em casos com baixa expressão. A estratificação do padrão de expressão é importante para melhorar a conduta clínica e útil para superar estas limitações. A análise da expressão gênica global foi realizada em 29 (*training set*) e 39 (*validation set*) carcinomas ductais invasivos para comparar as amostras de acordo com o perfil de expressão do transcrito e da proteína dos genes ESR1 e PGR *versus* índice de proliferação (expressão proteica do Ki67). O primeiro grupo tinha padrão de expressão negativa do ESR1 e positiva do Ki-67 (> 25%) e foi comparado com expressão positiva do ESR1 e negativa do Ki-67 ($\leq 25\%$). O segundo grupo foi composto por casos PGR negativos e Ki-67 positivos (> 25%) e comparado com tumores PGR positivos e Ki-67 negativos ($\leq 25\%$). Na primeira comparação foram identificados 316 clones diferencialmente expressos ($P < 0.001$). Utilizando a classificação de “*leave-one-out*” este número reduziu para 68 seqüências ($P < 0.001$). Entre elas, quatro genes (*GATA3*, *REERG*, *CLAMP* e *AURKB*) foram escolhidos para validação pela RT-PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR). No segundo agrupamento foram observadas 345 seqüências diferencialmente expressas ($P < 0.001$). Após análise por “*leave-one-out*” o número de seqüências reduziu para 83 ($P < 0.001$) e incluíam cinco genes (*UBE2C*, *GTSE1*, *BIRC5*, *CLAMP* e *AURKB*) os quais foram selecionados para validação utilizando qRT-PCR. A comparação entre estes dois agrupamentos revelou a presença de 12 genes diferencialmente expressos em comum. O nível de expressão destes genes foi comparado entre amostras com expressão alta (> 25%) e baixa ($\leq 25\%$) do Ki-67. A expressão diminuída dos genes *GATA3*, *REERG* e *CLAMP* e elevada do *AURKB*, *UBE2C* e do *GTSE1* foi significativamente associada a tumores com Ki-67 >25% ($P=0.0033$, $P=0.0253$, $P=0.0385$, $P=0.0038$, $P=0.0230$ e $P=0.0387$, respectivamente). A comparação entre características clínico-patológicas (idade, grau histológico, tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos, estadio clínico e expressão do *HER-2*) e nível de expressão demonstrou que a expressão diminuída do *GATA3* e aumentada do *AURKB* e do *GTSE1* foram estatisticamente associadas com o grau histológico III ($P=0.0154$, $P=0.0231$ e $P=0.0371$, respectivamente). Embora nenhuma correlação significativa tenha sido encontrada, o nível de expressão diminuída do *REERG* e aumentada do *UBE2C* foi observado em tumores de alto grau histológico ($P=0.1056$ e $P=0.0712$, respectivamente). A associação entre a expressão dos genes avaliados e o nível de Ki-67 valida os resultados encontrados por

microarray. Em adição, a expressão dos genes *GATA3*, *AURKB* e *GTSE1* foi associada com grau histológico. Estes resultados corroboram com a função destes genes em aumentar o índice de proliferação celular e os apresentam como marcadores biológicos potenciais envolvidos na tumorigênese mamária.

1. Introdução

O câncer de mama é uma doença complexa e embora pesquisas recentes tenham enfatizado a heterogeneidade da doença, muitas características de sua biologia permanecem pouco compreendidas [1]. Atualmente, fatores prognósticos tradicionais incluem o acometimento de linfonodo axilar, tamanho do tumor, grau nuclear e grau histológico [2]. Em adição, na avaliação dos marcadores preditivos e prognósticos utilizados na rotina clínica inclui a detecção da expressão dos receptores hormonais (receptores de estrógeno e progesterona) e da amplificação e/ou expressão elevada do *HER-2*. Embora estes fatores sejam utilizados amplamente, é evidente que tumores classificados sob a mesma taxonomia morfológica e padrão hormonal podem apresentar características biológicas e clínicas distintas [3]. Além disso, níveis baixos do ESR1 (avaliados pela imunohistoquímica em tecidos fixados em formalina) mostraram uma grande variabilidade entre diferentes laboratórios [4]. Sabe-se que a expressão baixa deste epítipo não está necessariamente correlacionada com a atividade funcional da proteína ESR. Tecnologias genômicas atuais permitem determinar simultaneamente a expressão gênica de milhares de genes e avaliar as interações entre os genes expressos para entender a biologia tumoral e possibilitar a correlação destes dados com características clínicas. O principal objetivo destes estudos é descobrir marcadores que permitam a detecção precoce da doença, bem como a predição da resposta a tratamento e evolução clínica, como metástase, recorrência e sobrevida. A compreensão dos eventos moleculares e o desenvolvimento de marcadores confiáveis facilitarão novas descobertas terapêuticas e a melhoria na seleção das pacientes para os ensaios clínicos.

Os genes envolvidos no crescimento celular e na proliferação têm sido observados como diferencialmente expressos em quase todas as análises de *microarray* [5]. Ki-67 é um antígeno nuclear, cuja expressão está fortemente associada ao ciclo celular. Esta proteína está presente em todas as células que estão em divisão (normal e tumoral) e sua expressão é utilizada como um marcador para avaliar a fração de crescimento de uma população específica de células [6]. Ela está presente nas fases S, G1, G2 e M do ciclo celular, mas

está ausente em G0 [7]. O Ki-67 também tem sido associado a várias características clínico-patológicas. Alguns estudos mostraram uma correlação entre grau histológico elevado e alto Ki-67 [8-10]. Recentemente, nós observamos que carcinomas com alto nível de Ki-67 estavam associados significativamente com tumores apresentando expressão gênica reduzida e protéica não detectável do ESR1 e PGR, em concordância com estudos prévios [11-13]. Os tumores ESR1 positivos com ausência de expressão do Ki-67 foram significativamente associados à baixa contagem mitótica, sugerindo que a expressão do ESR1 está associada com a tumorigênese em tumores de mama bem diferenciado e menos diretamente relacionada à proliferação celular [9,10,14].

A aplicação mais importante do Ki-67 pode ser para avaliar a alteração de sua expressão durante o tratamento e para verificar qualquer relação que esta mudança apresente a uma resposta terapêutica subsequente, já que a alteração da proliferação celular é um fator determinante do padrão de crescimento dos tumores [15]. Em uma meta-análise envolvendo 12.155 pacientes, De Azambuja et al. [16] mostraram que a positividade do Ki-67 conferia um risco maior de recorrência e uma sobrevida menor em pacientes jovens com carcinoma de mama.

O Ki-67 foi associado com algumas assinaturas de proliferação, mostrando que um grupo de genes com expressão diferencialmente aumentada está correlacionado ao nível de proliferação celular. Perou et al. [17] demonstraram que tumores expressando níveis elevados de genes envolvidos no agrupamento de proliferação celular continha 70% ou mais de positividade do Ki-67, e que três tumores com média de expressão destes genes mais baixa mostraram somente 5-10% de positividade do Ki-67. Os autores concluíram que existe uma correlação entre o nível de expressão destes genes envolvidos com proliferação e o marcador convencional de proliferação de células neoplásicas. Tan et al. [9] compararam a expressão do Ki-67 com o perfil de expressão gênica. Os autores identificaram 28 genes, dos quais cinco mostraram expressão elevada nos tumores apresentando Ki-67 $\geq 40\%$, enquanto os 23 genes restantes apresentaram expressão diminuída. Vários genes com expressão diminuída estavam relacionados à morte celular (*BCL2*, *MAP2K4* e *TNFSF10*).

O objetivo deste estudo foi avaliar carcinomas de mama invasivos utilizando *microarray* de oligonucleotídeos para determinar um grupo de marcadores que é preditivo para o padrão de proliferação celular em tumores ESR1 e PGR negativos e que apresentam Ki-67 elevado. A análise de expressão pela RT-PCR em tempo real foi realizada para validação dos resultados e comparação com dados clinico-patológicos.

2. Material e Métodos

2.1. Pacientes

Um total de 63 amostras de carcinoma mamário provenientes do Hospital Amaral Carvalho, Jaú (SP, Brasil) foi coletado no período entre 2000 e 2004. As pacientes foram divididas em dois grupos: *training set* (34 casos) e *validating set* (39 casos). As pacientes foram selecionadas consecutivamente e o critério para inclusão neste estudo foi a ausência prévia de qualquer tipo de câncer diagnosticado histologicamente. As pacientes foram submetidas à ressecção segmental ou mastectomia e nenhuma delas recebeu radio ou quimioterapia antes da cirurgia. Todas as pacientes foram avisadas dos procedimentos e assinaram o termo de consentimento informado. As informações de história familiar de câncer, particularmente as de parentes de primeiro e segundo graus foram anotadas e, quando possível, a ocorrência do câncer foi confirmada por prontuários médicos ou em certidões de óbito. O Comitê de Ética Brasileiro aprovou este estudo.

O seguimento clínico após a cirurgia variou de 23 a 83 meses; as pacientes foram acompanhadas a cada quatro meses após a cirurgia. Imediatamente após o procedimento cirúrgico, uma parte das amostras tumorais foi congelada a -80°C . Os fragmentos de tecido congelado foram avaliados histologicamente e microdissecados para garantir a presença de pelo menos 90% de células neoplásicas. A classificação histológica foi realizada de acordo com a Classificação Internacional de Doença em Oncologia, o *WHO* [18], e o estadio clínico foi determinado pela classificação *UICC TNM* [19]. A malignidade dos carcinomas

infiltrativos foi avaliada pelo sistema de graduação de Scarff-Bloom e Richardson [20]. Um resumo das informações clínicas e patológicas está apresentado na Tabela 1.

Após cirurgia, as pacientes receberam tratamentos quimioterápicos diferentes: AC (adriamicina, ciclofosfamida); FEC (5-fluorouracil, 4-epirrubicina, ciclofosfamida), FAC (5-fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida); CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil) (100% ou 70% da dose de acordo com a idade e a evolução clínica das pacientes). Cinquenta e três pacientes (84%) receberam radioterapia e 44 casos ESR1 positivo e/ou PGR positivo (70%), como determinado pela análise de imuno-histoquímica, foram tratados com tamoxifeno (20 mg/dia) ao final do tratamento quimioterápico, por 60 meses. As pacientes com intolerância ou efeitos colaterais (pós-menopausa) foram tratadas com inibidores de aromatase, como o anastrozole (1 mg/dia) ou letrozole (2.5 mg/dia).

2.2. Extração de RNA total

O RNA total foi extraído do tecido tumoral congelado e pulverizado utilizando o *Rneasy mini Kit* (Qiagen GmbH, Hilden, Germany), de acordo com as recomendações do fabricante. As amostras de RNA foram estocadas em água destilada livre de RNase, a -70°C. A quantificação e a qualidade das amostras de RNA foram avaliadas utilizando o *NanoDrop (ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1, Labtrade)* e o *Bioanalyzer (RNA 6000 NanoLabChip kit/ 2100 Agilent Technologies)*, respectivamente.

2.3. Método de *Microarray*, Normalização e Análise Estatística

Trinta e quatro amostras, subdivididas em dois grupos, baseado nos resultados de imuno-histoquímica, foram avaliados pela metodologia de *microarray*. O primeiro grupo consistiu de 29 casos: 10 amostras apresentando expressão negativa do ESR1 (0 e 1+ e expressão diminuída do transcrito) e positiva do Ki-67 ($\geq 25\%$) em comparação com 19 casos apresentando expressão positiva do ESR1 (2 e 3+ e expressão aumentada do transcrito) e negativa do Ki-67 ($< 25\%$). O segundo grupo foi composto por 12 casos com

expressão negativa do PGR (0 e 1+ e expressão diminuída do transcrito) e positiva do Ki-67 ($\geq 25\%$) em comparação com 16 amostras mostrando expressão positiva do PGR (2 e 3+ e expressão aumentada do transcrito) e negativa do Ki-67 ($< 25\%$).

Os experimentos de expressão gênica foram realizados utilizando o sistema de *array* CodeLink (GE Healthcare Buckinghamshire, UK) de acordo com o protocolo do fabricante. Em resumo, a primeira fita de cDNA foi produzida utilizando 2 μg de RNA total para cada amostra, enzima *Superscript II reverse transcriptase* e um iniciador T7-poli-dT. A segunda fita de cDNA foi produzida usando *RNase H* e *E. coli DNA polymerase I*. A fita dupla de cDNA foi purificada em uma coluna *QIAquick* (Qiagen) e uma amplificação linear para gerar moléculas de cRNA foi realizada utilizando *T7-RNA polimerase* e análogo de UTP marcado com biotina-11-UTP (Perkin Elmer-Foster City, CA, USA). O cRNA fragmentado de cada amostra foi hibridado aos *microarrays* CodeLink, contendo aproximadamente 55.000 sondas de 30-mer. A reação foi realizada *overnight*, incubada a 37°C e sob agitação (300 rpm). Após as lavagens, as moléculas-alvo hibridadas foram reveladas pela incubação dos *arrays* com Cy5-estreptoavidina. Os reagentes utilizados na síntese e fragmentação do cRNA são fornecidos no kit *CodeLink expression assay* (GE Healthcare). Os sinais do fluorocromo Cy5 das moléculas hibridadas foram detectados com o aparelho *Axon GenePix 4100B Scanner* (Axon Instruments Foster City, CA, USA) e visualizados com o programa *ImageQuant* (GE Healthcare). O *software* de análise de expressão CodeLink (GE Healthcare) foi utilizado para obter *spots* com intensidade abaixo do *background*. Um grupo de 53.423 sondas de cDNA no *array* de 55K foi analisado. Destas, somente 35.505 sondas apresentaram medidas válidas (ex. foram detectadas acima da média do *background*, como determinado por um grupo de controles negativos representados nos *arrays* CodeLink). Os dados de intensidade das diferentes hibridações foram normalizados pelo método *quantil*. Para identificar assinaturas genômicas, o teste *Signal-to-Noise Ratio* (SNR) [21] foi aplicado comparando os dados de intensidade de expressão de todas as amostras. O parâmetro SNR é essencialmente uma medida de sinal relativa ao *background*. Um ponto de corte de $\text{SNR} \geq |0.2|$ foi utilizado para selecionar os genes diferencialmente expressos. A expressão

diferencial considerada estatisticamente significativa (valor de P) foi estimada pela análise de *bootstrap* (ex. por um novo cálculo dos valores de SNR, dado por sua freqüência em 10.000 permutações randômicas de amostras marcadas) [22]. A robustez da assinatura de expressão gênica foi avaliada por “*leave-one-out*” *cross-validation* [23]. Este método permite que uma amostra seja removida e que um novo grupo de genes alterados significativamente seja determinado utilizando as amostras restantes. Este processo foi repetido para cada uma das amostras e a freqüência de aparecimento de cada gene nos vários testes de “*leave-one-out*” foi gerada considerando uma dada significância de $P \leq 0.001$ para a análise dos dois agrupamentos (ESR1 e PGR). A reprodutibilidade das medidas de expressão gênica foi vista após o preparo de duas réplicas independente para duas amostras.

2.4. RT-PCR quantitativa em tempo real

Digestão do DNA e transcrição reversa

A qualidade das amostras de RNA foi confirmada por eletroforese em gel de agarose 2% corado com brometo de etídio e as bandas de RNA, 18S e 28S, foram visualizadas em luz ultravioleta.

Para evitar contaminação com DNA, as amostras foram digeridas com 1 unidade de *Dnase I Amplification Grade* (Life Technologies, Rockville, MD, USA) em 10X *Dnase I Reaction Buffer* e 25 mM de EDTA pH 8.0. As reações foram realizadas em um termociclador PTC-100 (Peltier - Effect Cycling, MJ Research, Inc., USA) por 15 min em temperatura ambiente e a enzima foi inativada pelo aquecimento das reações a 70°C por 10 min. O RNA foi transcrito em um volume final de 20µl contendo 5x *First-Strand Buffer* (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM de cada dNTP, 0.5µg/µl de Oligo (dT)₁₈, 0.1 M ditiotreitol e 200 unidades da enzima transcriptase reversa *SuperScript™ II* (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). A transcrição reversa foi realizada a 42°C por 60 min e a reação foi subseqüentemente inativada por 15 min a 70°C. O cDNA foi estocado a -70°C.

RT-PCR Quantitativa

Trinta e nove carcinomas de mama foram avaliados pela qRT-PCR para avaliar a expressão dos genes *GATA3*, *RERG*, *CLAMP*, *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1* e *BIRC5*. Quatro amostras de mama normais de pacientes submetidas à redução mamária e confirmadas histopatologicamente como normais foram usadas como controle.

A amplificação pela PCR foi realizada no aparelho *ABI Prism 7000 Sequence Detection System* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os iniciadores foram desenhados utilizando o *software Primer Express* (v2.0; Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os dados quantitativos foram analisados utilizando o *software Sequence Detection System* (v1.0; Applied Biosystems). As reações de PCR foram realizadas com o reagente *Power SYBR Green I* (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA), em um volume total de 10µl, seguindo as instruções do fabricante. Em adição, iniciadores e sondas do sistema Taqman para os genes *ESR1*, *PGR* e o *GAPDH* foram desenhados e sintetizados de acordo com o *Assay-by-Design* (Applied Biosystems). Curvas-padrão relativas com diluições seriadas de amostras de cDNA de doença benigna mamária (100, 20, 4, 0.8 e 0.16ng/uL) foram construídas para cada iniciador. As curvas-padrão dos genes alvos e referência mostraram resultados semelhantes de eficiência (> 90%). A quantificação relativa foi dada pela razão entre o valor médio do gene alvo e o valor médio do gene referência (*GAPDH*) em cada amostra. A quantidade relativa do produto gerado pela PCR para cada conjunto de iniciadores foi determinada com base no valor de Ct. A quantificação relativa (QR) foi calculada pela fórmula $2^{-\Delta\Delta CT}$. O nível de expressão relativa do gene alvo foi comparado com o valor dos controles normais. A expressão aumentada foi definida como o valor médio entre a razão gene alvo/referência, com $QR \geq 2.00$ e expressão diminuída $QR < 0.50$.

2.5. Imuno-histoquímica

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas utilizando o anticorpo RTU-ER-6F11 (Novocastra, Newcastle, UK) (diluição 1:50), o *monoclonal anti-human progesterone receptor 1A6* (DAKO, Carpinteria, CA, USA) (diluição 1:50) e o *rabbit monoclonal* (Clone SP3) (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA) (dilution 1:100) para o ESR1, PGR e HER-2, respectivamente. O escore de positividade para o ESR1 e o PGR foi realizado visualmente estimando a porcentagem de coloração nuclear positiva em $\geq 10\%$ das células neoplásicas e as amostras foram agrupadas em: intensidade fraca (1+), moderada (2+) e forte (3+). Os resultados do HER-2 foram classificados em: 0, expressão negativa; 1+, marcação fraca ou incompleta; 2+, marcação fraca e completa em mais de 10% das células tumorais, e marcação forte e completa em menos que 10% das células neoplásicas; e 3+, marcação forte e completa em mais que 10% das células neoplásicas. As lâminas foram distribuídas aleatoriamente para dois observadores independentes (FAMN e FCQ). Qualquer discrepância entre as classificações das amostras foi solucionada por uma revisão e o resultado final foi determinado por um consenso entre os observadores. Somente os componentes invasivos da neoplasia foram avaliados e classificados. O nível do Ki-67 foi analisado em todos os casos. A mediana do índice de marcação do Ki-67, incluída neste estudo, foi utilizada como um limite para distinguir tumores com baixa ($\leq 25\%$) e alta ($> 25\%$) proliferação celular [24].

2.6. Análise Estatística

A análise estatística dos resultados de qRT-PCR foi realizada como descrito abaixo. Três pacientes com perda do seguimento clínico foram consideradas vivas nos cálculos estatísticos. A correlação entre a expressão dos genes-alvo e o *HER-2* foi avaliada utilizando o teste de correlação de *Spearman*. A expressão dos genes-alvo foi comparada com as características clinico-patológicas usando *One-way Analysis of Variance* (ANOVA) para determinar se havia uma diferença significativa de expressão entre os dados clínicos;

as diferenças foram testadas para significância pelo teste de *Mann-Whitney* para duas categorias, e pelo teste de *Kruskal-Wallis* para três categorias. Resultados estatisticamente significativos foram considerados quando o $P < 0.05$.

3. Resultados

As amostras de câncer de mama foram avaliadas por *microarray* para analisar a expressão diferencial de genes e pela qRT-PCR para validar os resultados de *microarray* e correlacionar os achados com as características clínico-patológicas. O grupo de amostras avaliadas consistiu de 63 carcinomas mamários femininos, dos quais a maioria apresentou neoplasia mamária de grau histológico II e III e acometimento de linfonodo axilar. Cinquenta e nove tumores eram do tipo ductal infiltrativo e quatro eram lobular infiltrativo. A maioria das pacientes possuía idade superior a 50 anos (66%), sendo que a média foi de 58.9 ± 14.9 (variando de 30 a 94 anos); a maioria dos tumores era maior que 2 cm (71.4%) e 57.1% deles apresentou baixa taxa de proliferação. A média do seguimento clínico foi de 53.7 ± 19.8 meses. Durante este intervalo, três pacientes foram a óbito por causas não relacionadas, uma apresentou recidiva na mesma mama, oito desenvolveram metástase (duas metástase óssea e seis metástase pulmonar) e em três pacientes o seguimento clínico foi perdido.

Genes diferencialmente expressos pela análise de microarray

Um grupo de 34 casos (*training set*) foi selecionado para a análise discriminatória da expressão gênica. Dois grupos (29 e 28 casos para o agrupamento do ESR1 e do PGR, respectivamente) foram analisados baseado nas análises de imuno-histoquímica e qRT-PCR: a) 10 amostras apresentando tumores ESR1 negativos e Ki-67 positivos em comparação com 19 casos com tumores ESR1 positivos e Ki-67 negativos; b) 12 tumores PGR negativos e Ki-67 positivos em comparação com 16 tumores PGR positivos e Ki-67 negativos.

ERS1 versus Ki-67

Um agrupamento hierárquico supervisionado foi realizado utilizando um valor de $SNR \geq |0.2|$ e um nível de significância de $P < 0.001$, em que 316 seqüências foram diferencialmente expressas. Análises adicionais utilizando a classificação de “*leave-one-out*” reduziu o grupo inicial de 316 clones para um classificador contendo 68 seqüências ($P < 0.001$) (Figura 1A, Tabela 2). Deste, 54 clones foram identificados em mais do que 79% dos “*leave-one-out*” datasets e 14 seqüências estavam presentes em todos os “*leave-one-out*” datasets.

Os 68 clones selecionados consistiam de 18 *ESTs*, quatro seqüências não determinadas, três proteínas hipotéticas e 43 genes conhecidos. Entre os 43 genes, 20 tinham aumento de expressão e 23 genes apresentaram expressão diminuída nos tumores Ki-67 positivos. A anotação funcional dos 43 genes diferencialmente expressos utilizando o *NCBI database* mostrou que 25 deles tem uma função conhecida ou inferida [4 proliferação, 4 transcrição, 2 adesão, 5 transporte, 2 duplicação do DNA, 2 apoptose, 1 resposta imune, 2 metabolismo (carboidrato e proteína), 1 organização do citoesqueleto, 1 via de sinalização *notche*, 1 regulação da atividade *Rab GTPase*].

PGR versus Ki-67

Um agrupamento hierárquico supervisionado foi realizado utilizando um valor de $SNR \geq |0.2|$ e um nível de significância de $P < 0.001$, onde 345 seqüências estavam diferencialmente expressas. Em adição, a classificação por “*leave-one-out*” reduziu para 83 seqüências o grupo inicial de 345 clones ($P < 0.001$) (Figura 1B, Tabela 3). Destas seqüências, 60 clones foram identificados em mais do que 79% dos “*leave-one-out*” datasets e 23 seqüências estavam presentes em todos os “*leave-one-out*” datasets.

Entre as seqüências selecionadas estavam 23 *ESTs*, cinco clones não determinados, sete proteínas hipotéticas e 48 genes conhecidos. Destes 48 genes, 33 mostraram aumento de expressão e 15 expressão diminuída em tumores Ki-67 positivos. A anotação funcional

destes genes mostrou que 29 têm uma função conhecida ou inferida [14 proliferação, 2 transcrição, 4 transporte, 1 apoptose, 1 resposta imune, 3 metabolismo (carboidrato e lipídeo), 1 organização do citoesqueleto, 1 processo de biossíntese de estrógeno, 1 regulação negativa da migração celular e 1 processo catabólico de RNAt].

Comparação entre as análises do ESR1 e do PGR

A sobreposição dos dois agrupamentos foi de 12 genes. Entre eles, quatro estavam funcionalmente envolvidos em transporte (*SLC25A35* e *SLC29A4*), apoptose (*TNFRSF21*) e proliferação celular (*AURKB*). Em adição, o gene *CLAMP* foi encontrado nos dois agrupamentos.

Validação pela PCR quantitativa em tempo real (qRT-PCR)

Do grupo de 68 e 83 seqüências para os agrupamentos do ESR1 e do PGR, respectivamente, foram selecionados sete genes para validação pela qRT-PCR. Estes genes foram escolhidos devido a sua importância na proliferação celular e seu envolvimento na via do ESR1, como descrito na literatura. Quatro genes estavam presentes no agrupamento do ESR1 (*GATA3*, *REGG*, *CLAMP* e *AURKB*), cinco no do PGR (*UBE2C*, *GTSE1*, *BIRC5*, *CLAMP* e *AURKB*) e dois deles estavam presentes nos dois agrupamentos (*CLAMP* e *AURKB*). Os genes com expressão diminuída nas amostras Ki-67 positivas pela análise de *microarray* eram o *GATA3*, *REGG* e o *CLAMP*. Os níveis de expressão do RNAm foram quantificados em um grupo de 32 casos para os genes *GATA3* e *REGG*, em 39 amostras para o *CLAMP* e o *AURKB* e em 28 tumores para o *UBE2C*, *GTSE1* e o *BIRC5*. O nível de expressão relativa dos genes-alvos foi comparado com o nível de quatro amostras de mama de mulheres saudáveis.

Agrupamento do ESR1

A expressão relativa dos genes *GATA3*, *REGG*, *CLAMP* e *AURKB* foi comparada entre amostras com Ki-67 positivo (12 amostras: *GATA3* e *REGG*; 16 amostras: *CLAMP* e

AURKB) e Ki-67 negativo (20 amostras: *GATA3* e *REGG*; 23 amostras: *CLAMP* e *AURKB*). A expressão relativa estava significativamente associada com o nível protéico de Ki-67 ($\leq 25\%$ e $>25\%$) para todos os genes avaliados ($P=0.0033$, $P=0.0253$, $P=0.0385$ e $P=0.0038$ para *GATA3*, *REGG*, *CLAMP* e *AURKB* genes, respectivamente). Uma redução da expressão foi observada para os genes *GATA3*, *REGG* e *CLAMP* quando o escore do Ki-67 foi $>25\%$. O oposto foi observado para a expressão do *AURKB* (Figura 2).

Os valores de expressão quantitativa relativa (RQ) foram comparados com as características clínico-patológicas (idade, grau histológico, tamanho tumoral, acometimento de linfonodos, estadio clínico e expressão do *HER-2* pela qRT-PCR) (Figura 3). Expressão diminuída e aumentada dos genes *GATA3* e *AURKB*, respectivamente, foram associadas estatisticamente com grau histológico III ($P=0.0154$ e $P=0.0231$, respectivamente). Embora não significativo, uma expressão diminuída dos genes *REGG* e *CLAMP* foram observadas em tumores de grau III e em pacientes com idade inferior a 50 anos, respectivamente ($P=0.1056$ e $P=0.0841$, respectivamente).

Agrupamento do PGR

A expressão relativa dos genes *UBE2C*, *GTSE1* e *BIRC5* foi comparada entre amostras com Ki-67 positivo (14 casos) e Ki-67 negativo (14 casos). A análise de expressão do *CLAMP* e do *AURKB* foi realizada como descrito acima (agrupamento do ESR1). A expressão relativa do *UBE2C* e do *GTSE1* estava significativamente associada com o nível protéico do Ki-67 ($P=0.0230$ e $P=0.0387$, respectivamente). O gene *BIRC5* apresentou uma expressão mais elevada nos tumores Ki-67 positivos do que nos negativos, embora nenhuma correlação tenha sido observada ($P=0.1389$). O aumento na expressão dos genes *UBE2C*, *GTSE1* e *BIRC5* foi observada quando a expressão protéica do Ki-67 foi $>25\%$ (Figura 2).

Os valores de expressão relativa também foram comparados às características clínico-patológicas, como descrito acima (Figura 3). A expressão aumentada do *UBE2C* foi

observada em tumores de grau histológico III, mas sem correlação estatisticamente significativa ($P=0.0712$), enquanto a expressão elevada do *GTSE1* foi estatisticamente associada com amostras de grau histológico III ($P=0.0371$). Nenhuma diferença significativa foi observada entre o nível de expressão do *BIRC5* e os dados clínicos e histopatológicos.

4. Discussão

A determinação do nível de expressão do ESR1 e PGR é crucial para a decisão das estratégias terapêuticas nas pacientes com câncer de mama. A interação entre o estrógeno e o ESR1 no núcleo da célula induz transcricionalmente a expressão de muitos genes *downstream*, incluindo o gene *PGR*, resultando na síntese do DNA, divisão celular, e a produção de fatores de crescimento levando à proliferação celular [25]. Interessantemente, em muitas lesões pré-neoplásicas e neoplásicas, a expressão do ESR1 e Ki-67 parece estar diretamente correlacionada, mostrando ser uma alteração molecular inicial importante durante o desenvolvimento da neoplasia da mama (revisado por [14]). Contudo, nem todos os tumores de mama mostram correlação positiva entre os níveis de expressão do ESR1 e do Ki-67. Recentemente, nós demonstramos que baixos níveis dos transcritos *ESR1* e *PGR* foram significativamente associados com altos níveis do Ki-67, principalmente em tumores de alto grau [10].

Baseado nas diferenças entre os tumores com altos e baixos níveis de expressão do Ki-67, nós avaliamos a expressão diferencial dos genes subdivididos em dois grupos, um grupo comparando o *status* positivo e negativo do ESR1, e o outro grupo o *status* positivo e negativo do PGR, ambos em relação ao *status* do Ki-67. Nós subdividimos as amostras de acordo com os dois receptores para discriminar os genes diferencialmente expressos nesses grupos. A análise revelou 68 e 83 seqüências diferencialmente expressas para os grupos ESR1 e PGR, respectivamente. No grupo do ESR1, foi encontrado o gene *GATA3*, descrito previamente na literatura [23, 26], e outros genes envolvidos no transporte e proliferação celular. No grupo do PGR, 48% dos genes com função conhecida ou inferida estão envolvidos na proliferação celular. A sobreposição entre as duas análises revelou 12

genes, a maioria dos quais com função desconhecida. Nas amostras do grupo do ESR1, um dos 10 casos com *status* ESR1 negativo mostrou PGR positivo por imuno-histoquímica e expressão aumentada do transcrito (dados não apresentados). Nos casos pertencentes ao grupo do PGR, três dos 12 casos que apresentaram *status* negativo do PGR mostraram *status* positivo do ESR1 (dados não apresentados).

No presente estudo, foi utilizado o perfil de expressão gênica por *microarray* para explorar as implicações do *status* do Ki-67 em assinaturas de genes de proliferação. Foram encontrados nos agrupamentos do ESR1 e do PGR, 17 genes envolvidos com a proliferação celular. Destes, os genes *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1* e *BIRC5* foram selecionados para a análise de validação usando qRT-PCR. Além disso, foram selecionados os genes *GATA3* e *REERG*, previamente descrito na carcinogênese mamária, e o gene *CLAMP*, com função não conhecida. Schneider et al. [26] avaliou 56 carcinomas ductais invasivos pela tecnologia de *microarray* e encontraram uma assinatura de 10 genes associados com a expressão do ESR1. Oito dos 10 genes selecionados estavam presentes na plataforma usada no presente estudo e somente os genes *ESR1* e *GATA3* mostraram expressão diferencial.

Os genes selecionados neste estudo foram detectados em algumas análises de *microarrays*, principalmente aqueles envolvidos com o grupo do ESR1, tais como o *GATA3* [17, 26, 27, 29-33] e o *REERG* [29,33] ou com assinaturas de proliferação, tais como o *AURKB* [34], *UBE2C* [34-37] e *BIRC5* [32]. Os genes *CLAMP* e *GTSE1* foram selecionados pelos seus papéis na proliferação celular e na proteção das células contra a apoptose dependente de p53, respectivamente [38,39]. Em adição, um pequeno número de estudos avaliou a correlação desses genes com dados clínico-patológicos.

A análise de *microarray* revelou que a expressão reduzida dos genes *GATA3*, *REERG* e *CLAMP* estava associada com o nível elevado de Ki-67, enquanto o oposto foi observado para o gene *AURKB*. Estes resultados foram validados pela qRT-PCR em um grupo independente de pacientes e a mesma correlação foi observada.

O gene *GATA3* é um membro da família de proteínas de ligação ao DNA *zinc finger* que reconhece o motivo consenso T/A GATA A/G [40,41]. Mais recentemente, esta

expressão foi descrita em linhagem celular de tumor de mama, e uma forte associação foi observada entre a expressão do *ESR1* e do *GATA3*. Esta correlação indicou um importante papel funcional para este gene em neoplasias mamárias responsivas ao hormônio, embora *GATA3* não seja um gene responsivo ao *ESR1* [42], provavelmente devido à alteração na regulação da transcrição cruzada destes genes. A co-expressão desses genes provavelmente mantém o fenótipo bem diferenciado destes tumores [43]. Sabe-se que o alto nível de expressão do *ESR1* está associado com expressão reduzida do Ki67 [10] e está positivamente correlacionada com o nível de expressão do *GATA3*. Assim é esperado que a expressão aumentada do *GATA3* apresenta uma correlação significativa com a expressão reduzida do Ki67, como observado neste estudo. De acordo com estes achados, Kouros-Mehr et al. [44] observaram que existe um gradiente de expressão do *GATA3* na glândula mamária, onde as células altamente proliferativas expressam baixos níveis deste gene, e a população não proliferativa (diferenciada) expressa altos níveis de *GATA3*. Em adição, no presente estudo, a expressão reduzida do *GATA3* foi estatisticamente associada com alto grau histológico, como descrito por Mehra et al. [45]. Sorlie et al. [29] demonstraram que a expressão do *GATA3* se correlacionou com um subconjunto de genes considerados importantes na biologia da célula epitelial luminal da mama, incluindo os genes *LIV-1*, *REGG* e *TFF3*. Similarmente, o presente estudo revelou que a expressão do *GATA3* foi também correlacionada à expressão do *REGG* ($P < 0.001$, $r = 0.7857$; dados não apresentados).

O gene *REGG* (*ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor*) é um novo gene relacionado à via do *RAS* que foi recentemente identificado, e sua expressão se correlaciona com um prognóstico favorável para as pacientes com câncer de mama. A expressão do *REGG* foi associada com o ESR em ambas linhagens celulares derivadas do tecido da mama e tumores primários. Este gene deve funcionar como um regulador negativo do crescimento em células epiteliais da mama [46]. De acordo com esses resultados, uma correlação negativa foi detectada entre o *status* de proliferação e a expressão de *REGG* neste estudo, e embora não significativa, uma baixa expressão do transcrito do *REGG* foi

detectada em tumores de grau III, confirmando o prognóstico favorável nos casos que mostraram um alto nível de expressão deste gene.

O gene *CLAMP* (*calponin-homology and microtubule-associated protein*) está associado com microtúbulos através do seu domínio CH (*calponin-homology*) e representa um novo membro da família de domínio CH que funciona como uma MAP (*microtubule-associated protein*). Nos microtúbulos, a forma polimerizada das tubulinas α e β mediam muitos processos celulares, incluindo mitose, motilidade e transporte intracelular, contribuindo também para o aspecto geral e estabilidade estrutural das células [39]. Para nosso conhecimento, esta é a primeira vez que a expressão do gene *CLAMP* é detectada em tecido de mama normal e tumoral. Outros tecidos, incluindo, cérebro, pulmão e testículo apresentaram expressão deste gene pelas metodologias de *Northern* e *Western blot* [39]. No presente estudo, uma correlação negativa foi observada entre a expressão deste gene e o *status* do Ki-67, bem como a presença de um baixo nível de expressão em pacientes jovens. Até o presente, não existe estudos prévios correlacionando o significado clínico-patológico do gene *CLAMP* em carcinomas mamários.

O gene *AURKB* (*aurora kinase B*) é uma proteína localizada no interior do centrômero, presente da fase G2 até a metáfase [47]. *AURKB* fosforila um número considerável de substratos protéicos mitóticos, principalmente a histona H3 influenciando a dinâmica do cromossomo durante a mitose. Assim, *AURKB* funciona na condensação, segregação, e citocinese através da regulação de associações dos microtúbulos ao cinetócoro [48]. Este gene desempenha um papel crucial no *checkpoint* da formação das fibras do fuso e forma um estreito complexo com duas proteínas: proteína interna do centrômero (*INCENP*) e survivina (*BIRC5*). A atividade deste complexo é responsável pela transformação celular oncogênica mediada pelo RAS levando a um crescimento descontrolado das células tumorais [49, 50]. Em nosso estudo, foi observado uma correlação positiva entre a expressão dos genes *AURKB* e *BIRC5* ($P < 0.0001$, $r = 0.7236$; dados não apresentados). Quando a expressão do gene *AURKB* foi comparada com o *status* do Ki-67, uma correlação estatisticamente positiva foi observada. Semelhante a esses

resultados, Chieffi et al. [51] e Qi et al. [52] também encontraram uma correlação positiva com a taxa de proliferação em linhagem celular de próstata e em carcinomas de células escamosas da cavidade oral, respectivamente. Qi et al. [52] observaram uma alta média de células positivas do AURKB em carcinomas pobremente diferenciados em comparação com carcinomas bem diferenciados, como notado no presente estudo. Os genes *AURKB* e *CLAMP* foram diferencialmente expressos em ambos os grupos (ESR1 e PGR) e estão associados com ciclo celular, indicando que a expressão desses genes está correlacionada com proliferação celular em carcinomas mamários.

O gene *UBE2C* pertence à família do gene E2 e codifica uma proteína de 19.6 kDa, envolvida com a proteólise dependente de ubiquitina [53, 54]. A degradação da ciclina A é altamente sensível à concentração de UBE2C e a auto-degradação de UBE2C é um sensor autônomo do processo mitótico, concedendo permissão para as células progredirem da segregação e divisão celular para um novo ciclo de duplicação do DNA [55, 56]. Okamoto et al. [57] avaliaram a expressão gênica do *UBE2C* em 25 tecidos normais humanos diferentes e 24 linhagens de câncer humano, incluindo câncer de mama, utilizando qRT-PCR. Os autores encontraram que o *UBE2C* estava altamente expresso em várias linhagens e em alguns tumores primários quando comparado a tecidos normais, sugerindo que sua elevada expressão contribui para a ocorrência ou progressão de várias neoplasias. Embora não significativo, no presente estudo, foi observada uma correlação entre a expressão elevada do *UBE2C* e tumores com alto grau histológico ($P=0.0712$). Alexe et al. [37] avaliaram amostras de câncer de mama pela análise de *microarrays* e encontraram o gene *UBE2C* entre os principais marcadores com alta expressão em tumores de alto grau. Dados em literatura mostraram que a presença de moléculas *siRNA* do *UBE2C* bloqueiam a expressão deste gene e inibem a proliferação de células neoplásicas ovarianas e hepatocelulares [58, 59]. Semelhante ao estudo de Berlingieri et al. [58], nossos resultados mostraram uma correlação positiva entre a expressão do *UBE2C* e o nível de Ki-67, sugerindo que este gene é um marcador preditivo negativo da evolução clínica. Entre as amostras incluídas no grupo de validação, somente um caso apresentou metástase e nele foi encontrado um nível

elevado do *UBE2C* quando comparado aos outros casos (RQ=12.13 *versus* mediana RQ=6.59, respectivamente). Em adição, seis casos apresentaram expressão elevada (RQ>10.00), e destes, quatro tinham seguimento variante entre 36 e 52 meses. Considerando que a atual investigação foi baseada em um número pequeno de tumores, principalmente aqueles que evoluíram para metástase, e pelo fato de o seguimento clínico ser curto, estudos adicionais são necessários para avaliar esta associação.

O gene humano *GTSE1* apresenta uma interação física entre domínio de regulação C-terminal do p53 e a região C-terminal do *GTSE1*, que é necessária e suficiente para regular negativamente a atividade do p53 [38]. Após a ocorrência de danos no DNA, o *GTSE1* teria um papel duplo durante o *checkpoint* em G2, promovendo o atraso da transição G2 para M e protegendo, ao mesmo tempo, estas células contra a apoptose dependente de p53. O nível do Ki-67 foi positivamente correlacionado com a expressão do *GTSE1* ($P=0.0387$), mas não foi encontrada uma correlação negativa entre os níveis de expressão do *GTSE1* e da p53, por imuno-histoquímica ($P=0.3676$, dados não apresentados). Em adição, a expressão elevada do *GTSE1* foi estatisticamente associada com grau histológico alto ($P=0.0371$).

O gene *BIRC5* (Survivina ou *Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing protein 5*) é um dos membros da família de genes *IAP*, associados à inibição da apoptose e regulação da mitose [60]. Foi sugerido que a expressão nuclear deste gene em câncer de mama está associada com prognóstico favorável, enquanto a sua expressão citoplasmática com evolução ruim [61-63]. Entretanto, a expressão elevada da survivina em tumores primários está quase que invariavelmente associada a um pior prognóstico em muitos tipos de carcinoma (revisado em [64]). Uma correlação marginalmente estatística foi detectada entre a expressão do *BIRC5* e o nível de Ki-67, mas nenhuma associação foi observada com os dados clinico-patológicos no grupo de validação. Entretanto, quando as amostras foram divididas em dois grupos (tumores de grau I *versus* II e III) foi observada uma correlação marginalmente significativa ($P=0.0646$, dados não apresentados). Níveis

elevados da survivina foram associados significativamente com tumores de alto grau [64, 65].

Os achados das análises de *oligoarrays* comparando o nível de expressão gênica com o *status* do Ki-67 foram validados pela qRT-PCR. Em adição, a qRT-PCR mostrou uma correlação estatística entre grau histológico e a expressão dos genes *GATA3*, *AURKB* e *GTSE1*. Estes dados corroboram com a função destes genes em aumentar a taxa de proliferação celular e apresentam estes como potenciais marcadores biológicos envolvidos na tumorigênese mamária.

5. Referências

- [1] Sørli T, Perou CM, Fan C, Geisler S, Aas T, Nobel A, Anker G, Akslen LA, Botstein D, Børresen-Dale AL, Lønning PE. Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2914-2918.
- [2] Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:109-118.
- [3] Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:225-31.
- [4] Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 2000;53:125-30.
- [5] Whitfield EJ, Pruess M, Apweiler R. Bioinformatics database infrastructure for biotechnology research. *J Biotechnol* 2006;124:629-639.
- [6] Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005;16:1723-39.
- [7] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.

- [8] Offersen BV, Sørensen FB, Knoop A, Overgaard J, Danish Breast Cancer Cooperative Tumour Biology Committee. The prognostic relevance of estimates of proliferative activity in early breast cancer. *Histopathology* 2003;43:573-582.
- [9] Tan P-H, Bay B-H, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, Lee CH, Li KB. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol* 2005;18:374-381.
- [10] Rosa FE, Caldeira JRF, Felipes J, Bertonha FB, Quevedo FC, Domingues MAC, Moraes Neto FA, Rogatto SR. Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathological factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers. *Hum Pathol* 2007 (*in press*).
- [11] Molino A, Pedersini R, Micciolo R, Frisinghelli M, Giovannini M, Pavarana M, Nortilli R, Santo A, Manno P, Padovani M, Piubello Q, Cetto GL. Relationship between the thymidine labeling and Ki-67 proliferative indices in 126 breast cancer patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:304-309.
- [12] Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M, Wright D, Allen SA, Dove J, Wilson GD. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 2005;92:147-155.
- [13] Jarzabek K, Koda M, Kozłowski L, Mittre H, Sulkowski S, Kottler ML, Wolczynski S. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of estrogen receptors α and β in human primary breast cancer: correlation with proliferative marker Ki-67 and clinicopathological factors. *Eur J Cancer* 2005;41:2924-2934.
- [14] Ding SL, Sheu L-F, Yu J-C, Yang TL, Chen B, Leu FJ, Shen CY. Expression of estrogen Receptor- α and Ki67 in relation to pathological and molecular features in early-onset infiltrating ductal carcinoma. *J Biomed Sci* 2004;11:911-919.
- [15] Assersohn L, Salter J, Powles TJ, A'hern R, Makris A, Gregory RK, Chang J, Dowsett M. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:113-123.
- [16] de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast

- cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007;96:1504-1513.
- [17] Perou CM, Jeffrey SS, Van De Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9212-9217.
- [18] WHO World Health Organization: International Classification of Diseases for Oncology, 2nd edn. World Health Organization, Geneva, 1990.
- [19] UICC União Internacional Contra o Câncer: Classificação dos tumores malignos, 5ª ed. Ministério da saúde, Rio de Janeiro – Brasil, 1998.
- [20] Bloom MJC, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1709 cases. *BRJ Cancer* 1957;11:358-377.
- [21] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537.
- [22] Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AV, Almeida GT, Egidio CM, Paquola AC, Machado AA, Festa F, Yamamoto D, Alvarenga R, Da Silva CC, Brito GC, Simon SD, Moreira-Filho CA, Leite KR, Camara-Lopes LH, Campos FS, Gimba E, Vignal GM, El-Dorry H, Sogayar MC, Barcinski MA, Da Silva AM, Verjovski-Almeida S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* 2004;23:6684-6692.
- [23] Van 'T Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, Van Der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-536.
- [24] Weikel W, Beck T, Mitze M, Knapstein PG. Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:149-154.
- [25] Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565.

- [26] Schneider J, Ruschhaupt M, Bunes A, Asslaber M, Regitnig P, Zatloukal K, Schippinger W, Ploner F, Poustka A, Sültmann H. Identification and meta-analysis of a small gene expression signature for the diagnosis of estrogen receptor status in invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 2006;119:2974-9.
- [27] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-10874.
- [28] Bertucci F, Nasser V, Houlgatte R, Birnbaum D. Gene expression profiling using cDNA arrays and prognosis of breast cancer. *Bull Cancer* 2002;89:571-574.
- [29] Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8418-8423.
- [30] 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 Res* 2005;65:2170-2178.
- [31] Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, Gerald WL. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006;25:3994-4008.
- [32] Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, Mone M, Hansen H, Buys SS, Rasmussen K, Orrico AR, Dreher D, Walters R, Parker J, Hu Z, He X, Palazzo JP, Olopade OI, Szabo A, Perou CM, Bernard PS. Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* 2006;8:R23.
- [33] Tozlu S, Girault I, Vacher S, Vendrell J, Andrieu C, Spyrtos F, Cohen P, Lidereau R, Bieche I. Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1109-1120.
- [34] Dairkee SH, Ji Y, Ben Y, Moore DH, Meng Z, Jeffrey SS. A molecular 'signature' of primary breast cancer cultures; patterns resembling tumor tissue. *BMC Genomics* 2004;5:47.

- [35] Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, Granjeaud S, Adélaïde J, Tagett R, Loriod B, Jacquemier J, Viens P, Jordan B, Birnbaum D, Nguyen C. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000;9:2981-2991.
- [36] Hannemann J, Velds A, Halfwerk JB, Kreike B, Peterse JL, van de Vijver MJ. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Res* 2006;8:R61.
- [37] Alexe G, Dalgin GS, Ganesan S, Delisi C, Bhanot G. Analysis of breast cancer progression using principal component analysis and clustering. *J Biosci* 2007;32:1027-1039.
- [38] Monte M, Benetti R, Buscemi G, Sandy P, Del Sal G, Schneider C. The cell cycle-regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting p53 function. *J Biol Chem* 2003;278:30356-30364.
- [39] Dougherty GW, Adler HJ, Rzadzinska A, Gimona M, Tomita Y, Lattig MC, Merritt RC Jr, Kachar B. CLAMP, a novel microtubule-associated protein with EB-type calponin homology. *Cell Motil Cytoskeleton* 2005;62:141-156.
- [40] Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992;80:575-581.
- [41] Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 1993;13:4011-4022.
- [42] Hoch RV, Thompson DA, Baker RJ, Weigel RJ. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 1999;84:122-128.
- [43] Eeckhoute J, Keeton EK, Lupien M, Krum SA, Carroll JS, Brown M. Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:6477-6483.
- [44] Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 2006;127:1041-1055.
- [45] Mehra R, Varambally S, Ding L, Shen R, Sabel MS, Ghosh D, Chinnaiyan AM, Kleer CG. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res* 2005;65:11259-11264.
- [46] Finlin BS, Gau CL, Murphy GA, Shao H, Kimel T, Seitz RS, Chiu YF, Botstein D, Brown PO, Der CJ, Tamanoi F, Andres DA, Perou CM. RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *J Biol Chem* 2001;276:42259-42267.

- [47] Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001;11:49-54.
- [48] Li JJ, Li SA. Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol Ther* 2006;111:974-984.
- [49] Kanda A, Kawai H, Suto S, Kitajima S, Sato S, Takata T, Tatsuka M. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene* 2005;24:7266-7272.
- [50] Temme A, Diestelkoetter-Bachert P, Schmitz M, Morgenroth A, Weigle B, Rieger MA, Kiessling A, Rieber EP. Increased p21(ras) activity in human fibroblasts transduced with survivin enhances cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:765-773.
- [51] Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Villacci A, Vitale M, Linardopoulos S, Portella G, Tramontano D. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate* 2006;66:326-333.
- [52] Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, Tatsuka M, Takata T. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch* 2007;450:297-302.
- [53] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425-479.
- [54] Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000;102:549-552.
- [55] Rape M, Kirschner MW. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 2004;432:588-595.
- [56] Lukas C, Bartek J, Lukas J. Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. *Chromosoma* 2005;114:146-154.
- [57] Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, Aoyama M, Miyazaki M, Nakagawara A. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Res* 2003;63:4167-4173.
- [58] Berlingieri MT, Pallante P, Guida M, Nappi C, Masciullo V, Scambia G, Ferraro A, Leone V, Sboner A, Barbareschi M, Ferro A, Troncone G, Fusco A. UbcH10 expression may be a useful tool in the prognosis of ovarian carcinomas. *Oncogene* 2007;26:2136-2140.
- [59] Ieta K, Ojima E, Tanaka F, Nakamura Y, Haraguchi N, Mimori K, Inoue H, Kuwano H, Mori M. Identification of overexpressed genes in hepatocellular carcinoma, with special reference to ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene expression. *Int J Cancer* 2007;121:33-38.

- [60] Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46-54.
- [61] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134.
- [62] Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88:1077-1083.
- [63] Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Hasnan J, Rusli J, Kamal Y, Imran AK, Ahmed M, Zakaria J. Expression of survivin and its clinicopathological correlations in invasive ductal carcinoma of the breast. *Singapore Med J* 2007;48:607-614.
- [64] Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem* 2004;50:1986-1993.
- [65] Kostadima L, Pentheroudakis G, Fountzilias G, Dimopoulos M, Pectasides D, Gogas H, Stropp U, Christodoulou C, Samantas E, Wirtz R, Hennig G, Bafaloukos D, Arapantoni P, Kalofonos H, Papakostas P, Economopoulos T, Bamias A, Pavlidis N. Survivin and glycodelin transcriptional activity in node-positive early breast cancer: mRNA expression of two key regulators of cell survival. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100:161-167.

Tabela 1. Características clínicas e histopatológicas dos carcinomas mamários.

Características	Número de pacientes (%)
Idade	
≤50	21 (33.3)
>50	42 (66.7)
História Familiar de Câncer	
Sim	15 (23.8)
Não	48 (76.2)
Tipo Histológico	
Ductal infiltrativo	59 (93.7)
Lobular infiltrativo	4 (6.3)
Acometimento de Linfonodos	
Negativo	25 (39.7)
Positivo	38 (60.3)
Tamanho Tumoral (cm)	
0 – 2	18 (28.6)
>2 - 5	41 (65.1)
>5	3 (4.8)
Nd	1 (1.5)
Estadio Clínico	
I	11 (17.5)
IIA	20 (31.7)
IIB	21 (33.3)
IIIA	2 (3.2)
IIIB	9 (14.3)
Grau Histológico	
I	8 (12.7)
II	24 (38.1)
III	27 (42.9)
Nd	4 (6.3)
Fase S	
Baixa (≤ 25%)	36 (57.1)
Alta (> 25%)	27 (42.9)

Nd: não determinado.

Tabela 2. Genes diferencialmente expressos no agrupamento do ESR1 (68 seqüências), conforme a expressão protéica do Ki-67 ($\leq 25\%$ e $>25\%$). As informações incluem código do *Unigene*, símbolo do gene, função molecular, banda e descrição das seqüências.

<i>UniGene</i>	Símbolo do gene	Função molecular	Banda	Descrição
Ki-67 $\leq 25\%$				
Hs.61638	MYO10	nd	5p15.1-p14.3	myosin X
Hs.62264	DTX4	nd	11q12.2	deltex 4 homolog (Drosophila)
Hs.77311	BTG3	nd	21q21.1-q21.2	BTG family, member 3
Hs.100691	EST	Ligação ao íon zinco, pequena ligação à GTPase	nd	nd
Hs.207481	nd	Transporte de íons	nd	nd
Hs.159651	TNFRSF21	nd	6p21.1-12.2	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
Hs.173162	COX4NB (NOC4)	nd	16q24	neighbor of COX4
Hs.371841	EST	nd	10p13	nd
Hs.520455	nd	nd	nd	nd
Hs.442658	AURKB	Atividade metaloendopeptidase e peptidase	17p13.1	aurora kinase B
Hs.449009	VWA1	nd	1p36.33	von Willebrand factor A domain containing 1
Hs.56145	TMSL8 (TMSNB)	Atividade receptora da interleucina-6 e oncostatina-M, ligação protéica	Xq21.33-q22.3	thymosin, beta, identified in neuroblastoma cells
Hs.513743	nd	nd	16q23.1	nd
Hs.415762	LY6D	Atividade catalítica e hidrolase	8q24-qter	lymphocyte antigen 6 complex, locus D
Hs.14449	KIAA1609	nd	16q24.1	hypothetical protein
Hs.4302	SLC29A4	Atividade de tranporte e ligação	7p22.1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4
Hs.355835	EST	nd	16q22.1	nd
Hs.416456	FN5 (C11orf75)	Ligação ao íon metal, íon zinco e protéica	11q13.3-q23.3	FN5 protein, chromosome 11 open reading frame 75
Hs.282557	CP	nd	3q23-q25	ceruloplasmin (ferroxidase)
Hs.434975	RELT	nd	11q13.4	RELT tumor necrosis factor receptor
Hs.301921	CCR1	nd	3p21	chemokine (C-C motif) receptor 1
Hs.49932	C21orf45	nd	21q22.11	chromosome 21 open reading frame 45
Hs.3416	ADFP	Atividade isomerase	9p22.1	adipose differentiation-related protein
Hs.2393	PHKA1	nd	Xq12-q13	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
Hs.198363	MCM10	nd	10p13	minichromosome maintenance deficient 10 (S cerevisiae), transcript variant 2
Hs.438462	MT1H	nd	16q13	metallothionein 1H
Hs.528329	UBXD4	nd	2p23.3	UBX domain containing 4
Ki-67 $>25\%$				
Hs.121820	nd	nd	nd	nd
Hs.72620	SPEF1 (C20orf 28)	nd	20pter-q11.23	sperm flagellar 1, chromosome 20 open reading frame 28
Hs.311208	EST	nd	16p13.3	nd
Hs.102406	MLPH	Ligação ao íon zinco, pequena ligação à GTPase	2q37.3	melanophilin
Hs.162309	EST	Transporte de íons	nd	nd
Hs.144151	hCG25653	nd	10p11.21	hypothetical protein
Hs.36567	CCDC24	nd	1p34.1	coiled-coil domain containing 24
Hs.444414	AFF3	nd	2q11.2-q12	AF4/FMR2 family, member 3
Hs.280878	ERBB4	nd	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
Hs.283853	THSD4	Atividade metaloendopeptidase e peptidase	15q23	thrombospondin, type I, domain containing 4
Hs.8036	EST	nd	19p13.2	nd
Hs.118918	SLC25A35	Atividade receptora da interleucina-6 e oncostatina-M, ligação protéica	17p13.1	Solute carrier family 25, member 25
Hs.132701	CCDC11	nd	18q21.1	coiled-coil domain containing 11
Hs.371949	EST	Atividade catalítica e hidrolase	nd	nd
Hs.443740	EST	nd	11q23.1	nd
Hs.7888	ERBB4	Atividade de tranporte e ligação	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene

				homolog 4 (avian)
Hs.169333	TIGD6	nd	5q33.1	tigger transposable element derived 6
Hs.387057	THSD4	Ligação ao íon metal, íon zinco e protéica	15q23	thrombospondin, type I, domain containing 4
Hs.38070	EST	nd	2q11.2-q12	nd
Hs.27373	LOC400451	nd	15q26.1	hypothetical gene
Hs.13211	EST	nd	nd	nd
Hs.125352	EST	nd	nd	nd
Hs.201134	TTC25	Atividade isomerase	17q21.2	hypothetical protein
Hs.116301	EST	nd		nd
nd	ERBB4	nd	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
Hs.411317	TBC1D9	nd	4q31.1	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)
Hs.351875	COX6C	nd	8q22-q23	cytochrome c oxidase subunit VIc
Hs.23729	EST	Atividade de hidrolase, inositol-polifosfatase 5-fosfatase e inositol/fosfatidilinositol fosfatase	nd	nd
Hs.88417	SUSD3	Atividade oxidoreductase, agindo em doadores pareados com oxidação em um par de doadores, resultando em redução do oxigênio molecular nas duas moléculas de água	9q22.31	sushi domain containing 3
Hs.72050	NME5	nd	5q31	non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)
Hs.416854	RERG	nd	12p12.3	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor
Hs.524134	GATA3	nd	10p15	GATA binding protein 3, transcript variant 1
Hs.446354	TCEA3	nd	1p36.12	transcription elongation factor A (SII), 3
Hs.281351	EST	nd	nd	nd
Hs.406684	EST	nd	2q21-q23	nd
Hs.260720	DNAJC12	Ligação ao íon zinco, pequena ligação à GTPase	10q22.1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12, transcript variant 1
Hs.355232	EST	Transporte de íons	16p13.3	nd
Hs.278408	TREX1	nd	3p21.31	three prime repair exonuclease 1, transcript variant 1
Hs.7888	ERBB4	nd	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
Hs.281901	EST	nd		nd
nd	EST	nd		nd

nd: não determinado.

Tabela 3. Genes diferencialmente expressos no agrupamento do PGR (83 seqüências), conforme a expressão protéica do Ki-67 ($\leq 25\%$ e $>25\%$). As informações incluem código do *Unigene*, símbolo do gene, função molecular, banda e descrição das seqüências.

<i>UniGene</i>	Símbolo do gene	Função molecular	Banda	Descrição
<i>Ki-67</i> $\leq 25\%$				
Hs.36567	CCDC24	nd	1p34.1	coiled-coil domain containing 24
Hs.292692	nd	nd	nd	nd
Hs.8036	EST	nd	19p13.2	nd
Hs.411081	FGD3	Ligação ao íon zinco, pequena ligação à GTPase	9q22	FGD1 family, member 3
Hs.335524	C6orf85	Transporte de íons	6p25.2	chromosome 6 open reading frame 85
Hs.144151	hCG25653	nd	10p11.21	hypothetical protein
Hs.132449	EST	nd	nd	nd
Hs.132701	CCDC11	nd	18q21.1	coiled-coil domain containing 11
Hs.283417	EST	nd	nd	nd
Hs.387057	THSD4	Atividade metaloendopeptidase, atividade peptidase	15q23	thrombospondin, type I, domain containing 4
Hs.29190	C1orf64	nd	1p36.13	hypothetical protein
Hs.71968	IL6ST	Atividade receptora, receptora interleucina, oncostantina –M e ligação protéica	5q11	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor), transcript variant 1
Hs.371949	EST	nd	nd	nd
Hs.412022	ABHD2	Atividade catalítica e hidrolase	15q26.1	abhydrolase domain containing 2
Hs.74120	EST	nd	10q23.2	nd
Hs.118918	SLC25A35	Ligação, transporte	17p13.1	Solute carrier family 25, member 25
Hs.116465	EST	nd	16q12.2	nd
Hs.167380	ZMYND10 ou BLU	Ligação aos íons metal, zinco e protéica	3p21.3	zinc finger, MYND domain containing 10
Hs.352591	FANK1	nd	10q26.2	fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains 1
Hs.336403	nd	nd	nd	nd
Hs.154918	EST	nd	11q22.1	nd
Hs.32405	EST	nd	11q22.1	nd
Hs.162143	ERP27	Atividade isomerase	12p12.3	hypothetical protein
Hs.351344	TMEM25	nd	11q23.3	transmembrane protein 25
Hs.133152	EST	nd	11q24.3	nd
Hs.88417	SUSD3	nd	9q22.31	sushi domain containing 3
Hs.171168	EST	nd	nd	nd
Hs.21492	PIB5PA	Atividade hidrolase, 5-fosfatase inositol polifosfato, fosfatase inositol/fosfatidilinositol	22q11.2-q13.2	phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A
Hs.159643	DEGS2	Atividade oxidoreductase, agindo em doadores pareados com oxidação em um par de doadores, resultando em redução do oxigênio molecular nas duas moléculas de água	14q32.2	degenerative spermatocyte homolog 2, lipid desaturase (Drosophila)
Hs.443740	EST	nd	11q23.1	nd
Hs.177557	Hypothetical protein	nd	15q26.1	hypothetical protein
Hs.72620	SPEF1 (C20orf28)	nd	20pter-q11.23	chromosome 20 open reading frame 28
<i>Ki-67</i> $>25\%$				
Hs.378501	TSEN54	nd	17q25.1	hypothetical protein
Hs.66378	EST	nd	10q23.32	nd
Hs.443014	ETS2	Ligação a seqüências específicas de DNA, atividade fator de transcrição	21q22.3; 21q22.2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)
Hs.282700	EST	nd	nd	nd
Hs.448346	EST	nd	19q13.33	nd

Hs.115285	DLAT	Atividade acetiltransferase dihidrolipolisina-residual, acetiltransferase e transferase, ligação protéica	11q23.1	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)
Hs.24135	EST	nd	12q22	nd
Hs.1194	SLC6A6	Em touros: atividade transporte de sódio e transmembrana de beta-alanina	3p25-p24	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
Hs.407115	RAD51	Ligação ao ATP, à fita simples e dupla de DNA atividade ATPase	15q15.1	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)
Hs.22315	CREB1	Atividade fator de transcrição, cofator de transcrição, ligação protéica e a seqüências específicas de DNA	2q34	cAMP responsive element binding protein 1, transcript variant A
Hs.387385	EST	nd	17q24.1	nd
Hs.440695	KBTBD4	Ligação protéica	11p11.2	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4, transcript variant 1
Hs.438882	EST	nd	nd	nd
Hs.526858	nd	nd	nd	nd
Hs.342274	EST	nd	1p22.3	nd
Hs.38363	EST	nd	6q21	full length insert cDNA clone YU07D12
nd	nd	nd	nd	INCYTE UNIQUE
Hs.371841	EST	nd	10p13	nd
Hs.159651	TNFRSF21	Atividade receptora	6p21.1-12.2	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
Hs.100691	EST	nd	nd	nd
Hs.158665	LYNX1	Ligação âncora GPI	8q24.3	Ly6/neurotoxin 1
Hs.82933	EST	nd	1p13.3	nd
Hs.320834	ZNRF1	Atividade ligase, ligação protéica, ao metal e ao ion zinco	16q23.1	zinc and ring finger protein 1
Hs.155109	HSD17B2	Atividade desidrogenase 17-beta estradiol, desidrogenase e oxidoreductase	16q24.1-q24.2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
Hs.355835	nd	16q22.1	nd	nd
Hs.16244	SPAG5	nd	17q11.2	sperm associated antigen 5
Hs.528329	UBXD4	nd	2p23.3	UBX domain containing 4
Hs.11806	DHCR7	Atividade oxidoreductase, reductase dehidrocolesterol e ligação protéica	11q13.2-q13.5	7-dehydrocholesterol reductase
Hs.93002	UBE2C	Atividade enzimática de conjugação a ubiquitina, atividade ligase e ligase proteina- ubiquitina	20q13.12	ubiquitin-conjugating enzyme E2C, transcript variant 6
Hs.121028	ASPM	Ligação à calmodulina	1q31	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)
Hs.656	CDC25C	Atividade fosfatase proteina tirosina e hidrolase	5q31	cell division cycle 25C, transcript variant 2
Hs.323032	STIL ou SIL	Regulação dos checkpoints do fuso mitótico	1q32	TAL1 (SCL) interrupting locus
Hs.383913	BLM	Ligação ao DNA e ao ATP, atividade hidrolase e helicase DNA dependente de ATP	15q26.1	Bloom syndrome
Hs.442658	AURKB	Atividade quinase proteina serina/ treonina, ligação protéica, ao ATP e a nucleotídeos, ligação nucleotídica	17p13.1	aurora kinase B
Hs.73239	C1orf106	nd	1q32.1	hypothetical protein
Hs.4302	SLC29A4	Atividade de transporte transmembrana nucleosídica	7p22.1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4
Hs.153034	EST	nd	nd	nd
Hs.127286	OXR1	nd	8q23	nd
Hs.422848	MGC39900	actin binding	Xq22.2	hypothetical protein

Hs.173162	COX4NB	nd	16q24	neighbor of COX4
Hs.425125	STAG3	nd	7q22.1	nd
Hs.1578	BIRC5	Atividade inibidora protease cisteína e da caspase, ligação à microtúbulos, ao íon zinco	17q25	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
Hs.283532	CENPN	nd	16q23.2	centromere protein N
Hs.88523	C13orf3	nd	13q12.11	hypothetical protein
Hs.439524	GTSE1	nd	22q13.3-q13.3	G-2 and S-phase expressed 1
Hs.84113	CDKN3	Atividade fosfatase fosfoprotéica, fosfatase proteína tirosina/serina/treonina, hidrolase e quinase	14q22	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)
Hs.2393	PHKA1	Atividade fosforilase quinase, catalítica, ligação à calmodulina e atividade regulatória fosforilase quinase	Xq12-q13	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
Hs.238679	RRAGD	Ligação ao GTP, à nucleotídeos e ligação protéica	6q15-q16	Ras-related GTP binding D
Hs.434886	CDCA5	Ligação protéica e à cromatina	11q12.1	cell division cycle associated 5
Hs.69360	KIF2C	Atividade motora microtubular, ligação protéica, ao ATP, ao DNA centromérico, à nucleotídeos	1p34.1	kinesin family member 2C
Hs.170114	POP1	Atividade ribonuclease MRP, ribonuclease P, hidrolase e ligação à proteínas idênticas	8q22.1	processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)

nd: não determinado.

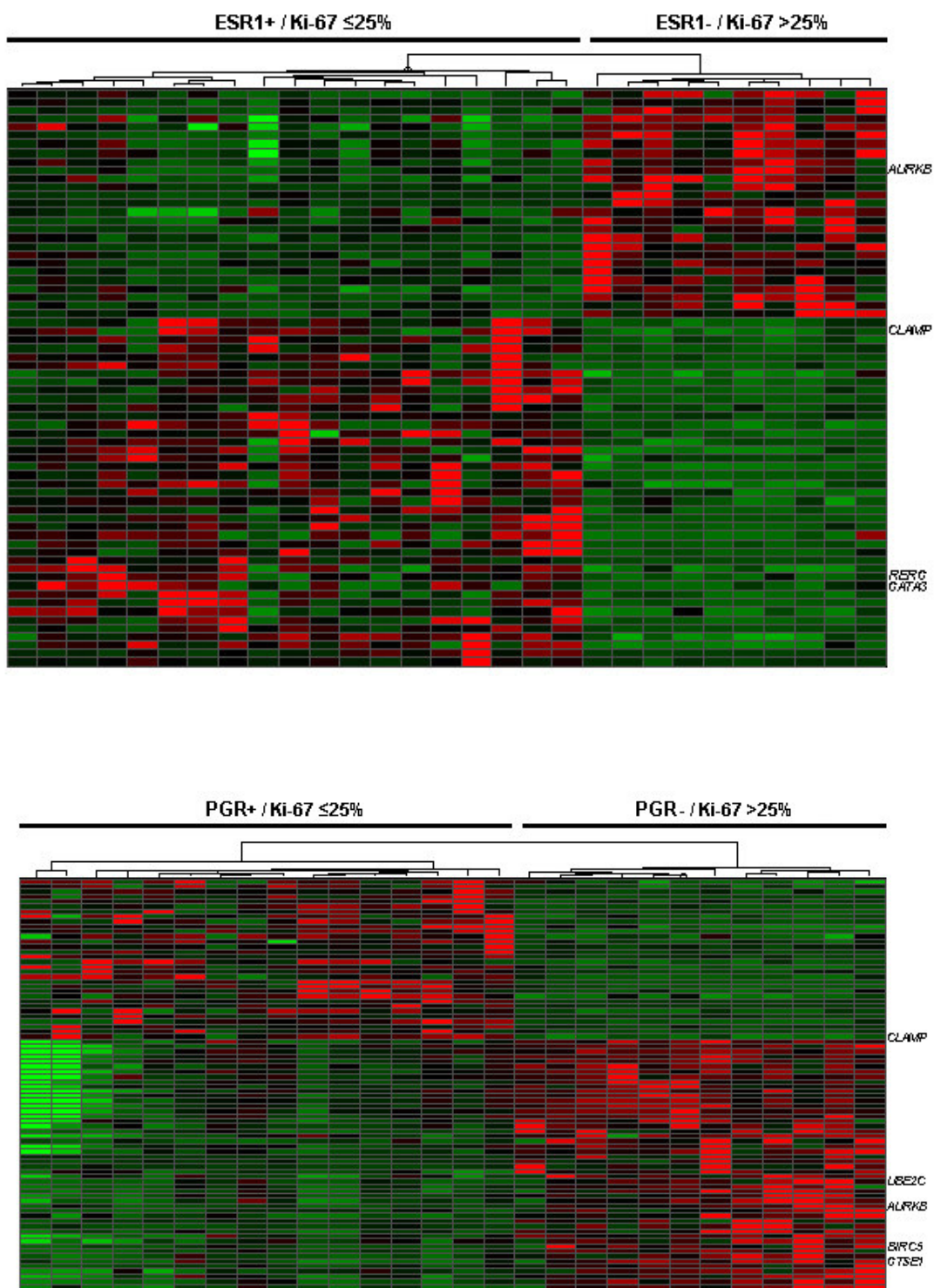


Figura 1. Agrupamento hierárquico supervisionado de 68 (A) e 83 (B) seqüências em amostras de câncer de mama. A) Agrupamento do ESR1; B) Agrupamento do PGR. Os receptores hormonais foram distribuídos inversamente ao *status* do Ki-67. Genes individuais estão representados nas linhas e diferentes amostras estão apresentadas nas colunas. Os genes mostrados à direita das imagens são aqueles selecionados para a validação pela qRT-PCR.

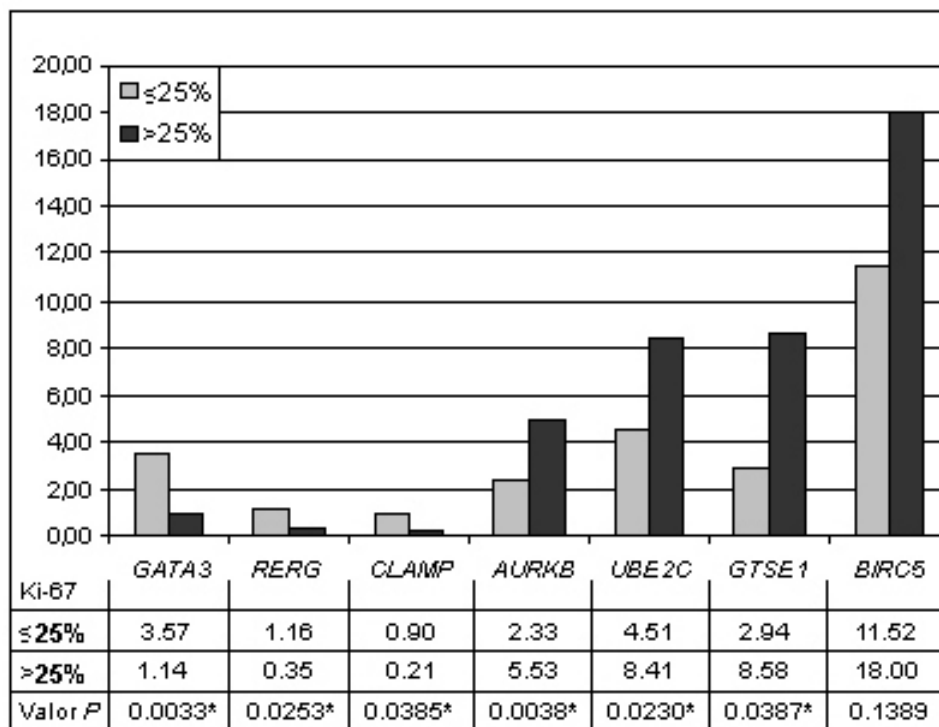


Figura 2. A mediana da expressão relativa dos genes *GATA3*, *RERG*, *CLAMP*, *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1* e *BIRC5* em comparação com o nível de Ki-67 (≤25% e >25%). Os valores de *P* estão apresentados. (*) valor significativo.

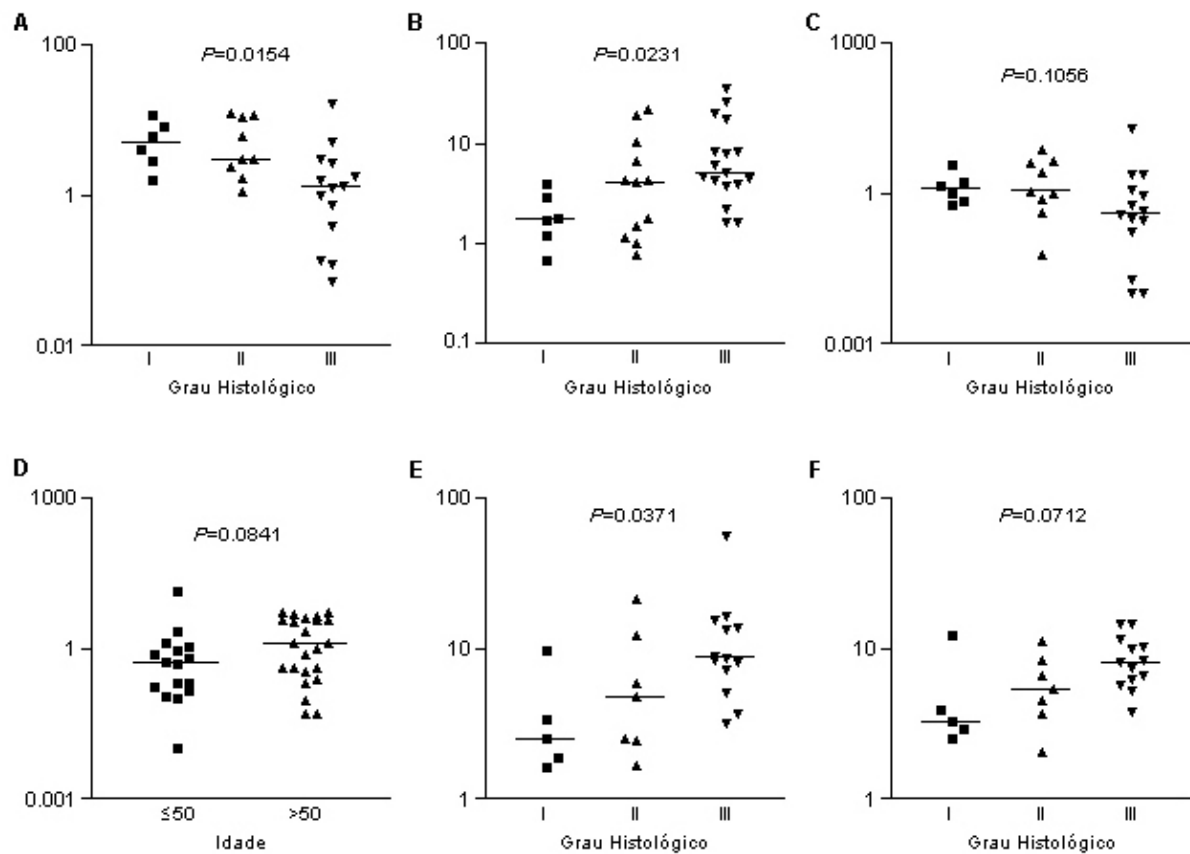


Figura 3. A, B e C) Nível de expressão dos genes *GATA3*, *AURKB* e *RERG* em comparação com grau histológico, respectivamente. D) Expressão do *CLAMP* em comparação com a idade das pacientes. E e F) Expressão do *GTSE1* e do *UBE2C* versus grau histológico, respectivamente. As barras indicam os valores de mediana. Os valores de *P* estão apresentados.

Article 1

Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathological factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers

Fabíola E. Rosa MSc^{a*}, José R. F. Caldeira MD, PhD^{b,a*}, Joice Felipes MSc^c, Fernanda B. Bertonha^a, Francisco C. Quevedo MD^d, Maria A. C. Domingues MD, PhD^e, Francisco A. Moraes Neto MD^d, Silvia R. Rogatto PhD^f

^aDepartment of Genetics, Institute of Biosciences, UNESP - São Paulo State University, Botucatu

^bDepartment of Senology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, Sao Paulo

^cDepartment of Genetic and Cellular Biology, UEM, Maringá, Paraná

^dDepartment of Pathology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, Sao Paulo

^eDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo

^fDepartment of Urology, Faculty of Medicine, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, São Paulo, Brazil.

* Both authors have contributed equally

Keywords: breast cancer; estrogen receptor; progesterone receptor; mRNA expression; immunohistochemistry

Correspondence to:

Silvia Regina Rogatto, PhD

NeoGene Laboratory - Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina - UNESP

Botucatu, São Paulo, Brazil

CEP: 18618-000

Telephone: 55-14-3811 6271

Fax: 55-14-3811 6271

E-mail: rogatto@fmb.unesp.br

Running Title: Hormone receptors in breast cancer

Supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brazil.

Summary

To elucidate the molecular profile of hormonal steroid receptor status, we analyzed *ER- α* , *ER- β* , and *PGR* mRNA and protein expression in 80 breast carcinomas using reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR), quantitative RT-PCR (qRT-PCR), and immunohistochemical (IHC) analysis. Qualitative analysis revealed positive expression of *ER- α* , *ER- β* , and *PGR* mRNA in 48%, 59%, and 48% of the breast carcinomas, respectively. *ER- α* , *ER- β* and *PGR* transcript overexpression was observed in 51%, 0% and 12% of the cases, respectively, while moderate or strong protein expression was detected in 68%, 78% and 49% cases, respectively. Tumor grade was negatively correlated with transcript and protein levels of *ER- α* ($P=0.0169$ and $P=0.0006$, respectively) and *PGR* ($P=0.0034$ and $P=0.0005$, respectively). Similarly, proliferative index Ki-67 was negatively associated with transcript and protein levels of *ER- α* ($P=0.0006$ and $P<0.0001$, respectively) and *PGR* ($P=0.0258$ and $P=0.0005$, respectively). These findings suggest that *ER- α* and *PGR* expression are associated with well-differentiated breast tumors and less directly related to cell proliferation. A significant statistically difference was observed between lymph node status and ER- β protein expression ($P=0.0208$). In ER- α negative tumors, we detected a correlation between ER- β protein expression and high levels of Ki-67. These data suggest that ER- β could be a prognostic marker in human breast cancer.

1. Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women, and is highly curable if diagnosed at an early stage. Traditional prognostic factors include the axillary lymph node status, tumor size, the nuclear grade, and the histological grade [1].

The ER- α has been extensively studied as a prognostic and predictive marker in clinical breast cancer, making this nuclear receptor the most valuable target for the treatment of human breast cancer with selective estrogen receptor modulators or the newer generation of aromatase inhibitors [2]. Patients with ER- α positive tumors have a significantly prolonged overall and recurrence-free survival when treated with selective estrogen receptor modulators and aromatase inhibitor therapy [3,4]. However, approximately 30% of ER- α positive tumors are not hormone-responsive, while 5–15% of ER- α negative tumors respond to hormonal therapy [5]. The molecular basis for the association among ER- α expression, hormonal responsiveness and breast cancer prognosis remains unclear.

The discovery of an ER- β isoform [6,7] has led researchers to reevaluate the prior simplistic model of estrogen action. ER- β , like ER- α , is a ligand-induced transcription factor that modulates the expression of specific target genes. On the structural level, both receptor isoforms encode a DNA-binding domain that exhibit 95% similarity with one another, which recognizes and binds to estrogen response elements within the promoter of target genes; the two isoforms also contain a hormone-binding domain, which exhibits >50% similarity [7,8]. In contrast, the hormone-independent activation function-1 (AF-1) domains show markedly less sequence similarity, suggesting that the two receptors perform distinct cellular functions. The binding affinity of ER- β towards estrogen is similar to that of ER- α , but unlike ER- α , antiestrogen-occupied ER- β can activate transcription via nonclassical ER-signaling pathways via its binding to activator protein 1 transcription factors [9]. This has led some investigators to speculate on the potential role of ER- β both in the progression of breast cancer and in the development of antiestrogen resistance. The two receptors form heterodimers when co-expressed, and it has been suggested that the ER- α /ER- β ratio

represents a dynamic balance between growth-promoting and growth-inhibition signals within cells [10].

The significance of PGR expression in breast cancer has been less recognized. PGR has been demonstrated to be an estrogen-dependent protein, i.e. it is synthesized following the stimulation of target cells with estrogen [11,12], and ER- α negative and PGR positive breast cancer cases are associated with the worst prognosis [13]. Detection of overexpressed PGR in tumors serves as a functional indicator of an intact ER pathway, even if the tumor is reported as ER- α negative [1]. In the absence of hormones, both PGR and ER- α are inactively bound to a large complex of heat shock proteins within the cytoplasm of their target cells. Hormone binding results in the dissociation of heat shock proteins, allowing for receptor dimerization and subsequent binding to conserved 13bp hormone responsive elements (HRE) within the promoters of hormone-regulated target genes [14]. Once bound to the HRE, the receptors act as transcription factors by interacting with the general transcription machinery [15] or by recruiting other transcription factors to the promoter [16].

The most commonly used assay in the clinical setting for evaluating ER- α and PGR protein expression is immunohistochemistry (IHC). Unlike chemical assays, IHC does not require the destruction of tissue specimens and shows the tissue distribution of gene product, thus has become the preferred method for determining the protein status in breast cancer specimens. However, the intensive and time-consuming interpretations and the variability among laboratories in methods of tissue procurement, preservation, antigen retrieval, and, more importantly, the definitions of positivity are considerable negative factors for IHC [1]. Despite these apparent problems, IHC is widely available, readily automated, and applicable for patient management.

Recently, polymerase chain reaction (PCR) based technology has been demonstrated to successfully evaluate specific mRNAs, especially those present in low copy numbers in a small number of cells or in a small amount of tissue, as well as mRNAs expressed in mixed-cell populations. PCR is a simple, fast, and sensitive method for RNA

gene expression analysis [17,18]. The purpose of the current study was to compare the *ER- α* , *ER- β* and *PGR* transcript levels (using RT-PCR and qRT-PCR) and protein expression levels (IHC) in Brazilian breast cancer patients in relation to tumor size, lymph node status, grade, HER-2 protein expression, and Ki-67 status.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Eighty breast carcinoma samples were obtained from 2000 to 2004 from Amaral Carvalho Hospital, Jaú (SP, Brazil). The patients were accrued consecutively, and the criterion for inclusion in the study was no previous histological diagnosis of breast cancer. The patients had undergone segmental resection or mastectomy, and none of the patients had received radiotherapy or chemotherapy prior to surgery. All patients were advised of the procedures and provided written informed consent. Patients with a family history of cancer, particularly those with first-degree and second-degree relatives, were noted and, whenever possible, the cancer was confirmed with documented medical records or ascertained from the death certificate. The Brazilian Ethics Committee approved this study (CONEP 694/1999).

The follow-up after the surgery varied between 23 to 83 months; patients were followed every four months postoperatively. Immediately after surgery, the tumor samples were frozen at -80°C . Frozen tissue sections were histopathologically evaluated and microdissected to ensure the presence of at least 90% of tumor cells. Histopathological classification was performed according to the WHO International Classification of Disease for Oncology [19], and the clinical stage was determined according to the UICC TNM classification [20]. The malignancy of infiltrating carcinomas was scored according to the Scarff-Bloom and Richardson grading system [21].

The patients received different chemotherapy treatments: AC (adriamycin, cyclophosphamide); FEC (5-fluorouracil, 4-epirubicin, cyclophosphamide), FAC (5-

fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide); CMF (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil) (100% or 70% of the dose according the age and clinical status of the patients). Sixty-three patients (79%) received radiotherapy, and 57 ER- α positive and/or PGR positive cases (71%), as determined by IHC analysis, were treated with tamoxifen (20 mg/day) at the end of chemotherapy treatment for 60 months. Some patients with intolerance or side effects (postmenopausal) were treated with aromatase inhibitors, such as anastrozole (1 mg/day) or letrozole (2.5 mg/day). A summary of the clinical and pathological data is given in Table 1.

2.2. Total RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted from pulverized frozen tumor tissue using an Rneasy mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA samples were stored in RNase-free distilled water at -70°C. The quality of RNA samples was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel followed by ethidium bromide staining, and the 18S and 28S RNA bands were visualized under ultraviolet light. To avoid DNA contamination, the samples were digested with 1 unit of Dnase I Amplification Grade (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) in 10X Dnase I Reaction Buffer and 25 mM EDTA pH 8.0. The reaction was carried out in a PTC-100 thermal cycle (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA) for 15 min at room temperature and the enzyme was inactivated by heating at 70°C for 10 min. RNA was reverse transcribed in a final volume of 20 μ l containing 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM each dNTP, 0.5 μ g/ μ l Oligo (dT)₁₈, 0.1 M dithiothreitol and 200 units of SuperScriptTM II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Reverse transcription was carried out for 60 min at 42°C and the reaction mixture was subsequently inactivated for 15 min at 70°C. In the qualitative analysis, negative controls consisted of reactions with the same mixture except lacking reverse transcriptase. The cDNA was stored at -70°C.

2.3. Qualitative RT-PCR

Reverse transcriptase efficiency was assessed by parallel amplification of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (*GAPDH*) housekeeping gene. Primers for *ER- α* , *ER- β* and *GAPDH* gene amplification were chosen using the Primer 3 software (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi). The PCR primer set sequences and amplicon sizes are as follows: *ER- α* forward primer 5'-atcctgatgattggtctcgtct-3' and reverse primer 5'-ggatatggttctctctccaga-3' (270 bp product); *ER- β* forward primer 5'-gctcatctttgctccagatcttg-3' and reverse primer 5'-caatcacccaaaccaaagcatc-3' (266 bp); *GAPDH* forward primer 5'-cgtcttcaccaccatggaga-3' and reverse primer 5'-cggccatcacgccacagttt-3' (300 bp). The *PGR-AB* primers were constructed according to Ariga et al [22]: forward primer 5'-acagaattcatgagccgggtccgggtgcaag-3' and reverse primer 5'-acaagatctccaccagagcccgagggtt-3' (247 bp). An aliquot of each reverse transcription reaction product (2 μ l) was amplified in a PTC-200 thermal cycle (Peltier Thermal Cycler - MJ Research, Miami, Florida, USA) in a total 25 μ l reaction volume containing 10x PCR Buffer (200 mM Tris-HCl, pH 8.4, 500 mM KCl), 50 mM MgCl₂, 1.25 mM of each dNTP, 10 mM of each primer and 1 unit of *Taq* DNA Polymerase Recombinant (Invitrogen™ Life Technologies, São Paulo, Brazil). The PCR conditions consisted of an initial denaturation at 94°C for 10 min, with 45 subsequent amplification cycles of 45 s at 94°C, 45 s at 60°C and 45 s at 72°C. The PCR product was run on a 2% agarose gel stained by ethidium bromide and visualized under ultraviolet light. All the negative PCR reactions were performed in duplicate, including the RNA extraction, cDNA synthesis and PCR to exclude technical errors.

2.4. Quantitative RT-PCR

Forty-seven breast carcinomas were evaluated by qRT-PCR. Four normal breast tissue samples from patients undergoing mammary reduction and confirmed as histopathologically normal were used as controls.

PCR amplification was performed in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). Primers and TaqMan probes for *ER-α*, *ER-β*, *PGR* and the *GAPDH* control reference gene were designed and synthesized according to Assay-by-Design (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Quantitative data was analyzed using the Sequence Detection System software (v1.0; Applied Biosystems). PCR reactions were carried out in a total volume of 25μl according the manufacturer's instructions. A relative standard curve was constructed for all primers with serial dilutions of placenta cDNA (100, 50, 25, 12.5, and 8ng/μL). The standard curves of the targets and reference genes showed similar results of efficacy (> 90%). The relative quantification was given by the ratio between the mean value of the target gene and the mean value of the reference gene (*GAPDH*) in each sample. The relative amount of PCR product generated from each primer set was determined on the basis of the Ct value. The relative quantification was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$ (CT: fluorescence threshold value; ΔCT : CT of the target gene minus CT of the reference gene; $\Delta\Delta CT$: tumor sample ΔCT minus reference sample ΔCT).

2.5. Immunohistochemistry Staining

The ER- α and PGR protein levels were analyzed in 80 cases, and ER- β protein expression was evaluated in 43 of these cases. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were freshly cut (3 μm) and the sections were mounted on slides with organosilane (3-aminopropyl triethoxy-silane) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). Slides were deparaffinized in xylene, gradually rehydrated through a series of alcohol rinses, and washed in phosphate-buffered saline (PBS). Intrinsic peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxidase and the sections were incubated with the primary antibody. Immunohistochemical reactions were performed using the RTU-ER-6F11 antibody (Novocastra, Newcastle, UK) (dilution 1:50), monoclonal anti-human estrogen receptor $\beta 1$ antibody (DAKO Cytomation, Glostrup, Denmark) (dilution 1:60), and the monoclonal anti-human progesterone receptor 1A6 antibody (DAKO, Carpinteria, CA, USA) (dilution 1:50). After incubation for one hour, the

sections were washed in PBS, incubated for 30 min with secondary biotinylated antibody, and incubated for 30 min with streptavidin peroxidase complex (LSAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA). The sections were developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin. Negative and positive control slides were included with each assay. Positive scoring of immunohistochemical staining for ER- α and PGR was assessed by visually estimating the percentage of positive nuclear staining in $\geq 10\%$ of neoplastic cells, and samples were graded as follows: (1+) weak, (2+) moderate, and (3+) strong intensity. ER- β negative expression was defined as weak staining in less than 2/3 of carcinoma cells, while positive expression was defined as detectable staining in more than 2/3 of carcinoma cells; positive staining was divided into moderately positive (2+) and intense staining (3+). Slides were randomly distributed to three independent blinded observers (FCQ, FAMN, and MACD). Any discrepancies between classifications of samples were addressed by immediate review, and the final result was reached by consensus. In areas of well-preserved tissue, the fraction of the infiltrating part of the neoplasm was scored. The level of Ki-67 was evaluated in all of the cases, but 16 cases were non-reactive. The median value of the Ki-67 labeling index included in this study was used as a cutoff to distinguish tumors with low ($\leq 25\%$) and high ($>25\%$) proliferative fractions [23]. The axillary lymph nodes, histological grade, and tumor size were determined for 79, 75, and 79 samples, respectively.

2.6. Statistical Analysis

Fisher's Exact and Chi-square tests were used to analyze the associations among ER- α , ER- β and PGR expression and all clinico-pathological status. Six patients that had lost follow-up were censored as survivors in the statistical calculations. Due to the large number of comparisons within the same group of patients, Bonferroni correction was applied to adjust the p-value. This type of adjustment recommended a significance level of 0.0006 to each of eight tests performed.

The correlation between IHC and qRT-PCR results was evaluated using the Spearman's correlation test. The receptors' expression as determined by qRT-PCR was compared to clinico-pathological status using One-way Analysis of Variance (ANOVA) to determine if there was a significant difference of expression among the clinical data; differences were tested for significance by the Mann-Whitney test for two categories and by the Kruskal-Wallis test for three categories. Statistical significance was designated at $P < 0.05$.

3. Results

The study sample consisted of 80 female breast cancer tumors, in which most presented operable stage II and III breast cancer, infiltrating ductal carcinoma, and positive axillary lymph nodes. Most patients were over 50 years of age (67.5%) with a mean age of 59.8 ± 15.5 (range: 30 to 94 years); most tumors were more than 2 cm (72%), and half of the tumors showed a low S-phase fraction (Table I). Fifteen cases (19%) overexpressed HER-2 (score 2+ and 3+) according to immunohistochemistry analysis. The mean follow-up was 52.3 ± 19.8 months. During this interval six patients died due to unrelated causes, two patients recidivated in the same breast, eight patients presented metastasis (two spreading to the bone and six to the lung), and six missed their follow-ups.

ER- α , ER- β , and PGR expression

RT-PCR showed positive expression of *ER- α* in 48% of the cases, while 59% of the cases showed *ER- β* expression, and 48% of cases expressed *PGR*. Quantitative real time RT-PCR revealed overexpression of *ER- α* , *ER- β* , and *PGR* in 51%, 0%, and 12% of the cases, respectively. Higher transcript levels of *ER- α* compared to *ER- β* were observed in 29/43 cases (67%). Positive expression was detected by immunohistochemistry for *ER- α* , *ER- β* , and *PGR* protein in 68%, 77%, and 49% of the cases. The protein status (1+, 2+ and 3+) for *ER- α* , *ER- β* , *PGR*, and Ki-67 is shown in Figure 1.

Correlation between mRNA and protein expression

Discrepancies between RT-PCR and IHC results were detected for *ER- α* , *ER- β* , and *PGR* in 30%, 60% and 29% of the cases, respectively, while comparison between qRT-PCR and IHC analysis revealed discrepancies for *ER- α* , *ER- β* , and *PGR* in 22%, 64% and 12% of cases, respectively (Table 2). Although statistically significant, a low correlation coefficient was observed between mRNA levels and protein expression for *ER- α* ($P < 0.0001$, $r = 0.6393$). The level of transcript expression correlated positively with protein expression for *PGR* ($P < 0.0001$, $r = 0.8278$) but no correlation was observed for *ER- β* ($P = 0.9673$, $r = 0.0068$).

No correlation was observed between *ER- α* and *ER- β* transcript levels as detected by qRT-PCR ($P = 0.6310$, $r = 0.07831$). A positive correlation was found between *ER- α* and *PGR* transcript expression levels ($P < 0.0001$, $r = 0.6674$). The comparisons between IHC and qRT-PCR evaluation of all genes are shown in Figure 2.

Transcript and protein expression and clinical-histopathological variables

There were no significant correlations between the expression of any receptor as detected by RT-PCR with age, lymph node status, clinical stage, histological grade, tumor size, HER-2 status, proliferative index or positive history of familial cancer (Table 3). No statistically correlation was found between the coexpression of *ER- α* and *ER- β* (by IHC and RT-PCR) and lymph node status or histological grade. Overexpression of *ER- α* and *PGR* as detected by qRT-PCR was statistically associated with histological grade II ($P = 0.0169$ and $P = 0.0034$, respectively) and low Ki-67 expression ($P = 0.0006$ and $P = 0.0258$, respectively) (Figure 3). No correlation was found for the *ER- β* gene.

The results from comparison of IHC results to clinical variables were very similar to qRT-PCR data. *ER- α* and *PGR* protein levels showed a significant correlation with histological grade ($P = 0.0006$ and $P = 0.0005$, respectively). Similarly, a significant association between *ER- α* ($P < 0.0001$) and *PGR* ($P = 0.0005$) protein expression in tumors with low proliferative index (Ki-67 $\leq 25\%$) was detected. Furthermore, we observed a significant

association between tumors of histological grade III and high levels of Ki-67 ($P < 0.0001$) (Table 3). A significant correlation was detected between ER- β protein expression and negative lymph node status ($P=0.0208$) (Table 3, Figure 3).

The concomitant protein expression of ER- α and PGR as detected by IHC was observed in 32 cases (40%). Of the 30 cases that presented a follow-up > 24 months, 25 were treated with tamoxifen and two of them were not responsive to endocrine therapy and developed lung metastasis. Three cases presented both negative ER- α and PGR protein expression and *ER- α* overexpression as determined by qRT-PCR; two were treated with tamoxifen and presented a favorable follow-up for more than 40 months. Independently of the treatment, in a subset of patients that progressed to metastasis in < 24 months, six patients were ER- α positive (2+ or 3+) as confirmed by IHC and overexpressed the ER- α transcript.

Eighteen patients presented familial cancer history, including carcinomas in the breast (seven cases), head and neck, uterus, esophagus, intestine and other cancers. Two patients with familial breast cancer harbored a mutation in *BRCA2* (data not shown), and showed decreased levels of the PGR transcript and negative PGR protein expression.

4. Discussion

Many breast cancers, like the normal tissue from which they are derived, are sensitive to estrogens. The determination of steroid hormone receptor expression in a primary tumor is a factor mainly used to predict endocrine responsiveness. Specifically in patients with node-negative disease, tumor size, histological grade, and age are considered important factors for such risk assessment, thus influencing the selection of treatment options, together with the status of endocrine responsiveness. Regrettably, the success of adjuvant treatment can only be determined when patients remain free of disease after several years.

The current method used to determine breast cancer treatment is based on the evaluation of *ER- α* and *PGR* gene status by IHC. ER- β status determination could provide

additional information on the responsiveness of breast cancers to various endocrine therapies. Although the quantification of mRNA expression by means of real time quantitative RT-PCR has the potential to become standard in terms of its performance, accuracy, sensitivity, broad dynamic range, and high throughput capacity [reviewed in 24], our findings showed that this procedure can be useful for evaluation of *ER- α* and *PGR* genes but not applicable for *ER- β* .

The comparison between IHC and mRNA expression analysis further confirmed discrepancies previously described by other studies [25-27]. A higher similarity and consistency between protein levels and gene expression as determined by qRT-PCR was observed. In eleven cases, we observed the absence of PGR protein in parallel with detectable positive levels of PGR mRNA. The discrepancy between these results could be due to the identification of both isoforms (PGRA and PGRB) using RT-PCR, but only the PGRA isoform identified by IHC, thus the positive mRNA expression could reflect the level of the PGRB isoform.

Hypotheses to explain RT-PCR false negative results include an insufficient amount of cDNA for reliable amplification, or the effect of normal cells or the RNA total extraction strategy that may have limited the amplification of interest transcripts. The discrepancies in the remaining cases presenting false negative results of IHC could reflect intratumoral heterogeneity or variation in tumor content between the tissues, either during mRNA extraction or when fixed and processed for histological examination [28]. Another possible cause for discrepancy may be due to variations in translation efficiency or the rate of mRNA and protein degradation, as the protein expression is not directly proportional to mRNA expression [29].

A major discrepancy was detected between *ER- β* protein and the levels of transcript expression. Saji et al [30] previously reported a marked discordance between mRNA and protein expression of *ER- β* . The low level of *ER- β* expression, as compared to *ER- α* and *PGR* genes, likely contributes to the difficulties of standardization of IHC and real-time PCR

methods for determining *ER-β* status. Although Jarzabek et al [26] found a positive correlation between *ER-β* protein and mRNA expression, the mRNA levels were downregulated. No clear explanation for these differences has yet to be identified. Murphy et al [31] proposed a possible differential regulation of protein versus RNA level or the likelihood of other potential *ER-β* isoforms (known and unknown) expressed in breast tissues, whose cognate proteins would be detected by the antibody but not measured in RT-PCR assays.

Contradictory results have been reported in the presence or absence of correlation between ER levels [24-26,32]. In our study, a positive correlation was observed between *ER-α* and *PGR* expression. Similar to our results, de Cremoux et al [25] found a statistically significant correlation between *ER-α* expression and *PGR*, both at the protein and mRNA level.

No statistically significant correlation was found between the coexpression of *ER-α* and *ER-β*, as determined by RT-PCR or IHC, and lymph node status or histological grade. In contrast, Speirs and Kerin [33] reported that lesions that coexpress *ER-α* and *ER-β* are significantly associated with lymph node positive tumors that also tend to be of a higher grade. Nakopoulou et al [34] showed that disease free and overall survival was significantly longer in patients with *ER-β/ER-α* double positive immunophenotype tumors. According Cullen et al [35], the anti-estrogens are able to block the stimulatory effect of *ER-α*, but acted as agonists in the presence of *ER-β*. These findings suggested that *ER-β* might be involved in mediating resistance to tamoxifen in breast cancer [2,35].

Grade III tumors were significantly associated with absent protein levels or low levels of gene transcripts for *ER-α* and *PGR*. In agreement with our findings, some authors showed that high-grade tumors are generally associated with negative *ER-α* and *PGR* protein expression [24,36]. These data suggest that absence of *ER-α* and *PGR* expression correlated with poorly differentiated human breast cancer.

Immunohistochemical staining for Ki-67, a nuclear antigen expressed in cycling cells and not in those in G_0 phase, allows the estimation of the proliferation index of tumors. The

precise role of Ki-67 antigen in cell cycle regulation still remains unknown. Our study showed a statistical correlation with high histological grade and elevated Ki-67 status. The correlation with histological grade is predicted, because histological grade has mitotic score as one of its component elements. In addition, higher responses to chemotherapy have been reported in patients with rapidly proliferating tumors [37-39]. A high level of Ki-67 was presented in 31 out of 64 cases (48%); two of them recidivated during the chemotherapy and two presented lung metastasis during the treatment with tamoxifen. Although cells positive for Ki-67 are considered contributing to the proliferative index, some of the proliferating cells detected by this antibody may be eliminated by apoptosis before they reach mitosis [40].

Tumors with high Ki-67 were significantly associated with tumors exhibiting low levels of mRNA and undetectable *ER- α* and *PGR* protein levels. Recent reports showed a significant association between a high Ki-67 proliferation index and PGR negative [41] and *ER- α* negative tumors [26]. Another study found that 81% of grade I infiltrating ductal carcinomas were *ER- α* positive, 23% of which were Ki-67 positive [42]. Our results are in agreement with previous reports indicating that *ER- α* positive tumors with an absence of Ki-67 expression were significantly associated with a low mitotic count, suggesting that *ER- α* expression is associated with tumorigenesis in well-differentiated breast tumors, but less directly related to cell proliferation [42,43]. Jarzabek et al [26] reported that normal epithelial mammary cells that express *ER- α* do not proliferate and do not produce proliferation markers. These data suggested that, in addition to implicating *ER- α* in cell proliferation, *ER- α* itself might act as a proliferation inhibitory factor. In a recent report, Skiliris et al [44] analyzed *ER- α* negative breast tumors for *ER- β* protein expression and demonstrated that these tumors are significantly associated with elevated Ki-67 status. In agreement with these results, in a subset of 23 *ER- α* negative patients in our study, 20 of them showed *ER- β* protein expression (2+ or 3+) and 15 had high levels of Ki-67.

A significant association was detected between *ER- β* protein and negative lymph node status. Similarly, Jarvinen et al [45] reported that positive *ER- β* status was more

common in axillary node-negative tumors. These results suggested that the ER- β expression might be a favorable indicator of prognosis in human breast cancer.

Although the follow-up was short to fully evaluate the response to the treatment, six patients who expressed *ER- α* as confirmed by IHC and qRT-PCR progressed to metastasis independently of the treatment. Three were considered status 2+ and 3+ for HER-2 protein. Gago et al [46] reported that patients co-expressing HER-2 with ER- α show a shorter disease free survival and overall survival. The authors detected this poor prognosis in patients that received tamoxifen as the only form of therapy as well as in patients that received standard adjuvant chemotherapy followed by tamoxifen.

Eighteen cases of our study related a familial history of cancer, and seven of them reported breast cancer in first-degree relatives. Recent reports demonstrated that cancers arising in carriers harboring mutations in *BRCA1* and *BRCA2* differ in terms of their histopathological features [47]. Two of seven cases showed *BRCA2* mutation (data not shown) with concomitant negative status of PGR protein and downregulation of the transcript. In general, *BRCA2* tumors are more often PGR-negative [48,49].

In conclusion, our results suggest that the levels of ER- α and PGR proteins are more tightly regulated in tumor cells than the mRNA levels, and support the selection of IHC analysis in the identification of clinical associations with prognostic and/or predictive factors. We demonstrated a significant association between ER- α and PGR protein levels in tumors with a low proliferative index. A significant correlation was observed between lymph node status and ER- β protein expression. In ER- α negative tumors, we detected a correlation between ER- β protein and high levels of Ki-67. These data suggest that ER- β can be a prognostic marker in human breast cancer.

Acknowledgments

The authors would like to thank José Eduardo Corrente for his assistance with the statistical analysis and Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves for her assistance with IHC

technique. This study was supported by the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

5. References

- [1] Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:109–118.
- [2] Hopp TA, Weiss HL, Parra IS, et al. Low levels of estrogen receptor beta protein predict resistance to tamoxifen therapy in breast cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10: 7490–7499.
- [3] Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group: Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy: 133 randomised trials involving 31,000 recurrences and 24,000 deaths among 75,000 women. *Lancet* 1992;339:1–15.
- [4] Baum M, Buchanan M, Baselga J, et al. The future of breast cancer research in danger. *Eur J Cancer* 2002;38:2210–2213.
- [5] Pearce ST, Jordan VC. The biological role of estrogen receptors α and β in cancer. *Crit Rev Oncol Hematol* 2004;50:3–22.
- [6] Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S, Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:5925–5930.
- [7] Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett* 1996;392:49–53.
- [8] Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:4258–4265.
- [9] Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites. *Science* 1997;277:1508–1510.
- [10] Gustafsson JA, Warner M. Estrogen receptor beta in the breast: role in estrogen responsiveness and development of breast cancer. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2000;74:245–248.
- [11] Surowiak P, Dziegiel P, Zabel M, Matkowski R, Kornafel J. Analysis of estrogen receptor (ER) and estrogen-dependent pS2 protein expression in cells of mammary ductal carcinoma. *Folia Histochem Cytobiol* 2001;39:141–142.

- [12] Zaslowski R, Surowiak P, Dziegiel P, Pretnik L, Zabel M. Analysis of the expression of estrogen and progesterone receptors, and of PCNA and Ki-67 proliferation antigens, in uterine myomata cells in relation to the phase of the menstrual cycle. *Med Sci Monit* 2005;7:908–913.
- [13] Keshgegian AA, Cnaan A. Estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive breast carcinoma: poor clinical outcome. *Arch Pathol Lab Med* 1996;120:970–973.
- [14] Beato M. Gene regulation by steroid hormones. *Cell* 1989;56:335–344.
- [15] Ing NH, Beekman JM, Tsai SY, Tsai MJ, O'Malley BW. Members of the steroid hormone receptor superfamily interact with TFIIB (S300-II). *J Biol Chem* 1992;267:17617–17623.
- [16] Klinge CM. Estrogen receptor interaction with co-activators and co-repressors. *Steroids* 2000;65:227–251.
- [17] Köhler T, Laßner D, Rost A-K, et al. Quantitation of mRNA by Polymerase Chain Reaction: nonradioactive PCR methods. Springer-Verlag: Berlin; 1995.
- [18] Ninomiya I, Endo Y, Yonemura Y, Sasaki T. Reverse transcription/quantitative PCR to detect changes in gene expression in disease. In: Latchman DS, (ed). *PCR Applications in Pathology: principles and practice*: Oxford University Press: New York; 1995.
- [19] WHO World Health Organization: International of Diseases for Oncology, 2nd edn. World Health Organization, Geneva, 1990.
- [20] UICC União Internacional Contra o Câncer: Classificação dos tumores malignos, 5° ed. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro-Brasil, 1998.
- [21] Bloom MJC, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer: a study of 1709 cases. *Br J Cancer* 1957;11:358–377.
- [22] Ariga N, Suzuki T, Moriya T, et al. Progesterone receptor A and B isoforms in the human breast and its disorders. *Jpn J Cancer Res* 2001;92:302–308.
- [23] Weikel W, Beck T, Mitze M, Knapstein PG. Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:149–154.
- [24] Bièche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 2001;20:8109–8115.

- [25] de Cremoux P, Tran-Perennou C, Elie C, et al. Quantitation of estradiol receptors alpha and beta and progesterone receptors in human breast tumors by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction. Correlation with protein assays. *Biochem Pharmacol* 2002;64:507–515.
- [26] Jarzabek K, Koda M, Kozlowski L, et al. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of estrogen receptors α and β in human primary breast cancer: correlation with proliferative marker Ki-67 and clinicopathological factors. *Eur J Cancer* 2005;41:2924–2934.
- [27] Labuhn M, Vuaroqueaux V, Fina F, et al. Simultaneous quantitative detection of relevant biomarkers in breast cancer by quantitative real-time PCR. *Int J Biol Markers* 2006;21:30–39.
- [28] Shaw JA, Udokang K, Mosquera JM, et al. Oestrogen receptors alpha and beta differ in normal human breast and breast carcinomas. *J Pathol* 2002;198:450–457.
- [29] Omoto Y, Kobayashi S, Inoue S, et al. Evaluation of oestrogen receptor beta wild-type and variant protein expression, and relationship with clinicopathological factors in breast cancers. *Eur J Cancer* 2002;38:380–386.
- [30] Saji S, Hirose M, Toi M. Clinical significance of estrogen receptor β in breast cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* 2005;56:s21–s26.
- [31] Murphy LC, Leygue E, Niu Y, Snell L, Ho S-M, Watson PH. Relationship of coregulator and oestrogen receptor isoform expression to de novo tamoxifen resistance in human breast cancer. *Br J Cancer* 2002;87:1411–1416.
- [32] Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, Murphy LC. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors. *J Clin Endocrinol Metab* 1997;82:2371–2374.
- [33] Speirs V, Kerin MJ. Prognostic significance of oestrogen receptor beta in breast cancer. *Br J Surg* 2000;87:405–409.
- [34] Nakopoulou L, Lazaris AC, Panayotopoulou EG, et al. The favourable prognostic value of oestrogen receptor beta immunohistochemical expression in breast cancer. *J Clin Pathol* 2004;57:523–528.
- [35] Cullen R, Maguire TM, McDermott EW, et al. Studies on oestrogen receptor-alpha and -beta mRNA in breast cancer. *Eur J Cancer* 2001;37:1118–1122.
- [36] Simpson PT, Reis-Fiho JS, Gale T, Lakhani S. Molecular evolution of breast cancer. *J Pathol* 2005;205:248–254.

- [37] Remvikos Y, Beuzeboc P, Zajdela A, et al. Correlation of pretreatment proliferative activity of breast cancer with the response to cytotoxic chemotherapy. *J Natl Cancer Inst* 1989;81:1383–1387.
- [38] Bottini A, Berruti A, Bersiga A, et al. Effect of neoadjuvant chemotherapy on Ki67 labelling index, c-erbB-2 expression and steroid hormone receptor status in human breast tumours. *Anticancer Res* 1996;16:3105–3110.
- [39] Collecchi P, Baldini E, Giannessi P, et al. Primary chemotherapy in locally advanced breast cancer (LABC): effects on tumour proliferative activity, bcl-2 expression and the relationship between tumour regression and biological markers. *Eur J Cancer* 1998;34:1701–1714.
- [40] Jalava P, Kuopio T, Juntti-Patinen L, Kotkansalo T, Kronqvist P, Collan Y. Ki67 immunohistochemistry: a valuable marker in prognostication but with a risk of misclassification: proliferation subgroups formed based on Ki67 immunoreactivity and standardized mitotic index. *Histopathology* 2006;48:674–682.
- [41] Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, et al. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 2005;92:147–155.
- [42] Ding SL, Sheu L-F, Yu J-C, et al. Expression of estrogen Receptor- α and Ki67 in relation to pathological and molecular features in early-onset infiltrating ductal carcinoma. *J Biomed Sci* 2004;11:911–919.
- [43] Tan P-H, Bay B-H, Yip G, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol* 2005;18:374–381.
- [44] Skliris GP, Leygue E, Curtis-Snell L, Watson PH, Murphy LC. Expression of oestrogen receptor-beta in oestrogen receptor-alpha negative human breast tumours. *Br J Cancer* 2006;95:616–626.
- [45] Jarvinen TAH, Peltto-Huikko M, Holli K et al. Estrogen receptor beta is co-expressed with ERalpha and PR and associated with nodal status, grade, and proliferation in breast cancer. *Am J Pathol* 2000;156:29–35.
- [46] Gago FE, Fanelli MA, Ciocca DR. Co-expression of steroid hormone receptors (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors) and Her2/neu (c-erbB-2) in breast cancer: clinical outcome following tamoxifen-based adjuvant therapy. *J Steroid Biochem Mol Biol* 2006;98:36–40.

- [47] Lakhani SR. The pathology of familial breast cancer: morphological aspects. *Breast Cancer Res* 1999;1:31–35.
- [48] Loman N, Johannsson O, Bendahl PO, Borg A, Fernö M, Olsson H. Steroid receptors in hereditary breast carcinomas associated with BRCA1 or BRCA2 mutations or unknown susceptibility genes. *Cancer* 1998;83:310–319.
- [49] Eerola H, Heikkila P, Tamminen A, Aittomaki K, Blomqvist C, Nevanlinna H. Histopathological features of breast tumours in BRCA1, BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res* 2005;7:R93–100.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the breast samples.

Variables	Number of patients (%)
Age	
≤50	26 (32.5)
>50	54 (67.5)
Familial History of Cancer	
Yes	18 (22.5)
No	62 (77.5)
Histologic type	
Infiltrating ductal	72 (90)
Infiltrating lobular	4 (5)
Others	4 (5)
Lymph node status	
Negative	32 (40.5)
Positive	47 (59.5)
Unknown	1
Tumour Size (cm)	
0 – 2	22 (27.9)
>2 - 5	52 (65.8)
>5	5 (6.3)
Unknown	1
Clinical Stage	
I	13 (16.25)
IIA	26 (32.5)
IIB	27 (33.75)
IIIA	4 (5)
IIIB	10 (12.5)
Histological grade	
I	9 (12)
II	31 (41)
III	35 (47)
S phase	
Low (≤ 25%)	33 (41.3)
High (> 25%)	31 (38.7)
Not reactive	16 (20.0)
HER-2 Status	
0	45 (56.25)
1+	20 (25)
2+	6 (7.5)
3+	9 (11.25)

Table 2. Comparison of IHC with RT-PCR and qRT-PCR for ER- α and PGR expression in breast cancer samples.

Genes	RT-PCR	IHC			
		0	1+	2+	3+
ER-α	+	4	5	10	19
	-	22	2	8	10
ER-β	+	-	3	8	6
	-	-	3	11	12
PGR	+	11	1	8	18
	-	30	2	3	7
	qRT-PCR				
ER-α	Low	14	1	0	1
	Normal	2	0	0	1
	High	3	3	8	7
ER-β	Low	-	6	14	15
	Normal	-	0	2	2
	High	-	0	0	0
PGR	Low	22	1	1	3
	Normal	1	0	2	8
	High	0	0	0	5

Table 3. Relationship between ER- α , ER- β and PGR expression and patient age, lymph node status, clinical stage and histological grade.

Variable	n	ER- α + (%)				PGR + (%)				ER- β + (%)	
		RT	P	IHC	P	RT	P	IHC	P	RT	P
Total	80	38		54		38		39		47	
Age											
≤50	26	10 (38)	0.3405	17 (65)	0.8030	12 (46)	1.000	13 (50)	1.000	19 (73)	0.0915
>50	54	28 (52)		37 (68)		26 (48)		26 (48)		28 (52)	
Lymph node status											
Negative	32	15 (47)	0.6917	20 (62)	0.3007	15 (47)	0.8146	15 (47)	0.8590	20 (62)	0.8368
Positive (1 a 4)	32	17 (53)		25 (78)		16 (50)		17 (53)		19 (59)	
Positive (>4)	15	6 (40)		9 (60)		6 (40)		7 (47)		8 (53)	
Unknown	1										
Clinical Stage											
I	13	7 (54)	0.2903	8 (61)	0.5166	5 (38)	0.4046	6 (46)	0.8472	8 (61)	0.8524
IIA	26	12 (46)		18 (69)		13 (50)		14 (54)		15 (58)	
IIB	27	15 (55)		20 (74)		15 (55)		13 (48)		15 (55)	
IIIA	4	2 (50)		3 (75)		2 (50)		2 (50)		3 (75)	
IIIB	10	2 (20)		5 (50)		3 (30)		4 (40)		6 (60)	
Histological Grade											
I	9	4 (44)	0.3327	9 (100)	0.0006	6 (67)	0.2202	8 (89)	0.0005	4 (44)	0.6491
II	31	18 (58)		26 (84)		16 (52)		19 (61)		19 (61)	
III	35	14 (40)		15 (43)		13 (37)		9 (26)		21 (60)	
Tumor Size (cm)											
0 - 2	22	14 (64)	0.1311	16 (73)	0.7882	10 (45)	0.8064	13 (59)	0.3232	14 (64)	0.7991
>2 - 5	52	21 (40)		35 (67)		25 (48)		24 (46)		28 (54)	
>5	5	3 (60)		3 (60)		3 (60)		2 (40)		5 (100)	
S phase											
Low (≤ 25%)	33	19 (58)	0.1441	30 (91)	<0.0001	18 (54)	0.0841	23 (70)	0.0005	19 (58)	0.4474
High (> 25%)	31	12 (39)		9 (29)		10 (32)		8 (26)		21 (68)	
Not reactive	16	7		12		10		8		7	
HER-2 Status											
0	45	21 (47)	0.2904	32 (71)	0.1535	23 (51)	0.1923	23 (51)	0.8873	27 (60)	0.9255
1+	20	12 (60)		15 (75)		11 (55)		9 (45)		11 (55)	
2+	6	1 (17)		3 (50)		1 (17)		3 (50)		3 (50)	
3+	9	4 (44)		4 (44)		3 (33)		4 (44)		6 (67)	
Familial History of Cancer											
Yes	18	5 (28)	0.0663	12 (67)	1.000	7 (39)	0.4357	7 (39)	0.4258	8 (44)	0.1833
No	62	33 (53)		42 (68)		31 (50)		32 (52)		39 (63)	

RT=RT-PCR; IHC=immunohistochemistry; In bold, statistically significant after p-value Bonferroni correction ($P<0,0006$)

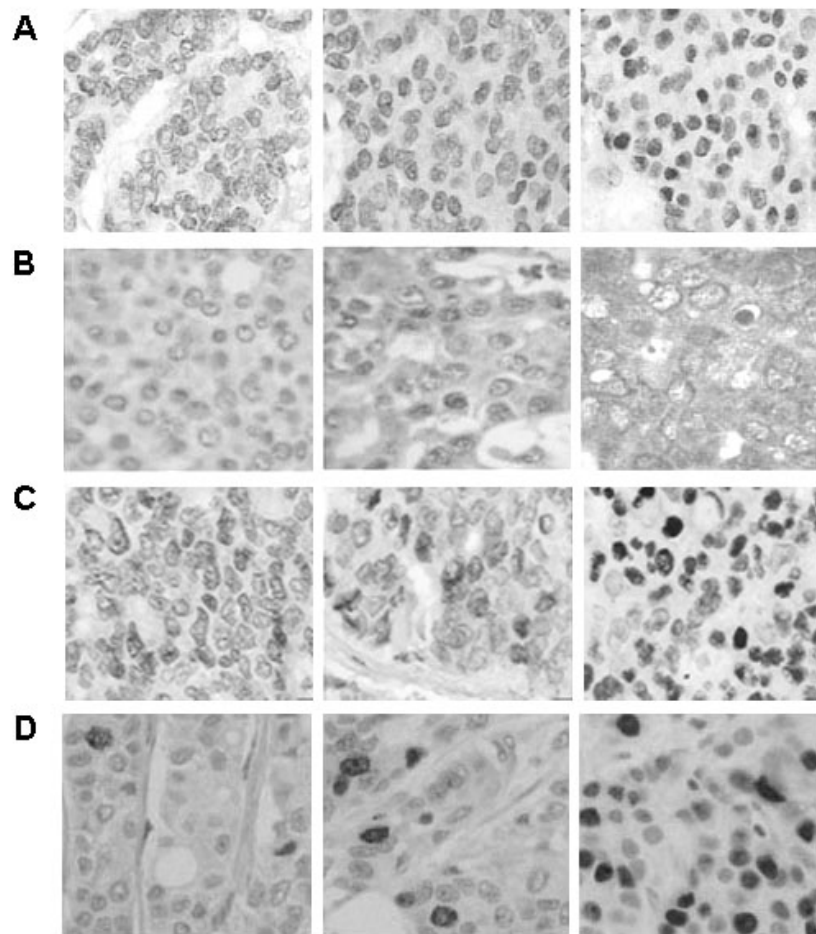


Figure 1. Breast cancer cells showing nuclear immunostaining of ER- α , PGR and Ki-67 proteins and cytoplasmic staining of ER- β protein. (A) ER- α , (B) ER- β , (C) PGR (D) Ki-67. Positive scoring of immunohistochemical staining is indicated as 1+, 2+ and 3+. For Ki-67 staining: < 10%, 10%-25% and > 25%.

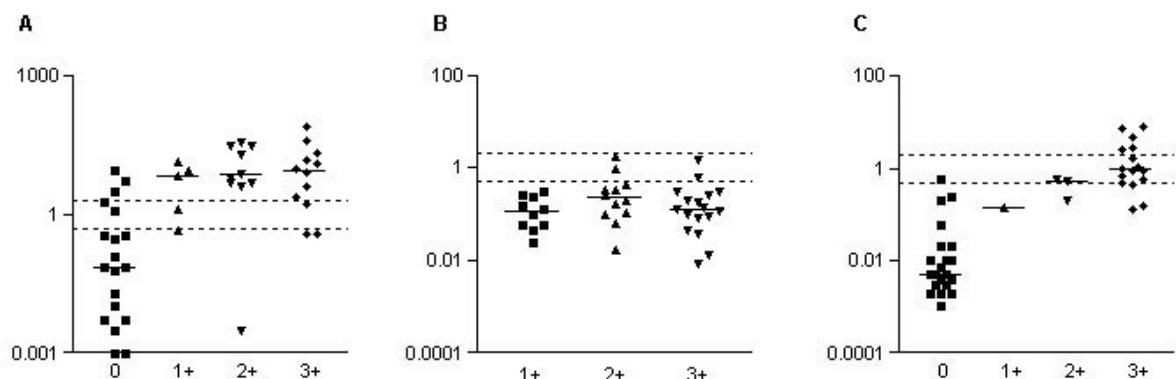


Figure 2. Comparison between immunohistochemical status and qRT-PCR individual values. The transcript expression values are indicated in a log scale. Bars indicate the median value. (A) ER- α ; (B) ER- β ; (C) PGR.

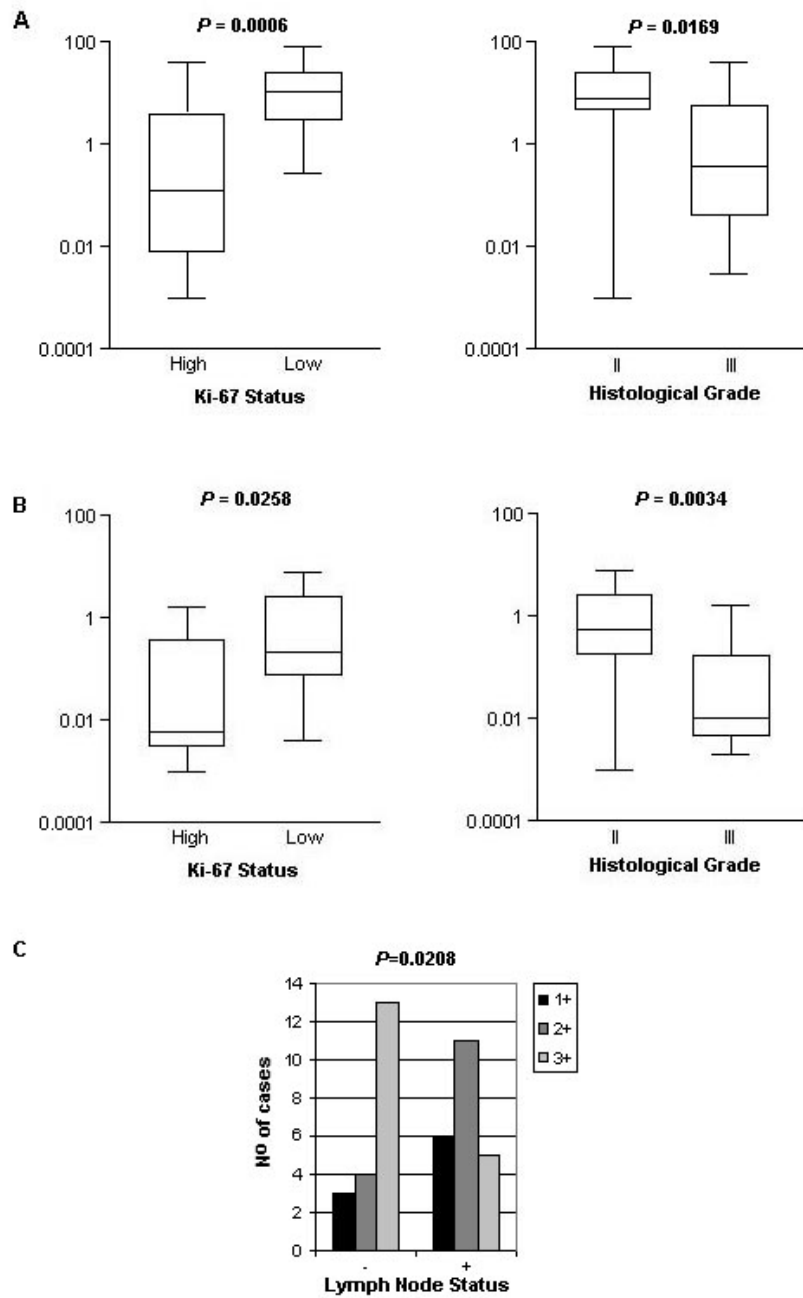


Figure 3. (A) *ER-α* transcript level in comparison with Ki67 immunophenotype and with histological grade. (B) *PGR* transcript level in comparison with Ki67 and histological grade. (C) Significant correlation between *ER-β* protein (1+, 2+, 3+ by IHC) and lymph nodes involvement. *P* values are shown.

Article 2

Chromogenic *in situ* hybridization and real time reverse transcription-PCR compared to immunohistochemistry to predict the *HER-2* status in breast carcinomas

Fabíola E. Rosa MSc^a, Sara M. Silveira^a, Cássia G. T. Silveira MSc^a, Nádia A. Bérnago PhD^b, Francisco A. Moraes Neto MD^c, Maria A. C. Domingues MD, PhD^d, José R. F. Caldeira MD, PhD^e, Silvia R. Rogatto PhD^b

^aDepartment of Genetics, Institute of Biosciences, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo

^bDepartment of Urology, Faculty of Medicine, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo

^cDepartment of Pathology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, Sao Paulo

^dDepartment of Pathology, Faculty of Medicine, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo

^eDepartment of Senology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, Sao Paulo, Brazil.

Keywords: breast cancer; *HER-2* gene; mRNA expression; immunohistochemistry; chromogenic *in situ* hybridization.

Correspondence to:

Silvia Regina Rogatto, PhD

NeoGene Laboratory - Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina - UNESP

Botucatu, São Paulo, Brazil

CEP: 18618-000

Telephone: 55-14-3811 6271

Fax: 55-14-3811 6271

E-mail: rogatto@fmb.unesp.br

Running Title: HER-2 expression and amplification in breast cancer

Supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brazil.

Summary

HER-2 gene testing has become an integral part in breast cancer patients diagnostic. To elucidate the molecular profile of *HER-2* status, we analyzed mRNA and protein expression in 75 invasive breast carcinomas by real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR) and immunohistochemistry (IHC), respectively. Amplifications were evaluated in 43 of these cases by chromogenic *in situ* hybridization (CISH). The comparison of the results by three procedures showed higher discordance in 0 or 1+ immunostaining cases that showed high-level amplification (15.4%) and *HER-2* transcript overexpression (20%); and 2+ immunostaining cases that presented unamplified status (50%) by CISH and *HER-2* downexpression (38.5%) by qRT-PCR. The concordance rate between the results of IHC and qRT-PCR was of 78.9%, while for qRT-PCR and CISH was 91.9%; only two cases with high-level amplification by CISH presented *HER-2* downexpression by qRT-PCR. In addition, CISH allowed the identification of intratumoral heterogeneity in relation to *HER-2* status in three cases. Among the 37 cases evaluated for all three methodologies, 83.8% showed concordance. In the discordant cases, the concordance was observed in the qRT-PCR and CISH results. Based on these findings, qRT-PCR was more precise and reproducible than IHC. Furthermore, CISH revealed an alternative and useful procedure to investigate amplifications involving *HER-2* gene. The comparison with clinicopathological data revealed significant association between *HER-2* downexpression (qRT-PCR) samples and the involvement of less than four lymph nodes. These data, in agreement with literature, suggest a prognostic role of this biomarker in breast cancer.

1. Introduction

Breast cancer is the most common malignancy in women being highly curable if diagnosed at an early stage. Traditional prognostic factors include the axillary lymph node status, tumor size, the nuclear grade, and the histologic grade. Currently, the assays routinely used in breast cancer clinical practice are those that address a specific management decision. Hormonal therapy is based on estrogen receptor (ESR) and progesterone receptor (PGR) status. Trastuzumab (Herceptin™, Genentech, Inc, San Francisco, CA, USA) therapy, a humanized monoclonal antibody, is based on HER-2 status.

The human epidermal growth factor receptor type 2 (*HER-2*, *HER-2/neu*, *c-erb B2* gene) encodes a membrane receptor protein in the growth factor receptor gene family with tyrosine kinase activity [1,2].

HER-2 plays a role in the pathogenesis of a significant number of human tumors, including breast cancer. It is altered in approximately 20-30% of breast carcinomas, and this is manifested as amplification of the gene and/or overexpression of the protein [3-5]. These alterations are associated with shorter disease free and overall survival and with resistance to tamoxifen antiestrogen therapy and other chemotherapy regimens, regardless of the nodal or hormone receptor status [3,4,6,7]. Moreover, breast carcinomas patients with amplified or overexpressed *HER-2* can benefit from anthracycline-based regimens as well as trastuzumab (Herceptin™) [8].

The therapy choice for breast cancer patients depends on the discrimination of HER-2 status. Reliable laboratory data in evaluating HER-2 status is essential because the treatment is beneficial on advanced breast cancer and avoids potential cardiotoxic effects in women without amplification and overexpression [9]. The most commonly assay used in the clinical setting for evaluating HER-2 status is immunohistochemistry (IHC) and fluorescence *in situ* hybridization (FISH), both approved by FDA (U.S. Food and Drug Administration). However, considerable controversy exists regarding the relative accuracy of these methods. More recently, the CISH (chromogenic *in situ* hybridization) methodology has emerged as a potential alternative to FISH, since CISH signals are permanent, the tumor sections

morphology is maintained and the evaluation of the *HER-2* status in breast cancers is possible using conventional bright field microscopy. CISH is a useful methodology for confirming ambiguous IHC results [10]. In addition, polymerase chain reaction (PCR) based technology has been demonstrated to successfully evaluate specific mRNAs, especially those present in low copy numbers in a small number of cells or in a small amount of tissue, as well as mRNAs expressed in mixed-cell populations. Quantitative real time reverse transcript - PCR (qRT-PCR) is a quantitative method insensitive to inter observer variability and easily amenable to standardization. This procedure is an alternative to score the *HER-2* status in human breast cancer. The limitation based on tumor heterogeneity and amplification of *HER-2* in non-invasive cancer can be abolished by the use of laser microdissection, although this seems not to be practicable for routine diagnosis [reviewed in Ref. 11].

The purpose of the current study was to assess the agreement among the detection of gene amplification by CISH, the transcript (qRT-PCR), and protein (IHC) expression as well as to evaluate their relevance for determination of *HER-2* status in breast carcinomas. In addition, the data were correlated with clinico-pathological features, as tumor size, lymph node status, histological grade, and Ki-67 status.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

Seventy-five breast carcinoma samples were obtained from 2000 to 2004 from Amaral Carvalho Hospital, Jaú (SP, Brazil). The patients were accrued consecutively, and the criterion for inclusion in the study was no previous histological diagnosis of breast cancer. The patients had undergone segmental resection or mastectomy, and none of patients had received radiotherapy or chemotherapy prior to surgery. All patients were advised of the procedures and provided written informed consent. Patients with a family history of cancer, particularly those with first-degree and second-degree relatives, were noted and, whenever

possible, the cancer was confirmed with documented medical records or ascertained from the death certificate. The Brazilian Ethics Committee approved this study.

The follow-up after the surgery varied between 23 to 83 months; patients were followed every four months postoperatively. Immediately after surgery, the tumor samples were frozen at -80°C. Frozen tissue sections were histopathologically evaluated and microdissected to ensure the presence of at least 90% of tumor cells. Histopathologic classification was performed according to the WHO International Classification of Disease for Oncology [12], and the clinical stage was determined according to the UICC TNM classification [13]. The malignancy of infiltrating carcinomas was scored according to the Scarff-Bloom and Richardson grading system [14]. A summary of the clinical and pathological data is given in Table 1.

The patients received different chemotherapy treatments: AC (adriamycin, cyclophosphamide); FEC (5-fluorouracil, 4-epirubicin, cyclophosphamide), FAC (5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide); CMF (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil) (100% or 70% of the dose according the age and clinical status of the patients). Fifty-five patients (73%) received radiotherapy and 51 ESR1 positive and/or PGR positive cases (68%), as determined by IHC analysis, were treated with tamoxifen (20 mg/day) at the end of chemotherapy treatment for 60 months. Some patients with intolerance or side effects (postmenopausal) were treated with aromatase inhibitors, such as anastrozole (1 mg/day) or letrozole (2.5 mg/day).

2.2. Chromogenic *In Situ* Hybridization (CISH)

CISH for *HER-2* was performed on 43 samples. Tissue sections of 4 µm-thick were prepared according to manufacturer's instructions of Zymed SPoT-Light HER2 CISH Kit (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA). Sections were deparaffinized and heated in CISH pretreatment buffer (Spot-Light tissue pretreatment kit, Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) at 97°C for 15 min and were immediately washed with deionized water at 20-

25°C for 2 min. Enzymatic digestion was performed by applying pretreatment enzyme (Spot-Light tissue pretreatment kit, Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) for 6 min at room temperature. The slides were then washed with deionized water for 2 min, dehydrated with graded ethanol and air-dried. The ready-to-use digoxigenin-labelled HER-2 probe was applied to the slides. The slides were covered with coverslips, sealed with rubber cement, and then denatured on a hot plate (95°C) for 5 min. The hybridization was performed overnight at 37°C in humid chamber. The slides were washed in 0.5 X standard saline citrate at 75°C for 5 min and then rinsed 3X with deionized water for 2 min. Reactions were blocked with 3% H₂O₂ in absolute methanol followed by PBS/Tween 20 treatment. Immunodetection was performed using a commercial Spot-Light CISH detection kit (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA) according to the manufacturer's instructions. The slides were counterstained with hematoxylin, rinsed in deionized water and covered with Histomount™ Mounting Solution (Zymed Laboratories Inc, San Francisco, CA).

HER-2 gene signals were scored in histologic sections in at least 200 tumoral cells using a conventional bright field microscope (Olympus BX40, Japan). Slides were randomly distributed to three independent blinded observers (SMS, CGTS, and NAB). Any discrepancies among classifications of samples were addressed by immediate review, and the final result was reached by consensus. In addition, different areas, individually identified, of the tumor were analyzed. Tumors were classified depending on the number of copies in the nuclei as: (a) unamplified, those tumor cells with two to five brown intranuclear spots per nucleus; (b) low-level amplification, when six to 10 signals per nucleus were detected in more than 50% of tumor cells or when a small coalescing signal cluster was found; (c) high-level amplification, defined when more than 10 copies per nucleus or copy clusters were observed in more than 50% of cancer cells.

2.3. Total RNA isolation and reverse transcription

Total RNA was extracted from pulverized frozen tumor tissue using a Rneasy mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA samples were stored in RNase-free distilled water at -70°C. The quality of RNA samples was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel followed by ethidium bromide staining, and the 18S and 28S RNA bands were visualized under ultraviolet light. To avoid DNA contamination, the samples were digested with 1 unit of Dnase I Amplification Grade (Life Technologies, Rockville, MD, USA) in 10X Dnase I Reaction Buffer and 25 mM EDTA pH 8.0. The reaction was carried out in a PTC-100 thermal cycle (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA) for 15 min at room temperature and the enzyme was inactivated by heating at 70°C for 10 min. RNA was reverse transcribed in a final volume of 20µl containing 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM each dNTP, 0.5µg/µl Oligo (dT)₁₈, 0.1 M dithiothreitol and 200 units of SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Reverse transcription was carried out for 60 min at 42°C and the reaction mixture was subsequently inactivated for 15 min at 70°C. The cDNA was stored at -70°C.

2.4. Real time quantitative RT-PCR (qRT-PCR)

Seventy-five breast carcinomas were evaluated by qRT-PCR. Four normal breast tissue samples from patients undergoing mammary reduction and confirmed as histopathologically normal were used as controls.

PCR amplification was performed in an ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers and TaqMan probes for *HER-2* and the *GAPDH* control reference gene were designed and synthesized according to Assay-by-Design (Applied Biosystems). Quantitative data was analyzed using the Sequence Detection System software (v1.0; Applied Biosystems). PCR reactions were carried out in a total volume of 10µl according the manufacturer's instructions. A relative standard curve was

constructed for all primers with serial dilutions of placenta cDNA (100, 50, 25, 12.5, and 8ng/uL). The standard curves of the target and reference genes showed similar results of efficacy (> 90%). The relative quantification was given by the ratio between the mean value of the target gene and the mean value of the reference gene (*GAPDH*) in each sample. The relative amount of PCR product generated from each primer set was determined on the basis of the Ct value. The relative quantification (RQ) was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$. *HER-2* relative expression level was compared with the ratio of healthy controls. Overexpression was defined as the mean *HER-2*/reference gene ratio $RQ \geq 2.00$.

2.5. Immunohistochemistry (IHC)

HER-2 protein level was analyzed in 75 cases. Formalin-fixed and paraffin-embedded tissues were cut (3 μ m) and the sections were mounted on slides with organosilane (3-aminopropyl triethoxy-silane) (Sigma-Aldrich Co. St. Louis, MO, USA). Slides were deparaffinized in xylene, gradually rehydrated through a series of alcohol rinses, and washed in phosphate-buffered saline (PBS). Intrinsic peroxidase activity was blocked with hydrogen peroxidase and the sections were incubated with the primary antibody. *HER-2* immunohistochemical reactions were performed using the rabbit monoclonal antibody (SP3 Clone) (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA) (dilution 1:100). After incubation for one hour, the sections were washed in PBS, incubated for 30 min with secondary biotinylated antibody, and incubated for 30 min with streptavidin peroxidase complex (LSAB, DAKO, Carpinteria, CA, USA). The sections were developed with 3,3'-diaminobenzidine (DAB) and counterstained with hematoxylin. Negative and positive control slides were included with each assay. The results were scored as: 0, no immunoreactivity; 1+, weak and incomplete immunoreactivity; 2+, weak and complete membrane immunoreactivity in more than 10% of the tumor cells or strong and complete membrane immunoreactivity in less than 10% of the tumor cells; and 3+, strong and complete membrane immunoreactivity in more than 10% of the tumor cells. Slides were randomly distributed to two independent blinded

observers (FAMN and MACD). Any discrepancies between classifications of samples were addressed by immediate review, and the final result was reached by consensus. Only the invasive component of the neoplasia was assessed and scored. The level of Ki-67 was evaluated in all cases, but 13 cases were non-reactive. The median value of the Ki-67 labeling index included in this study was used as a cutoff to distinguish tumors with low ($\leq 25\%$) and high ($>25\%$) proliferative fractions [15].

The breast tumors were classified into subtypes luminal A, luminal B, basal-like, and *HER-2* tumors, based on the IHC definitions of the markers ESR1, PGR, and HER-2, according Ithemelandu et al. [16]. ESR1 and PGR protein expression was performed as described by Rosa et al. [17].

2.6. Statistical Analysis

The comparison between *HER-2* expression (qRT-PCR and IHC), gene copy number (CISH) and several clinicopathologic features were calculated using the Chi-square test. Six patients that had lost follow-up were censored as survivors in the statistical calculations.

The correlation between the three methodologies was evaluated using One-way Analysis of Variance (ANOVA); differences were tested for significance by the Mann-Whitney test for two categories and by the Kruskal-Wallis test for three categories. Statistical significance was designated at $P < 0.05$. The concordance rate was obtained considering: (a) amplification by CISH *and* transcript overexpression ($RQ \geq 2.00$) *and* 2+ or 3+ immunostaining; (b) unamplification by CISH *and* transcript downexpression ($RQ < 2.00$) *and* 0 or 1+ immunostaining.

3. Results

The study sample consisted of 75 female breast cancer tumors, in which most presented operable stage II and III breast cancer, and positive axillary lymph nodes. Seventy tumors were infiltrating ductal and five infiltrating lobular carcinomas. Most patients were

more than 50 years of age (64%) with a mean age of 58 ± 15.5 (range, 30-94 years); most tumors were more than 2 cm (73.3%); and half of them showed a low S-phase fraction. The mean follow-up was 49.8 ± 20.1 months. During this interval five patients died due to unrelated causes, two patients recidivated in the same breast, eight patients presented metastasis (two spreading to the bone and six to the lung), and six had their follow-ups lost.

Breast cancer samples were assessed by *HER-2* gene amplification and protein expression using CISH and IHC, respectively, in histological samples (Figure 1). Transcript expression was evaluated by qRT-PCR in fresh samples after microdissection. *HER-2* data obtained by all procedures are showed in Tables 2 and 3.

CISH was performed in 40 cytological samples from 43 patients; in three remaining cases the spots presented inconclusive results (brown spots were undistinguished). In the other samples, the morphological details were apparent and the large gene copy clusters were easily detected as low magnification. The nuclear features were maintained. Normal epithelial cells and lymphocytes showed one or two *HER-2* signals per nucleus. Twenty-four out of 37 tumors (64.9%) were unamplified by CISH, while 13 samples (35.1%) showed *HER-2* high-level amplification. Different areas of the tumor were evaluated in all cases and the final analysis showed agreement, except in three cases. These three cases presented different hybridization profiles, representing different areas of the tumor, as shown in Figure 3. The first case (Figure 2A) presented no amplification (equivalent number of diploid and polysomy cells) in one area and more than 50% of the cells with high-level amplification in the other. The second case (Figure 2B) showed no amplification (polysomy) in both areas but in one of them it was also observed low-level amplification. The third case (Figure 2C) showed no amplification; however, one presented a high rate of polysomy cells and the other a prevalence of diploid cells. More than 400 cells were evaluated for each one of these cases.

HER-2 relative expression level were evaluated in 75 samples in comparison to four healthy breast tissue by qRT-PCR, and ranged between $RQ=0.05$ to 20.43. Overexpression ($RQ \geq 2.00$) was observed in 29 out of 75 cases (38.7%). In addition, the tumors were

classified according to the subtypes luminal A, luminal B, basal-like, and *HER-2* tumors. It was observed that *HER-2* transcript expression levels were significantly higher in luminal B and *HER-2* tumors than luminal A and basal-like ($P < 0.0001$, data not shown), confirming the IHC classification.

Among the 75 cases analyzed by IHC, 50 (66.7%) presented a score of 0 or 1+. The 2+ immunostaining cases comprised 13 samples (17.3%) and 12 cases (16.0%) presented 3+ scoring.

CISH compared to IHC analysis: Concordance rate between CISH and IHC was 83.8% (31 cases). Four out of 26 cases (15.4%) presenting 0 or 1+ immunostaining scoring showed high-level amplification by CISH. Two out of four samples (50%) scored as 2+ by IHC presented high-level amplification by CISH. All cases presenting a 3+ scoring by IHC showed amplification by CISH (seven cases).

qRT-PCR compared to IHC results: The *HER-2* transcript level was significantly lower in cases presenting low *HER-2* protein expression (0 or 1+ immunostaining) than in the cases with high protein expression (3+ immunostaining) (median RQ=0.93 and RQ=6.60, respectively) (Figure 3A). Ten out of 50 cases (20%) presenting a score of 0 or 1+ by IHC showed overexpression by qRT-PCR. Eight (61.5%) out of 13 samples comprising 2+ immunostaining showed overexpression by qRT-PCR. Eleven (91.7%) out of 12 cases with 3+ scoring by IHC overexpressed *HER-2* transcript. Concordance rate between qRT-PCR and IHC was observed in 59 cases (78.7%).

qRT-PCR compared to CISH analysis: Concordance rate between qRT-PCR and CISH was observed in 34 cases (91.9%). *HER-2* expression level by qRT-PCR was significantly lower in the *HER-2* gene unamplified by CISH than in the cases showing high-level amplification (median RQ=0.75 and RQ=4.69, respectively) (Figure 3B). None out of 24 cases unamplified by CISH showed *HER-2* overexpression. Eleven out of 13 (84.6%) high-level amplification cases showed *HER-2* overexpression by qRT-PCR.

Among the 37 cases evaluated for all three methodologies, 31 (83.8%) showed concordance. Discrepancies were found in six cases; four cases 0 or 1+ by IHC showed

HER-2 gene overexpression and were amplified by CISH; and two cases 2+ by IHC showed *HER-2* gene RQ<2.00 and were not amplified by CISH.

HER-2 data were compared to clinicopathologic features (Table 1). None statistical correlation was observed with age, tumor size, clinical stage, histological grade, S phase fraction, and familial history of cancer. It was detected a marginally significant correlation with lymph node status: 82.6% of the cases with RQ<2.00 showed less than four lymph nodes-positive ($P=0.0915$). The comparison of *HER-2* relative quantification individuals values between the two classes of lymph node status (<4 and ≥ 4) showed a significant correlation ($P=0.0350$), confirming the association between cases with RQ<2.00 and involvement of less than four lymph nodes-positive (Figure 3C).

In four lobular carcinomas evaluated by three methodologies, two presented discordant results: one case showed high-level amplification by CISH, *HER-2* overexpression by qRT-PCR, and negative immunostaining; the other sample showed unamplified by CISH, RQ<2.00 by qRT-PCR, and 2+ immunostaining by IHC analysis. The two remaining cases were unamplified, RQ<2.00 and negative immunostaining. The case evaluated exclusively by qRT-PCR and IHC presented RQ<2.00 and negative immunostaining. Individual values of *HER-2* expression by qRT-PCR were compared between ductal and lobular carcinomas and no significant association was observed (median RQ= 1.34 ± 3.83 and RQ= 1.7 ± 1.02 , respectively; $P=0.7375$, data not shown).

4. Discussion

HER-2 gene has been extensively studied as a prognostic and predictive marker in clinical breast cancer, making this receptor a valuable target for the treatment of human breast cancer [18]. *HER-2* status is predominantly evaluated by IHC staining because it is easy to perform and present a relatively low cost. However, a wide range of sensivity and specificity was seen among various commercially available antibodies [reviewed in Ref. 19]. In addition, FISH is used for those cases that are weakly positive for *HER-2* immunostaining.

The limitation of this procedure is the use of fluorescence microscopy and their implications. CISH is an alternative method that needs a conventional light microscopy, allows a faster interpretation time and a morphological details review. A further advantage of CISH is that the probe signals are permanent and the slides can therefore be archived for long periods of time [20]. Quantitative real time RT-PCR has the potential to become standard in terms of its performance, accuracy, sensitivity, broad dynamic range, and high throughput capacity [21, 22].

The comparison between CISH and IHC results revealed that from the 24 samples scored as 0 or 1+ by IHC, four showed gene amplification by CISH and overexpression by qRT-PCR (median RQ=4.09 ± 4.33). A half of samples with 2+ score do not showed amplification by CISH and had RQ<2.00 by qRT-PCR. Many studies showed a high concordance between IHC and CISH; frequently, the discordant cases were 2+ immunostained [22-25]. In our study, all of the samples scored as 3+ by IHC presented *HER-2* amplification by CISH. In fact, >90% of HER-2 IHC 3+ tumors harbor *HER-2* gene amplification [26,27]. The results performed by CISH and IHC showed a concordance of 83.8%. Similarly, other studies showed a concordance ratio varying of 85% to 95.3% [20,22,28]. There are differences in the screening of the tissue between these two techniques. While the IHC test requires that a minimum of 10% of tumor cells be reactive to be considered positive, CISH scoring requires that more than 50% of tumor cells show an increase in gene copies to be considered amplified (according the criteria used in the present study). It is conceivable that this difference could account for some of the discordant results observed between IHC and CISH.

The results of the present study revealed a significant correlation between gene and protein expression levels. These data are in agreement with several reports that showed a good correlation between transcript and protein data [22,29-32]. Ten samples scored as 0 or 1+ by IHC showed *HER-2* overexpression by qRT-PCR; four of them evaluated by CISH showed gene amplification. The transcript quantitative analysis revealed two classes of *HER-2* overexpression: five cases showed a median RQ=4.09 ± 4.33 and five other cases

presented median $RQ=2.19 \pm 0.21$, a value very close to the cut-off value selected (2.00). Ntoulia et al. [22] reported similar results (overexpression by qRT-PCR and negative results by IHC) and concluded that the cut-off value could be higher ($RQ>2.2$) to consider as being significant. Similarly, Tse et al. [31] used a cut-off of $RQ>2.2$ to consider as being positive for *HER-2* overexpression in the comparison among qRT-PCR, Elisa, IHC, and FISH in sections obtained from paraffin-embedded breast carcinomas.

Currently, the most widely used assay for the evaluating the gene status in cases scored as 2+ immunostaining is FISH. However, qRT-PCR has emerged as potential alternative technique for assessing *HER-2* status. We demonstrated that 61.5% of the samples with 2+ score overexpressed the gene by qRT-PCR. Similarly, Ntoulia et al. [22] showed a concordance ratio of 75%. Among our samples, four out of 12 patients that presented discordant results (2+ immunostaining and $RQ<2.00$) had a favorable outcome, indicating that *HER-2* status by qRT-PCR could be performed in 2+ staining tumors with a potential value in the management of these patients. From the patients showing 2+ staining and $RQ\geq 2.00$ (eight cases), three presented metastasis being one spreading to the bone and two to the lung.

The higher concordance rate (11 out of 12 cases) was observed between 3+ score by IHC and overexpression by qRT-PCR. Only one sample that presented 3+ status and *HER-2* amplification showed transcript downexpression. This case, with qRT-PCR false-negative result, probably resulted from dilution of cells carrying amplified genes among non tumor cells [33], although the sample had been submitted to microdissection.

The concordance between the results of IHC and qRT-PCR was of 78.9%. The discordance between both methodologies can include differences in the specimen used in the experiments (paraffin-embedded and fresh tumor tissue, respectively). Another possible cause for discrepancy may be intra-observer error due to subjectivity not only in the IHC interpretation, but also in the qRT-PCR analysis, particularly in the first cycles, which depend not only on the melting temperature of the amplicon, but also on the behavior of the amplicon's genomic vicinity [34,35].

The comparison between qRT-PCR data and CISH results showed that the gene expression median was correlated with gene copy number. Recently, Ntoulia et al. [22] and Bergqvist et al. [36] demonstrated a significant correlation between transcript level and *HER-2* amplification in breast carcinomas evaluated by CISH. *HER-2* gene amplification is the most prevalent genetic mechanism driving *HER-2* overexpression. The discordant cases (8.1%) presenting high amplification without *HER-2* overexpression showed IHC status of 2+ and 3+ immunostaining. Tse et al. [31] and Vinatzer et al. [32] assessed *HER-2* gene copy number by FISH and compared the results with qRT-PCR. The authors showed a concordance ratio of 90% and 77%, respectively.

In the present study, it was observed a high correlation rate among the three procedures used to score *HER-2* status in breast carcinomas. The correlation between CISH and qRT-PCR was higher than CISH and IHC that was higher than qRT-PCR and IHC (91.9, 83.8, and 78.9%, respectively) for the samples evaluated for all procedures. These results are in agreement with Ntoulia et al. [22] that concluded that qRT-PCR is more precise and reproducible than IHC.

None correlation was found between *HER-2* expression by IHC or gene copy number and clinicopathological data. However, a significant association was observed between lymph node status and *HER-2* transcript expression by qRT-PCR. Peiró et al. [37] analyzed *HER-2* status by IHC and CISH and observed a correlation with histologic grade and lymphovascular invasion, but no association was found with age, tumor size, and Ki-67 status. Similarly, the absence of correlation between *HER-2* status and clinical and pathological features has been reported in other studies [25,35].

It was observed that tumors with luminal B and *HER-2* tumors showed higher transcript expression luminal A and basal-like tumors (median RQ=3.6 ± 4.77 and RQ=0.93 ± 1.90, respectively) (P<0.0001), as described in large scale expression analysis using microarrays [38,39].

No statistically difference was observed between ductal and lobular carcinomas evaluated by qRT-PCR, probably because the small number of patients present in the lobular

tumor group. Among the lobular carcinomas, amplification by CISH was observed in one case, followed by *HER-2* overexpression, and negative IHC staining. Li-Ning-T et al. [40] evaluated five invasive lobular tumors, and none showed amplification by CISH methodology, however two cases presented 2+ immunostaining.

Three cases presented different standards of hybridization by CISH, representing different areas of the tumor. In two cases (Figure 3B and C) was possible to discriminate, in both areas, an unamplified profile, although discordant results were found (diploid and polysomy). The other case (Figure 3A) presented an unamplified status (diploid and polysomy) and high-level amplification. The problem is whether cells showing different levels of amplification make the difference or whether a threshold (or its value) in the percentage of amplified tumor cells is needed to define unamplified and amplified tumors. Further studies should be performed to clarify the tumoral heterogeneity involving amplification detected in relation to *HER-2* prognostic and predictive meanings in breast cancer.

In conclusion, our results suggest that *HER-2* status can be performed by CISH and qRT-PCR analysis. CISH combines the advantages of IHC and FISH and is a promising practical alternative to FISH, while qRT-PCR is reliable, semi-automated, and fast. Both methodologies can be performed in most pathology laboratories and moreover have advantages from an economical point of view. In addition, our data confirmed that *HER-2* overexpression is associated with a worst prognostic in human breast tumors.

Acknowledgments

The authors would like to thank the pathologist Dr. Francisco Carlos Quevedo and Adalberto Campanha for the assistance with the immunohistochemical analysis; Dr. Fausto Viterbo for grant the normal breast samples to quantitative real time PCR analysis; Flávia Cilene Maciel da Cruz Alves for her assistance with CISH technique; and for Invitrogen, Sao Paulo, Brazil for supply the Zymed SPoT-Light HER2 CISH Kit. This study was supported by

the Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq) and Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), Brazil.

5. References

- [1] Coussens L, Yang-Feng TL, Liao YC, Chen E, Gray A, McGrath J, Seeburg PH, Libermann TA, Schlessinger J, Francke U, et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. *Science* 1985;230:1132-1139.
- [2] King CR, Kraus MH, Aaronson SA. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. *Science* 1985;229:974-976.
- [3] Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
- [4] Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science* 1989;244:707-712
- [5] Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 1999;112(Suppl 1):S53-67.
- [6] Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, Pettinato G, Panico L, D'Antonio A, Bianco AR, De Placido S. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol* 1996;14:2702-2708.
- [7] Tetu B, Brisson J, Plante V, Bernard P. p53 and c-erbB-2 as markers of resistance to adjuvant chemotherapy in breast cancer. *Mod Pathol* 1998;11:823-830.
- [8] Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, Wolter JM, Paton V, Shak S, Lieberman G, Slamon DJ. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 1999;17:2639-2648.
- [9] Keefe DL. Trastuzumab-associated cardiotoxicity. *Cancer* 2002;95:1592-1600.

- [10] Zhao J, Wu R, Au A, Marquez A, Yu Y, Shi Z. Determination of HER2 gene amplification by chromogenic in situ hybridization (CISH) in archival breast carcinoma. *Mod Pathol* 2002;15:657-665.
- [11] Hauser-Kronberger C, Dandachi N. Comparison of chromogenic in situ hybridization with other methodologies for HER2 status assessment in breast cancer. *J Mol Histol* 2004;35:647-653.
- [12] WHO World Health Organization: International Classification of Diseases for Oncology, 2nd edn. World Health Organization, Geneva, 1990.
- [13] UICC União Internacional Contra o Câncer: Classificação dos tumores malignos, 5° ed. Ministério da Saúde, Rio de Janeiro-Brasil, 1998.
- [14] Bloom MJC, Richardson WW. Histologic grading and prognosis in breast cancer: a study of 1709 cases. *Br J Cancer* 1957;11:358-377.
- [15] Weikel W, Beck T, Mitze M, Knapstein PG. Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:149-154.
- [16] 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* 2007;143:109-118.
- [17] Rosa FE, Caldeira JRF, Felipes J, Bertonha FB, Quevedo FC, Domingues MAC, Moraes Neto FA, Rogatto SR. Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathological factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers. *Hum Pathol* 2007 (*in press*).
- [18] Ferretti G, Felici A, Papaldo P, Fabi A, Cognetti F. HER2/neu role in breast cancer: from a prognostic foe to a predictive friend. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2007;19:56-62.
- [19] Vanden Bempt I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen M, Wlodarska I, Vandenberghe P, De Wolf-Peeters C. Real-time reverse transcription-PCR and fluorescence in-situ hybridization are complementary to understand the mechanisms involved in HER-2/neu overexpression in human breast carcinomas. *Histopathology* 2005;46:431-441.

- [20] Kim GY, Oh YL. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in cytological samples of breast carcinoma. *Cytopathology* 2004;15:315-320.
- [21] Bièche I, Parfait B, Laurendeau I, Girault I, Vidaud M, Lidereau R. Quantification of estrogen receptor alpha and beta expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 2001;20:8109-8115.
- [22] Ntoulia M, Kaklamanis L, Valavanis C, Kafousi M, Stathopoulos E, Arapantoni P, Mavroudis D, Georgoulas V, Lianidou ES. HER-2 DNA quantification of paraffin-embedded breast carcinomas with LightCycler real-time PCR in comparison to immunohistochemistry and chromogenic in situ hybridization. *Clin Biochem* 2006;39:942-946.
- [23] Kumamoto H, Sasano H, Taniguchi T, Suzuki T, Moriya T, Ichinohasama R. Chromogenic in situ hybridization analysis of HER-2/neu status in breast carcinoma: application in screening of patients for trastuzumab (Herceptin) therapy. *Pathol Int* 2001;51:579-584.
- [24] Dandachi N, Dietze O, Hauser-Kronberger C. Chromogenic in situ hybridization: a novel approach to a practical and sensitive method for the detection of HER2 oncogene in archival human breast carcinoma. *Lab Invest* 2002;82:1007-1014.
- [25] Madrid MA, Lo RW. Chromogenic in situ hybridization (CISH): a novel alternative in screening archival breast cancer tissue samples for HER-2/neu status. *Breast Cancer Res* 2004;6:R593-600.
- [26] Hicks DG, Tubbs RR. Assessment of the HER2 status in breast cancer by fluorescence in situ hybridization: a technical review with interpretive guidelines. *Hum Pathol* 2005;36:250-261.
- [27] Ma Y, Lespagnard L, Durbecq V, Paesmans M, Desmedt C, Gomez-Galdon M, Veys I, Cardoso F, Sotiriou C, Di Leo A, Piccart MJ, Larsimont D. Polysomy 17 in HER-2/neu status elaboration in breast cancer: effect on daily practice. *Clin Cancer Res* 2005;11:4393-4399.
- [28] Di Palma S, Collins N, Faulkes C, Ping B, Ferns G, Haagsma B, Layer G, Kissin MW, Cook MG. Chromogenic in situ hybridisation (CISH) should be an accepted method in the routine diagnostic evaluation of HER2 status in breast cancer. *J Clin Pathol* 2007;60:1067-1068.
- [29] Schlemmer BO, Sorensen BS, Overgaard J, Olsen KE, Gjerdrum LM, Nexø E. Quantitative PCR--new diagnostic tool for quantifying specific mRNA and DNA molecules: HER2/neu DNA quantification with LightCycler real-time PCR in comparison with immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Scand J Clin Lab Invest* 2004;64:511-522.

- [30] Bossard C, Bieche I, Le Doussal V, Lidereau R, Sabourin JC. Real-time RT-PCR: a complementary method to detect HER-2 status in breast carcinoma. *Anticancer Res* 2005;25:4679-4683.
- [31] Tse C, Brault D, Gligorov J, Antoine M, Neumann R, Lotz JP, Capeau J. Evaluation of the quantitative analytical methods real-time PCR for HER-2 gene quantification and ELISA of serum HER-2 protein and comparison with fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry for determining HER-2 status in breast cancer patients. *Clin Chem* 2005;51:1093-1101.
- [32] Vinatzer U, Dampier B, Streubel B, Pacher M, Seewald MJ, Stratowa C, Kaserer K, Schreiber M. Expression of HER2 and the coamplified genes GRB7 and MLN64 in human breast cancer: quantitative real-time reverse transcription-PCR as a diagnostic alternative to immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. *Clin Cancer Res* 2005;11:8348-8357.
- [33] Lehmann U, Glockner S, Kleeberger W, von Wasielewski HF, Kreipe H. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. *Am J Pathol* 2000;156:1855-1864.
- [34] Wilhelm J, Hahn M, Pingoud A. Influence of DNA target melting behavior on real-time PCR quantification. *Clin Chem* 2000;46:1738-1743.
- [35] Kim YR, Choi JR, Song KS, Chong WH, Lee HD. Evaluation of HER2/neu status by real-time quantitative PCR in breast cancer. *Yonsei Med J* 2002;43:335-340.
- [36] Bergqvist J, Ohd JF, Smeds J, Klaar S, Isola J, Nordgren H, Elmberger GP, Hellborg H, Bjohle J, Borg AL, Skoog L, Bergh J. Quantitative real-time PCR analysis and microarray-based RNA expression of HER2 in relation to outcome. *Ann Oncol* 2007;18:845-850.
- [37] Peiró G, Aranda FI, Adrover E, Niveiro M, Alenda C, Payá A, Seguí J. Analysis of HER2 by chromogenic in situ hybridization and immunohistochemistry in lymph node-negative breast carcinoma: Prognostic relevance. *Hum Pathol* 2007;38:26-34.
- [38] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:10869-10874.

- [39] Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 2005;65:9155-9158.
- [40] Li-Ning-T E, Ronchetti R, Torres-Cabala C, Merino MJ. Role of chromogenic in situ hybridization (CISH) in the evaluation of HER2 status in breast carcinoma: comparison with immunohistochemistry and FISH. *Int J Surg Pathol* 2005;13:343-351.

Table 1. Comparison of clinicopathological features with qRT-PCR (qPCR), IHC, and CISH results.

Variables (n) ^a	qPCR		P *	IHC		P *	CISH		P *
	<2.00	≥2.00		0/1+	2/3+		≤5	>10	
Age									
≤50 (28)	15	13	0.2569	17	11	0.3651	9	5	0.9541
>50 (48)	32	16		34	14		15	8	
Lymph node status									
<4 (57)	38	19	0.0915	40	17	0.4723	21	9	0.1756
≥4 (32)	8	10		11	7		3	4	
ND (1)	0	1		0	1		0	0	
Tumor Size (cm)									
0 – 2 (19)	10	9	0.2953	11	8	0.2745	5	5	0.1883
>2 (56)	37	19		40	16		19	7	
ND (1)	0	1		0	1		0	1	
Clinical Stage									
I/IIA/IIB (65)	41	24	0.5901	44	21	0.7912	21	9	0.1756
IIIA/IIIB (11)	6	5		7	4		3	4	
Histologic grade									
I/II (36)	22	14	0.9237	23	13	0.6767	10	6	1.000
III (35)	21	14		24	11		10	6	
ND (5)	4	1		4	1		4	1	
S phase									
Low (≤ 25%) (32)	19	13	0.5354	21	11	0.7209	11	6	0.5133
High (> 25%) (31)	16	15		19	12		8	7	
Not reactive (13)	12	1		11	2		5	0	
Familial History of Cancer									
Yes (15)	7	8	0.1769	10	5	0.9678	4	3	0.6346
No (61)	40	21		41	20		20	10	

^a Number of the cases evaluated by qRT-PCR and IHC, while 37 cases were evaluated using CISH.

* Chi-Square test.

ND: not determined.

Table 2. *HER-2*/reference gene ratio by qRT-PCR in relation to IHC and CISH.

	qRT- PCR				
	n (%)	<i>HER-2</i> ratio (range) *	<i>P</i>	Ratio <2.00 n (%)	Ratio ≥2.00 n (%)
IHC					
0 or 1+	50 (66.7)	0.93 (0.05-12.24)	<0.0001 ^a	40 (80.0)	10 (20.0)
2+	13 (17.3)	2.69 (1.15-8.39)		5 (38.5)	8 (61.5)
3+	12 (16.0)	6.60 (1.07-20.43)		1 (8.3)	11 (91.7)
Total	75				
CISH					
No amplification	24 (64.9)	0.75 (0.05-1.95)	<0.0001 ^b	24 (100)	0 (0.0)
High amplification	13 (35.1)	4.69 (1.07-20.43)		2 (15.4)	11 (84.6)
Total	37				

* Mean *HER-2*/reference gene ratios^a Kruskal-Wallis test.^b Mann-Whitney test.**Table 3.** Comparison between IHC and CISH results.

IHC	CISH		Total
	No amplification (%)	High amplification (%)	
0 or 1+	22 (84.6)	4 (15.4)	26
2+	2 (50.0)	2 (50.0)	4
3+	0 (0.0)	7 (100)	7
Total	24	13	37

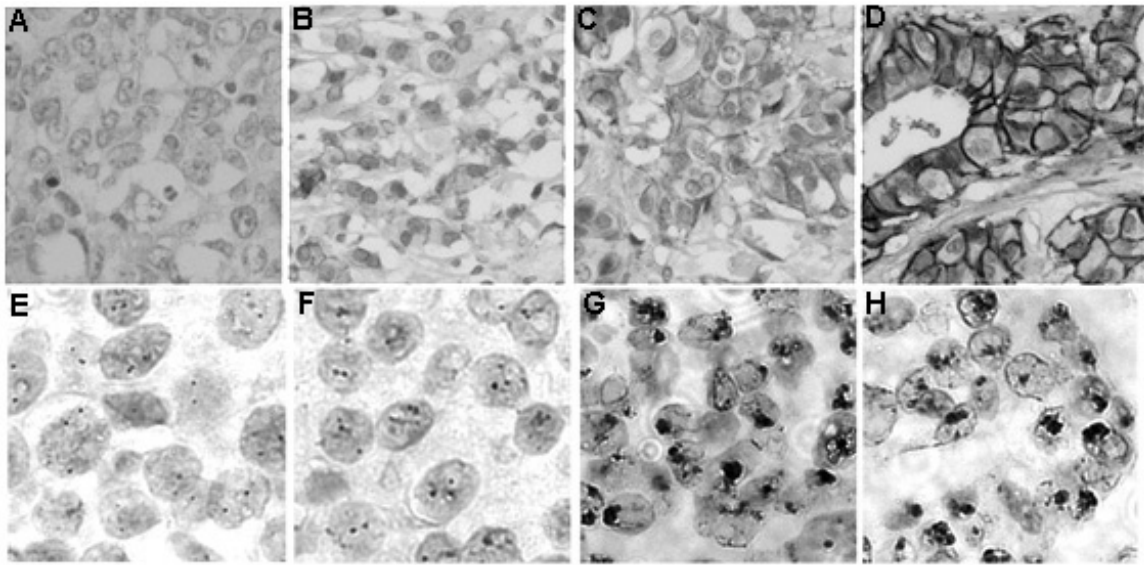


Figure 1. Breast cancer cells showing immunohistochemistry and chromogen *in situ* hybridization results of *HER-2*. (A-D) IHC: *HER-2* protein expression scored as 0 (A), 1+(B), 2+ (C), and 3+ (D); (E-H) CISH: *HER-2* gene detected in nuclei with two signals (E), more than two signals (F), and high-level amplification (G-H).

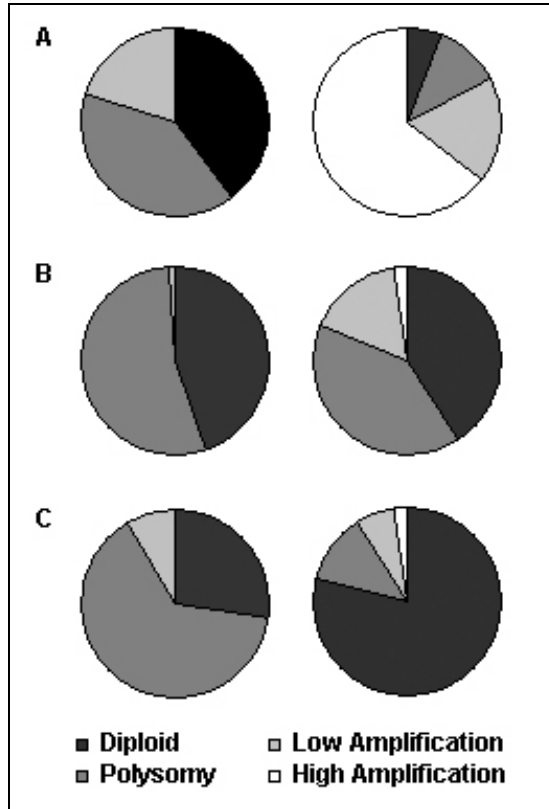


Figure 2. Intratumoral heterogeneity detected by chromogen *in situ* hybridization in two different areas of three breast tumors (A, B, and C). Diploid, polysomy, low and high-level amplification were observed in different areas from the same tumor.

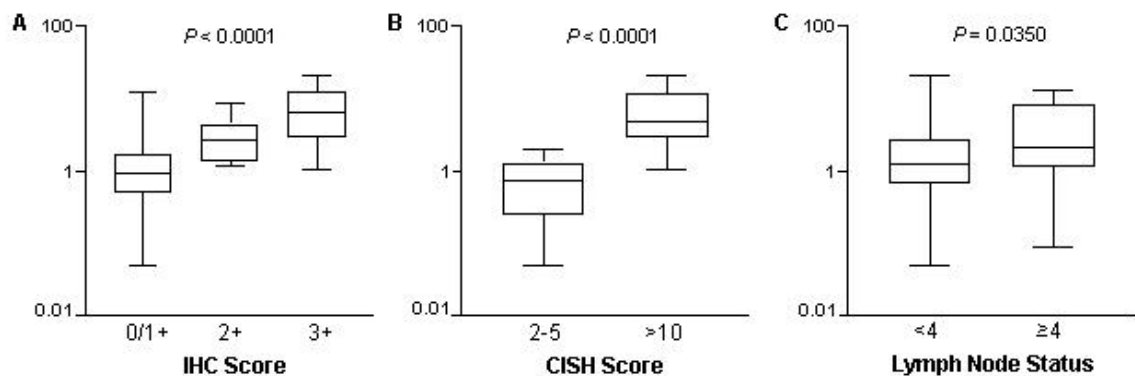


Figure 3. (A) Correlation between transcript and protein (1+, 2+, and 3+) expression levels; (B) Correlation between transcript expression level and amplification (2-5 signals and >10 signals or large clusters); (C) Significant correlation between *HER-2* transcript expression and lymph nodes involvement (<math>< 4</math> nodes and ≥ 4 nodes). The transcript expression values by qRT-PCR are indicated in a log scale. Bars indicate the median value. *P* values are shown.

Article 3

Estrogen and progesterone receptor status versus Ki-67 proliferation antigen are associated with remarkably distinct gene expression profiling in breast cancer

Fabíola E. Rosa MSc^{a*}, Renata A. Canevari PhD^{b*}, Francisco A. Moraes Neto MD^c, José R. F. Caldeira MD, PhD^d, Eduardo M. R. Reis PhD^{e*}, Sergio Verjovski-Almeida PhD^e, Silvia R. Rogatto PhD^b

^aDepartment of Genetics, Institute of Biosciences, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

^bDepartment of Urology, Faculty of Medicine, UNESP - São Paulo State University, Botucatu, Sao Paulo, Brazil.

^cDepartment of Pathology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, Sao Paulo, Brazil.

^dDepartment of Senology, Amaral Carvalho Hospital, Jaú, Sao Paulo, Brazil.

^e Chemistry Institute, USP - University of São Paulo, Sao Paulo, Brazil.

* The authors have contributed equally.

Keywords: breast cancer; microarray; mRNA expression; Ki-67; hormone receptors.

Correspondence to:

Silvia Regina Rogatto, PhD

NeoGene Laboratory - Departamento de Urologia, Faculdade de Medicina - UNESP
Botucatu, São Paulo, Brazil

CEP: 18618-000

Telephone: 55-14-3811 6271

Fax: 55-14-3811 6271

E-mail: rogatto@fmb.unesp.br

Running Title: Gene expression profile based on hormone receptors status and Ki-67 in breast cancer

Supported by the Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) and Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq), Brazil.

Summary

Breast cancer is a complex and clinically heterogeneous disease. The determination of estrogen and progesterone receptors is crucial for the decision on therapeutic strategies. However, the routine investigation of ESR1 and PGR status using formalin fixed tissue sections showed large interlaboratory variability specifically when in low levels. The stratification of characteristic patterns of genes expression is important to improve clinical management and useful to overcome these limitations. Global gene expression analysis was performed in 29 (training set) and 39 (validation set) invasive ductal carcinomas to compare samples according ESR1 and PGR transcripts and proteins status *versus* proliferative index (Ki67 immunostaining). The first group presented ESR1 negative and Ki-67 positive status ($> 25\%$) in comparison with ESR1 positive and Ki-67 negative status ($\leq 25\%$). The second group was composed of PGR negative cases and Ki-67 positive status ($> 25\%$) in comparison with tumors showing PGR positive and Ki-67 negative status ($\leq 25\%$). In the first comparison was identified 316 clones differentially expressed ($P < 0.001$). Using "leave-one-out" classification this number was reduced to 68 sequences ($P < 0.001$). Among them, four genes (*GATA3*, *RERG*, *CLAMP*, and *AURKB*) were chosen for validation by qRT-PCR. The second cluster was composed of 345 sequences differentially expressed ($P < 0.001$). After "leave-one-out" analysis the number of sequences was reduced to 83 ($P < 0.001$) including five genes (*UBE2C*, *GTSE1*, *BIRC5*, *CLAMP*, and *AURKB*) that were selected for validation using qRT-PCR. The comparison between these two clusters revealed 12 differentially expressed genes in common. The genes expression levels were compared between Ki-67 $> 25\%$ and Ki-67 $\leq 25\%$ status. *GATA3*, *RERG*, and *CLAMP* downexpression and *AURKB*, *UBE2C*, and *GTSE1* overexpression were significantly associated with Ki-67 $> 25\%$ cases ($P = 0.0033$, $P = 0.0253$, $P = 0.0385$, $P = 0.0038$, $P = 0.0230$, and $P = 0.0387$, respectively). The comparison between clinicopathological features (age, histologic grade, tumor size, lymph node status, clinical stage, and *HER-2* expression) and gene expression revealed that *GATA3* downexpression and *AURKB* and *GTSE1* overexpression were statistically associated with high histologic grade ($P = 0.0154$, $P = 0.0231$, and $P = 0.0371$, respectively). Although no statistically significant, a lower expression of *RERG* and *UBE2C* overexpression were observed in high grade tumors ($P = 0.1056$ and $P = 0.0712$, respectively). The statistical correlation between gene expression level with Ki-67 status using microarray was validated by qRT-PCR. In addition, *GATA3*, *AURKB*, and *GTSE1* expression were correlated to histological grade. These results corroborated with the function of these genes in increase the proliferative cells rate and revealed them as potential biomarkers involved in breast carcinogenesis.

1. Introduction

Breast cancer is a complex disease and although recent researches have emphasized the heterogeneity of the disease, much of its biology remains poorly understood [1]. Actually, traditional prognostic factors include the axillary lymph node status, tumor size, the nuclear grade, and the histological grade [2]. In addition, predictive and prognostic markers used and applied to patient management include the hormone receptors status (estrogen and progesterone receptors), and HER-2 amplification and/or overexpression. Although these factors have been usefully applied, it has become evident that tumors classified under the same morphological taxonomy and hormonal status may have distinct biological features and clinical behavior [3]. Besides, low levels of ESR1 (evaluated by immunohistochemical staining on formalin fixed tissue sections) showed large interlaboratory variability [4]. Conceivably, low expression measurements of this epitope do not necessarily correlate with the functional activity of ESR protein. Current genomic technologies allow the evaluation of gene expression in thousands of genes in parallel and assessment of interactions between expressed genes to understand cancer biology and to various clinical correlative studies. The major aim is to discover biomarkers of early detection, treatment response and clinical outcomes such as metastasis, recurrence and survival. Understanding the molecular events and development of reliable biomarkers will ultimately facilitate novel therapeutic discoveries and improve patient selection for clinical trials.

Genes involved in cell growth and proliferation have been observed to be differentially expressed in almost all tumors microarray datasets [5]. Ki-67 is a nuclear antigen, whose expression is tightly associated with the cell cycle. This protein is present in all proliferating cells (normal and tumor) and it may serve as a marker to evaluate the growth fraction of a given cell population [6]. It is present in S, G1, G2, and M phase, but it is absent in G0 [7]. Ki-67 has been associated with various clinico-pathological features. Some studies reported a correlation with high histological grade and elevated Ki-67 status [8-10]. Recently we reported that carcinomas with high Ki-67 were significantly associated with tumors exhibiting low levels of mRNA and undetectable protein levels of ESR1 and PGR, in agreement with

previous results [11-13]. ESR1 positive tumors with absence of Ki-67 expression were significantly associated with low mitotic count, suggesting that ESR1 expression is associated with tumorigenesis in well-differentiated breast tumors, but less directly related to cell proliferation [9,10,14].

A more valuable application of Ki-67 may be to assess its change during treatment and any relation this has to subsequent response since change in proliferation may be expected to be a key determinant of change in growth rate of the tumors [15]. In a meta-analysis involving 12,155 patients, Azambuja et al. [16] showed that Ki-67 positivity confers a high risk of relapse and a worse survival in patients with early breast cancer.

Ki-67 has been involved in some proliferation signatures, showing that a set of genes with increased differential expression is correlated with tumor cell proliferation rates. Perou et al. [17] showed that tumors expressing the highest level of the genes involved in the proliferation cluster contained 70% or greater Ki-67 positive carcinoma cells, whereas the three tumor specimens with the lowest average expression of these genes showed only 5-10% Ki-67 positive carcinoma cells. The authors concluded that there is general agreement between the expression level of the genes in the proliferation cluster and a conventional assessment of proliferation of carcinoma cells. Tan et al. [9] compared Ki-67 status and the expression profile of the tumors. The authors identified 28 genes, of which five were upregulated in tumors demonstrating $\geq 40\%$ Ki-67 immunopositivity, while the remaining 23 genes were downregulated. Several genes downregulated were related to cell death (*BCL2*, *MAP2K4*, and *TNFSF10*).

The aim of this study is evaluate invasive breast carcinomas using oligonucleotide microarray to determine a set of markers which is predictive for cell proliferation rate in ESR1 and PGR negative and high Ki-67 expression tumors. Expression analysis by real time RT-PCR was performed to validation and comparison with clinicopathological data.

2. Materials and Methods

2.1. Patients

A total of 63 breast carcinoma samples were obtained from 2000 to 2004 from Amaral Carvalho Hospital, Jaú (SP, Brazil). The patients were divided in two groups: training set (34 cases) and validating set (39 cases). The patients were accrued consecutively and the criterion for inclusion in the study was no previous histological diagnosis of cancer. The patients had undergone segmental resection or mastectomy, and none of the patients had received radiotherapy or chemotherapy prior to surgery. All patients were advised of the procedures and provided written informed consent. Patients with a family history of cancer, particularly those with first-degree and second-degree relatives, were noted and, whenever possible, the cancer was confirmed with documented medical records or ascertained from the death certificate. The Brazilian Ethics Committee approved this study.

The follow-up after the surgery varied between 23 to 83 months; patients were followed every four months postoperatively. Immediately after surgery, the tumor samples were frozen at -80°C . Frozen tissue sections were histopathologically evaluated and microdissected to ensure the presence of at least 90% of tumor cells. Histopathological classification was performed according to the WHO International Classification of Disease for Oncology [18], and the clinical stage was determined according to the UICC TNM classification [19]. The malignancy of infiltrating carcinomas was scored according to the Scarff-Bloom and Richardson grading system [20]. A summary of the clinical and pathological data is given in Table 1.

After surgery, the patients received different chemotherapy treatments: AC (adriamycin, cyclophosphamide); FEC (5-fluorouracil, 4-epirubicin, cyclophosphamide), FAC (5-fluorouracil, adriamycin, cyclophosphamide); CMF (cyclophosphamide, methotrexate, 5-fluorouracil) (100% or 70% of the dose according the age and clinical status of the patients). Fifty-three patients (84%) received radiotherapy and 44 ER- α positive and/or PGR positive cases (70%), as determined by IHC analysis, were treated with tamoxifen (20 mg/day) at the

end of chemotherapy treatment for 60 months. Some patients with intolerance or side effects (postmenopausal) were treated with aromatase inhibitors, such as anastrozole (1 mg/day) or letrozole (2.5 mg/day).

2.2. Total RNA isolation

Total RNA was extracted from pulverized frozen tumor tissue using Rneasy mini Kit (Qiagen GmbH, Hilden, Germany) according to the manufacturer's instructions. The RNA samples were stored in RNase-free distilled water at -70°C. The quantification and quality of RNA samples were evaluated using NanoDrop (*ND-1000 Spectrophotometer v.3.0.1*, Labtrade) and Bioanalyzer (*RNA 6000 NanoLabChip kit/ 2100* Agilent Technologies), respectively.

2.3. Microarray Assays, Normalization, and Statistical Analysis

Thirty-four samples, subdivided in two groups, based on immunohistochemistry and qRT-PCR results, were evaluated by microarray assay. The first group comprised 29 cases: 10 samples presenting ESR1 negative (0 and 1+ and transcript downexpression) and Ki-67 positive status ($\geq 25\%$) in comparison with 19 cases presenting ESR1 positive (2 and 3+ and transcript overexpression) and Ki-67 negative status ($< 25\%$). The second group was composed of 12 PGR negative (0 and 1+ and transcript downexpression) cases and Ki-67 positive status ($\geq 25\%$) in comparison with 16 samples showing PGR positive (2 and 3+ and transcript overexpression) and Ki-67 negative status ($< 25\%$).

Gene expression experiments were performed using CodeLink bioarray systems (GE Healthcare Buckinghamshire, UK) according to manufacturer's protocols. In brief, first-strand cDNA was produced using 2 μg of total RNA from each sample, Superscript II reverse transcriptase and a T7-poly-dT primer. Second-strand cDNA was produced using RNase H and *E. coli* DNA polymerase I. Double-stranded cDNA was purified on a QIAquick column (Qiagen) and biotin-labeled cRNA targets were generated by an in vitro transcription reaction

using T7 RNA polymerase and biotin-11-UTP (Perkin Elmer-Foster City, CA, USA). Fragmented cRNA from each sample was hybridized to CodeLink microarrays containing approximately 55,000 30-mer probes overnight at 37°C in a shaking incubator at 300 rpm. After post-hybridization washes, hybridized targets were revealed by incubating the arrays with a Cy5-Streptavidin conjugate. The reagents used in the synthesis and fragmentation of cRNA were provided in the CodeLink expression assay kit (GE Healthcare). Signal of the Cy5-dye from hybridized targets were detected by Axon GenePix 4100B Scanner (Axon Instruments Foster City, CA, USA) and visualized using the program ImageQuant (GE Healthcare). CodeLink Expression Analysis software (GE Healthcare) was used to obtain background-subtracted spot intensities from microarray images. A set of 53,423 cDNA probes present in the 55K arrays were analyzed. From these, only 35,505 probes that had valid measurements (i.e. were detected above the average array background as determined by a set of negative controls represented in the CodeLink arrays). Intensity data from different hybridizations were normalized by quantil method. To identify gene expression signatures, a Signal-to-Noise Ratio (SNR) [21] was used to compare the expression intensity data from all samples. The SNR parameter essentially is a measure of signal strength relative to background noise. A cutoff $SNR \geq |0.2|$ was used to select differentially expressed genes. Statistical significance of the differential expression (P values) was ascertained by bootstrap re-sampling, i.e. by re-calculating SNR values following 10,000 random permutations of sample labels and computing the frequency of each SNR value measured in the original set was observed in the randomly permuted data [22]. The robustness gene expression signature was evaluated by sample leave-one-out cross-validation [23]. Essentially, one sample is removed and a new set of significantly altered genes is determined using the remainder samples. This procedure was repeated for each one of the samples and the frequency at which each gene appears in the various “leave-one-out” datasets at a given significance of $P \leq 0.001$ for both clusters analysis (ESR1 and PGR) was annotated. The reproducibility of the gene expression measurements was assessed by generating two independent replicate target preparations for two samples.

2.4. Real time PCR

DNA digestion and reverse transcription

The quality of RNA samples was confirmed by electrophoresis in a 2% agarose gel followed by ethidium bromide staining, and the 18S and 28S RNA bands were visualized under ultraviolet light.

To avoid DNA contamination, the samples were digested with 1 unit of Dnase I Amplification Grade (Life Technologies, Rockville, MD, U.S.A.) in 10X Dnase I Reaction Buffer and 25 mM EDTA pH 8.0. The reaction was carried out in a PTC-100 thermal cycle (Peltier - Effect Cycling - MJ Research, Inc., USA) for 15 min at room temperature and the enzyme was inactivated by heating at 70°C for 10 min. RNA was reverse transcribed in a final volume of 20µl containing 5x First-Strand Buffer (250 mM Tris-HCl, pH 8.3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl₂), 10 mM each dNTP, 0.5µg/µl Oligo (dT)₁₈, 0.1 M dithiothreitol and 200 units of SuperScript™ II reverse transcriptase (Invitrogen Life Technologies, Inc., Carlsbad, CA). Reverse transcription was carried out for 60 min at 42°C and the reaction mixture was subsequently inactivated for 15 min at 70°C. The cDNA was stored at -70°C.

Quantitative RT-PCR

Thirty-nine breast carcinomas were evaluated by qRT-PCR to analysis *GATA3*, *RERG*, *CLAMP*, *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1*, and *BIRC5* genes expression. Four normal breast tissue samples from patients undergoing mammary reduction and confirmed as histopathologically normal were used as controls.

PCR amplification was performed in ABI Prism 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Primers were designed using the software Primer Express (v2.0; Applied Biosystems). Quantitative data was analyzed using the Sequence Detection System software (v1.0; Applied Biosystems). PCR reactions were carried out with Power SYBR Green I (Applied Biosystems), in a total volume of 10µl according the manufacturer's instructions. In addition, primers and TaqMan probes for *ESR1*,

PGR and the *GAPDH* were designed and synthesized according to Assay-by-Design (Applied Biosystems). Relative standard curves were constructed for all primers with serial dilutions of benign breast disorder cDNA (100, 20, 4, 0.8, and 0.16ng/uL). The standard curves of the targets and reference genes showed similar results of efficacy (> 90%). The relative quantification was given by the ratio between the mean value of the target gene and the mean value of the reference gene (*GAPDH*) in each sample. The relative amount of PCR product generated from each primer set was determined on the basis of the Ct value. The relative quantification (RQ) was calculated by $2^{-\Delta\Delta CT}$. Target gene relative expression level was compared with the ratio of healthy controls. Overexpression was defined as the mean target/reference gene ratio $RQ \geq 2.00$ and downexpression as $RQ < 0.50$.

2.5. Immunohistochemistry Staining

Immunohistochemical reactions were performed using the RTU-ER-6F11 antibody (Novocastra, Newcastle, UK) (dilution 1:50), the monoclonal anti-human progesterone receptor 1A6 antibody (DAKO, Carpinteria, CA, USA) (dilution 1:50), and the rabbit monoclonal antibody (Clone SP3) (Thermo Fisher Scientific, Fremont, CA, USA) (dilution 1:100) for ESR1, PGR, and HER-2, respectively. Positive scoring of immunohistochemical staining for ESR1 and PGR was assessed by visually estimating the percentage of positive nuclear staining in $\geq 10\%$ of neoplastic cells and samples were graded as follows: (1+) weak, (2+) moderate, and (3+) strong intensity. The HER-2 results were scored as: 0, no immunoreactivity; 1+, weak and incomplete immunoreactivity; 2+, weak and complete membrane immunoreactivity in more than 10% of the tumor cells or strong and complete membrane immunoreactivity in less than 10% of the tumor cells; and 3+, strong and complete membrane immunoreactivity in more than 10% of the tumor cells. Slides were randomly distributed to three independent blinded observers (FAMN and FCQ). Any discrepancies between classifications of samples were addressed by immediate review, and the final result was reached by consensus. Only the invasive component of the neoplasia

was assessed and scored. The level of Ki-67 was evaluated in all of the cases. The median value of the Ki-67 labeling index included in this study was used as a cutoff to distinguish tumors with low ($\leq 25\%$) and high ($>25\%$) proliferative fractions (Weikel et al., 1991).

2.6. Statistical Analysis

The statistical analysis of qRT-PCR results was performed as described below. Three patients that had lost follow-up were censored as survivors in the statistical calculations. The correlation between target genes and *HER-2* expression was evaluated using the Spearman's correlation test. The target genes expression was compared to clinicopathological features using One-way Analysis of Variance (ANOVA) to determine if there was a significant difference of expression among the clinical data; differences were tested for significance by the Mann-Whitney test for two categories and by the Kruskal-Wallis test for three categories. Statistical significance was designated at $P < 0.05$.

3. Results

Breast cancer samples were assessed by microarray to analyze genes differential expression and qRT-PCR to validate microarray results and correlate these results to clinicopathological data. The study sample consisted of 63 female breast cancer tumors, in which most presented operable stage II and III breast cancer, and positive axillary lymph nodes. Fifty-nine tumors were infiltrating ductal and four infiltrating lobular carcinoma. Most patients were more than 50 years of age (66.7%) with a mean age of 58.9 ± 14.9 (range, 30-94 years); most tumors were more than 2 cm (71.4%); and 57.1% showed a low S-phase fraction. The mean follow-up was 53.7 ± 19.8 months. During this interval three patients died due to unrelated causes, one patient recidivated in the same breast, eight patients presented metastasis (two spreading to the bone and six to the lung) and three had their follow-up missed.

Differential expressed genes by microarray analysis

A training set of 34 cases was selected to discriminatory analysis of genes expression. Two groups (29 and 28 cases for ESR1 and PGR comparison, respectively) were analyzed based on immunohistochemistry and qRT-PCR analysis: a) 10 samples presenting ESR1 negative and Ki-67 positive status in comparison with 19 cases presenting ESR1 positive and Ki-67 negative status; b) 12 PGR negative cases and Ki-67 positive status in comparison with 16 samples showing PGR positive and Ki-67 negative status.

ERS1 versus Ki-67

A supervised hierarchical clustering was performed using as thresholds an absolute $\text{SNR} \geq |0.2|$ and a significance level of $P < 0.001$, where 316 sequences were differentially expressed. Additional analysis using “leave-one-out” cross-validated classification reduced the initial set of 316 clones to a classifier containing 68 sequences ($P < 0.001$) (Figure 1A, Table 2). From this, 54 clones were identified in more than 79% of the “leave-one-out” datasets and 14 sequences were present in all “leave-one-out” datasets.

The 68 sequences selected consisted of 18 ESTs, four not determined sequences, three hypothetical protein, and 43 known genes. Among the 43 genes, 20 showed upregulation and 23 genes presented downregulation in Ki-67 positive tumors. Functional annotation of the 43 differentially expressed genes using NCBI database showed that 25 of them have a known or inferred function (4 proliferation, 4 transcription, 2 adhesion, 5 transport, 2 DNA replication, 2 apoptosis, 1 immune response, 2 metabolism (carbohydrate and protein), 1 cytoskeleton organization, 1 notch signaling pathway, and 1 regulation of Rab GTPase activity).

PGR versus Ki-67

A supervised hierarchical clustering was performed using as thresholds an absolute $\text{SNR} \geq |0.2|$ and a significance level of $P < 0.001$, where 345 sequences were differentially

expressed. In addition, the “leave-one-out” cross-validated classification reduced the initial set of 345 to 83 sequences ($P < 0.001$) (Figure 1B, Table 3). From these sequences, 60 clones were identified in more than 79% of the “leave-one-out” datasets and 23 sequences were present in all “leave-one-out” datasets.

The selected sequences consisted of 23 ESTs, five not determined sequences, seven hypothetical protein, and 48 known genes. From these 48 genes, 33 showed upregulation and 15 presented downregulation in Ki-67 positive tumors. Functional annotation showed that 29 genes have a known or inferred function (14 proliferation, 2 transcription, 4 transport, 1 apoptosis, 1 immune response, 3 metabolism (carbohydrate and lipid), 1 cytoskeleton organization, 1 estrogen biosynthetic process, 1 negative regulation of cell migration, and 1 tRNA catabolic process).

Comparison between ESR1 and PGR analysis

The overlap of both clusters was of 12 genes. Among them, four were functionally classified as involved in: transport (*SLC25A35* and *SLC29A4*), apoptosis (*TNFRSF21*) and cell proliferation (*AURKB*). In addition, the *CLAMP* gene was found in both clusters.

Validation by quantitative real-time PCR (qRT-PCR) analysis

From the group of 68 and 83 sequences for ESR1 and PGR clusters, respectively, it was selected seven genes for qRT-PCR validation. These genes were chosen due to their importance in cell proliferation and because the involvement with ESR1 pathway, as described in the literature. Four genes were present in the ESR1 cluster (*GATA3*, *RERG*, *CLAMP*, and *AURKB*), five in PGR cluster (*UBE2C*, *GTSE1*, *BIRC5*, *CLAMP*, and *AURKB*), and two of them were presented in both clusters (*CLAMP* and *AURKB*). The downregulated genes in Ki-67 positive samples of microarray analysis were *GATA3*, *RERG*, and *CLAMP*. The mRNA expression levels were measured in the validation set of 32 cases for *GATA3* and *RERG* genes, 39 samples for *CLAMP* and *AURKB*, and 28 tumors for *UBE2C*, *GTSE1*,

and *BIRC5*. Relative expression level of the target genes was compared with the ratio of four breast tissue from healthy women.

ESR1 cluster

The relative expression of the *GATA3*, *REGG*, *CLAMP*, and *AURKB* genes was compared between samples with Ki-67 positive status (12 samples: *GATA3* and *REGG*; 16 samples: *CLAMP* and *AURKB*) and Ki-67 negative status (20 samples: *GATA3* and *REGG*; 23 samples: *CLAMP* and *AURKB*). The relative expression was significantly associated with Ki-67 status ($\leq 25\%$ and $>25\%$ immunopositivity) for all genes evaluated ($P=0.0033$, $P=0.0253$, $P=0.0385$, and $P=0.0038$ for *GATA3*, *REGG*, *CLAMP*, and *AURKB* genes, respectively). A decline in expression was seen for *GATA3*, *REGG*, and *CLAMP* genes when Ki-67 immunopositivity was $>25\%$. The opposite was observed in *AURKB* expression levels (Figure 2).

The relative quantitative expression values (QR) were compared with clinicopathological features (age, histologic grade, tumor size, lymph node status, clinical stage, and *HER-2* expression by qRT-PCR) (Figure 3). Downexpression and overexpression of the *GATA3* and *AURKB* genes, respectively, were statistically associated with histologic grade III ($P=0.0154$ and $P=0.0231$, respectively). Although not statistically significant, a lower expression of *REGG* and *CLAMP* transcripts were observed in grade III tumors and in patients with less than 50 years, respectively ($P=0.1056$ and $P=0.0841$, respectively).

PGR cluster

The relative expression of the *UBE2C*, *GTSE1*, and *BIRC5* genes was compared between samples with Ki-67 positive status (14 samples) and Ki-67 negative status (14 samples). The analysis of *CLAMP* and *AURKB* expression was performed as described above (ESR1 cluster). The relative expression of *UBE2C* and *GTSE1* was significantly associated with Ki-67 status ($P=0.0230$ and $P=0.0387$, respectively). *BIRC5* showed a higher

expression in Ki-67 positive tumors than negative tumors, although no significant correlation was observed ($P=0.1389$). An increase in expression was seen for *UBE2C*, *GTSE1*, and *BIRC5* genes when Ki-67 status was >25% (Figure 2).

We also compared the values with clinicopathological features, as described above (Figure 3). The comparison between *UBE2C* overexpression and histologic grade III revealed a trend for statistical significance ($P=0.0712$), while *GTSE1* overexpression was statistically associated with high grade ($P=0.0371$). None difference was observed for *BIRC5* expression in comparison with clinicopathological data.

4. Discussion

The determination of the ESR1 and PGR expression level is crucial for the decision on therapeutic strategies in breast cancer patients. The interacting between estrogen and ESR1 in the cell nucleus transcriptionally induces the expression of many downstream genes, including *PGR* gene, resulting in DNA synthesis, cell division, and the production of growth factors leading to cell proliferation [25]. Interestingly, in many precancerous and cancerous lesions, ESR1 expression and Ki-67 expression seem to be positively correlated, showing an important early molecular change during the development of breast neoplasia (reviewed in [14]). However, not all breast tumors show positive correlation between ESR1 and Ki-67 expression levels. Recently, we demonstrated that low levels of *ESR1* and *PGR* transcripts were significantly associated with high Ki-67 level, principally in high grade tumors [10].

Based in differences between tumors expressing high and low levels of Ki-67, we evaluated the differential expression of genes, subdivided in two groups, one comparing ESR1 positive and negative status and the other PGR positive and negative status in relation to Ki-67 opposite status. We subdivided the samples according the two receptors to discriminate the differential expressed genes in these clusters. The analysis revealed 68 and 83 differentially expressed sequences for ESR1 and PGR clusters, respectively. In ESR1

cluster was found *GATA3* gene, described previously in the literature [23,26], and other genes involved in transport and cellular proliferation. In PGR cluster, 48% of the genes with a known or inferred function are involved with cell proliferation. The overlapping between the two analyses revealed 12 genes, most of them without known function. In ESR1 cluster samples, one out of 10 cases with ESR1 negative status showed PGR positive immunostaining and overexpression of the transcript (data not shown). In PGR cluster cases, three out of 12 cases presenting PGR negative status showed ESR1 positive status (data not shown).

In the present study, it was used gene array profile to explore the implications of the Ki-67 status in proliferation signatures. It was found, from ESR1 and PGR clusters, 17 genes involved with cell proliferation. From these, the *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1*, and *BIRC5* genes were selected to validation analysis using qRT-PCR. Besides, were chosen *GATA3* and *REERG*, previously described in breast carcinogenesis, and *CLAMP* gene with unknown function. [26] evaluated 56 invasive ductal carcinomas by microarray technology and found a signature of 10 genes associated with ESR1 expression. Eight out of ten genes selected were presented in platform used in the present study and only *ESR1* and *GATA3* showed differential expression.

The genes selected in this study were detected in some microarrays analysis, principally those involved with ESR1 cluster, as *GATA3* [17,26-33] and *REERG* [29, 33] or with proliferative signatures, as *AURKB* [34], *UBE2C* [34-37], and *BIRC5* [32]. *CLAMP* and *GTSE1* genes were selected by their role in cell proliferation and in protecting the cells from p53-dependent apoptosis, respectively [38,39]. In addition, a few studies have evaluated the correlation of these genes with clinicopathological data.

The microarray analysis revealed that downexpression of the *GATA3*, *REERG*, and *CLAMP* genes was associated with Ki-67 positive status, while the opposite was observed for *AURKB*. These results were validated by qRT-PCR in an independent group of patients and the same correlation was observed.

GATA3 gene is a member of a zinc finger DNA binding proteins family that recognize the consensus motif T/A GATA A/G [40-41]. More recently, its expression was described in breast tumor cell line, and a striking association was observed between *ESR1* and *GATA3* expression. This association indicated an important functional role for this gene in hormone-responsive breast cancers, although *GATA3* is not an *ESR1*-responsive gene [42], probably due to their transcriptional cross-regulation. The coexpression of these genes likely maintains the well-differentiated phenotype of these tumors [43]. It is known that *ESR1* high level expression is associated with Ki67 downexpression [10] and it is positively correlated with *GATA3* status, so it is expected that *GATA3* overexpression shows a significant correlation with Ki67 downexpression, as observed in this study. In agreement to these findings, [44] observed that there is a gradient of *GATA3* expression in the mammary gland, such that highly proliferative cells expressed low levels of this gene, whereas the nonproliferating (differentiated) population expressed high levels of *GATA3*. In addition, in the present study, *GATA3* downexpression was statistically associated with higher histologic grade, as described by [29, 45] demonstrated that *GATA3* expression correlated with a subset of genes considered important in breast luminal epithelial cell biology, including *LIV-1*, *REERG* and *TFF3*. Similarly, the present data revealed that *GATA3* expression was also correlated to *REERG* expression ($P < 0.001$, $r = 0.7857$; data not shown).

REERG (ras-related and estrogen-regulated growth inhibitor) gene is a novel ras-related gene that was recently identified, and its expression was correlated with a favorable prognosis for breast cancer patients. *REERG* expression was associated with a high degree of correlation with ESR in both breast tissue-derived cell lines and primary tumors and it may function as a negative growth regulator in breast epithelial cells [46]. In agreement, a negative correlation was detected between proliferation status and *REERG* expression in this study, and although no significant, a lower expression of *REERG* transcript was detected in grade III tumors, confirming the favorable prognosis in cases showing high expression level of this gene.

CLAMP gene (calponin-homology and microtubule-associated protein) is associated with microtubules via its CH (calponin-homology) domain and represents a new member of the CH domain family that functions as a MAP (microtubule-associated protein). Microtubules, the polymerized form of α and β tubulins, mediate many cellular processes, including mitosis, motility, intracellular transport, and also contribute to overall shape and structural stability of cells [39]. To our knowledge it is the first time that *CLAMP* expression is detected in normal and tumor breast tissue. Other tissues, including, brain, lung and testis were confirmed as expressing this gene by Northern and Western blot methodologies [39]. A negative correlation was noted, in the present analysis, between the expression of this gene and Ki-67 status, and a presence of lower expression in younger patients. There are no previous studies correlating the clinicopathological significance of *CLAMP* in breast carcinomas.

AURKB (aurora kinase B) is a chromosome passenger protein localized in the inner centromere from late G2 through metaphase [47]. AURKB phosphorylates a number of mitotic protein substrates, most notably histone H3 for proper chromosome dynamics during mitosis. Thus, AURKB functions in condensation, segregation and cytokinesis by regulation microtubule kinetochore associations [48]. This gene plays a key role in the spindle assembly checkpoint and forms a tight complex with the two proteins: inner centromere protein (INCENP) and survivin (BIRC5). The activity of this complex is responsible for oncogenic Ras-mediated cell transformation and lead to an accelerated growth of tumor [49,50]. In our study was observed a positive correlation between *AURKB* and *BIRC5* expression ($P < 0.0001$, $r = 0.7236$; data not shown). When the *AURKB* expression was compared to Ki-67 status, a positive statistically correlation was observed. In agreement with these results, Chieffi et al. [51] and Qi et al. [52] found a positive correlation with proliferation rate in prostate cell line and in oral squamous cell carcinomas, respectively. Qi et al. [52] observed a higher average of AURKB positive cells in poorly differentiated than well differentiated carcinomas, as noted in the present study. The *AURKB* and *CLAMP* genes were differentially expressed in both clusters (ESR1 and PGR) and are associated with cell cycle,

indicating that the expression of these genes is correlated with cell proliferation in breast carcinomas.

UBE2C gene belongs to the *E2* gene family and codes for a protein of 19.6 kDa that is involved in the ubiquitin-dependent proteolysis [53, 54]. The cyclin A degradation is highly sensitive to the concentration of *UBE2C*, and self-degradation of *UBE2C* is an autonomous sensor of mitotic completion and provides the molecular switch that allows cells to proceed from DNA segregation and cell division to a new round of DNA duplication [55, 56]. Okamoto et al. [57] evaluated the expression of *UBE2C* in 25 different human normal tissues and 24 human cancerous cell lines, including breast cancer, using qRT-PCR. The authors found that *UBE2C* was highly expressed in numerous cancerous cell lines and various primary tumors as compared with matched normal tissues, suggesting that its up-regulation contributes to the occurrence or progression of tumors. Although no significant, in the present study, was observed a correlation between *UBE2C* overexpression and higher grade tumors ($P=0.0712$). Alexe et al. [37] evaluated breast cancer samples by microarray analysis and found *UBE2C* gene among the top markers upregulated in high grade tumors. Literature data showed that the presence of the *UBE2C* siRNA blocked the *UBE2C* expression and inhibited ovarian and hepatocellular carcinoma cells growth [58, 59]. Similarly to Berlingieri et al. [58], our results showed a positive correlation between *UBE2C* expression and Ki-67 status, suggesting that this gene is a negative predictor of clinical outcome. Among the validation set samples, only one case presented metastasis and a *UBE2C* high expression level was observed compared to the other cases (RQ=12.13 versus median RQ=6.59, respectively). In addition, six cases presented higher expression levels (RQ>10.00), from these four cases have from 36 to 52 months of follow-up. Considering that the current investigation was based on only a small number of tumors, principally those that developed metastasis, and a short term follow-up, further study will be required to evaluate this association.

Human *GTSE1* present a physical interaction between the C-terminal regulatory domain of p53 and the C-terminal region of *GTSE1* that is necessary and sufficient to down-regulate p53 activity [38]. After DNA damage, *GTSE1* could play a dual role during the G2

checkpoint, promoting the delay of G2 to M transition and protecting, at the same time, these cells from p53-dependent apoptosis. Ki-67 status was positively correlated with *GTSE1* expression level ($P=0.0387$), but no negative correlation was found between *GTSE1* expression level and p53 status, by immunohistochemistry ($P=0.3676$, data not shown). In addition, *GTSE1* overexpression was statistically associated with higher histologic grade ($P=0.0371$).

BIRC5 (Survivin or Baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing protein 5) is a member of the *IAP* gene family, which has been implicated in both inhibition of apoptosis and mitosis regulation [60]. It has been suggested that nuclear expression in breast cancer is correlated with favorable prognosis, while cytoplasmic expression is correlated with unfavorable prognosis [61- 63]. However, survivin high expression in the primary tumor is almost invariably associated with poor patient prognosis in many cancer types (reviewed in [64]). It was detected a marginally statistical correlation between *BIRC5* expression and Ki-67 status and none association with clinicopathologic data was observed in validation set. However, when the samples were divided in two groups (grade I versus II and III) it was observed a marginal significance ($P=0.0646$, data not shown). High level of survivin transcript was significantly associated with high grade [64-65].

The oligoarrays analysis findings comparing gene expression level with Ki-67 status were validated by qRT-PCR. In addition, qRT-PCR results showed a statistical correlation between histological grade and *GATA3*, *AURKB*, and *GTSE1* genes expression. These data corroborated with the function of these genes in increasing the proliferative cells rate and revealed potential biomarkers involved in breast carcinogenesis.

5. References

- [1] Sørlie T, Perou CM, Fan C, Geisler S, Aas T, Nobel A, Anker G, Akslen LA, Botstein D, Børresen-Dale AL, Lønning PE. Gene expression profiles do not consistently predict the clinical treatment response in locally advanced breast cancer. *Mol Cancer Ther* 2006;5:2914-2918.

- [2] Esteva FJ, Hortobagyi GN. Prognostic molecular markers in early breast cancer. *Breast Cancer Res* 2004;6:109-118.
- [3] Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol* 2006;59:225-31.
- [4] Rhodes A, Jasani B, Barnes DM, Bobrow LG, Miller KD. Reliability of immunohistochemical demonstration of oestrogen receptors in routine practice: interlaboratory variance in the sensitivity of detection and evaluation of scoring systems. *J Clin Pathol* 2000;53:125-30.
- [5] Whitfield EJ, Pruess M, Apweiler R. Bioinformatics database infrastructure for biotechnology research. *J Biotechnol* 2006;124:629-639.
- [6] Colozza M, Azambuja E, Cardoso F, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart MJ. Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now? *Ann Oncol* 2005;16:1723-39.
- [7] Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol* 1984;133:1710-1715.
- [8] Offersen BV, Sørensen FB, Knoop A, Overgaard J, Danish Breast Cancer Cooperative Tumour Biology Committee. The prognostic relevance of estimates of proliferative activity in early breast cancer. *Histopathology* 2003;43:573-582.
- [9] Tan P-H, Bay B-H, Yip G, Selvarajan S, Tan P, Wu J, Lee CH, Li KB. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. *Mod Pathol* 2005;18:374-381.
- [10] Rosa FE, Caldeira JRF, Felipes J, Bertonha FB, Quevedo FC, Domingues MAC, Moraes Neto FA, Rogatto SR. Evaluation of estrogen receptor alpha and beta and progesterone receptor expression and correlation with clinicopathological factors and proliferative marker Ki-67 in breast cancers. *Hum Pathol* 2007 (*in press*).
- [11] Molino A, Pedersini R, Micciolo R, Frisinghelli M, Giovannini M, Pavarana M, Nortilli R, Santo A, Manno P, Padovani M, Piubello Q, Cetto GL. Relationship between the thymidine labeling and Ki-67 proliferative indices in 126 breast cancer patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 2002;10:304-309.

- [12] Burcombe RJ, Makris A, Richman PI, Daley FM, Noble S, Pittam M, Wright D, Allen SA, Dove J, Wilson GD. Evaluation of ER, PgR, HER-2 and Ki-67 as predictors of response to neoadjuvant anthracycline chemotherapy for operable breast cancer. *Br J Cancer* 2005;92:147-155.
- [13] Jarzabek K, Koda M, Kozłowski L, Mittre H, Sulkowski S, Kottler ML, Wolczynski S. Distinct mRNA, protein expression patterns and distribution of estrogen receptors α and β in human primary breast cancer: correlation with proliferative marker Ki-67 and clinopathological factors. *Eur J Cancer* 2005;41:2924-2934.
- [14] Ding SL, Sheu L-F, Yu J-C, Yang TL, Chen B, Leu FJ, Shen CY. Expression of estrogen Receptor- α and Ki67 in relation to pathological and molecular features in early-onset infiltrating ductal carcinoma. *J Biomed Sci* 2004;11:911-919.
- [15] Assersohn L, Salter J, Powles TJ, A'hern R, Makris A, Gregory RK, Chang J, Dowsett M. Studies of the potential utility of Ki67 as a predictive molecular marker of clinical response in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2003;82:113-123.
- [16] de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G Jr, Colozza M, Mano MS, Durbecq V, Sotiriou C, Larsimont D, Piccart-Gebhart MJ, Paesmans M. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *Br J Cancer* 2007;96:1504-1513.
- [17] Perou CM, Jeffrey SS, Van De Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, Pergamenschikov A, Williams CF, Zhu SX, Lee JC, Lashkari D, Shalon D, Brown PO, Botstein D. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96:9212-9217.
- [18] WHO World Healthy Organization: International Classification of Diseases for Oncology, 2nd edn. World Healthy Organization, Geneva, 1990.
- [19] UICC União Internacional Contra o Câncer: Classificação dos tumores malignos, 5ª ed. Ministério da saúde, Rio de Janeiro – Brasil, 1998.
- [20] Bloom MJC, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1709 cases. *BRJ Cancer* 1957;11:358-377.
- [21] Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, Coller H, Loh ML, Downing JR, Caligiuri MA, Bloomfield CD, Lander ES. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science* 1999;286:531-537.

- [22] Reis EM, Nakaya HI, Louro R, Canavez FC, Flatschart AV, Almeida GT, Egidio CM, Paquola AC, Machado AA, Festa F, Yamamoto D, Alvarenga R, Da Silva CC, Brito GC, Simon SD, Moreira-Filho CA, Leite KR, Camara-Lopes LH, Campos FS, Gimba E, Vignal GM, El-Dorry H, Sogayar MC, Barcinski MA, Da Silva AM, Verjovski-Almeida S. Antisense intronic non-coding RNA levels correlate to the degree of tumor differentiation in prostate cancer. *Oncogene* 2004;23:6684-6692.
- [23] Van 'T Veer LJ, Dai H, Van De Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, Peterse HL, Van Der Kooy K, Marton MJ, Witteveen AT, Schreiber GJ, Kerkhoven RM, Roberts C, Linsley PS, Bernards R, Friend SH. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002;415:530-536.
- [24] Weikel W, Beck T, Mitze M, Knapstein PG. Immunohistochemical evaluation of growth fractions in human breast cancers using monoclonal antibody Ki-67. *Breast Cancer Res Treat* 1991;18:149-154.
- [25] Nilsson S, Mäkelä S, Treuter E, Tujague M, Thomsen J, Andersson G, Enmark E, Pettersson K, Warner M, Gustafsson JA. Mechanisms of estrogen action. *Physiol Rev* 2001;81:1535-1565.
- [26] Schneider J, Ruschhaupt M, Buness A, Asslaber M, Regitnig P, Zatloukal K, Schippinger W, Ploner F, Poustka A, Sültmann H. Identification and meta-analysis of a small gene expression signature for the diagnosis of estrogen receptor status in invasive ductal breast cancer. *Int J Cancer* 2006;119:2974-9.
- [27] Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, Van De Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Eystein Lønning P, Børresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-10874.
- [28] Bertucci F, Nasser V, Houlgatte R, Birnbaum D. Gene expression profiling using cDNA arrays and prognosis of breast cancer. *Bull Cancer* 2002;89:571-574.
- [29] Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:8418-8423.

- [30] 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 Res* 2005;65:2170-2178.
- [31] Doane AS, Danso M, Lal P, Donaton M, Zhang L, Hudis C, Gerald WL. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. *Oncogene* 2006;25:3994-4008.
- [32] Perreard L, Fan C, Quackenbush JF, Mullins M, Gauthier NP, Nelson E, Mone M, Hansen H, Buys SS, Rasmussen K, Orrico AR, Dreher D, Walters R, Parker J, Hu Z, He X, Palazzo JP, Olopade OI, Szabo A, Perou CM, Bernard PS. Classification and risk stratification of invasive breast carcinomas using a real-time quantitative RT-PCR assay. *Breast Cancer Res* 2006;8:R23.
- [33] Tozlu S, Girault I, Vacher S, Vendrell J, Andrieu C, Spyrtos F, Cohen P, Lidereau R, Bieche I. Identification of novel genes that co-cluster with estrogen receptor alpha in breast tumor biopsy specimens, using a large-scale real-time reverse transcription-PCR approach. *Endocr Relat Cancer* 2006;13:1109-1120.
- [34] Dairkee SH, Ji Y, Ben Y, Moore DH, Meng Z, Jeffrey SS. A molecular 'signature' of primary breast cancer cultures; patterns resembling tumor tissue. *BMC Genomics* 2004;5:47.
- [35] Bertucci F, Houlgatte R, Benziene A, Granjeaud S, Adélaïde J, Tagett R, Loriod B, Jacquemier J, Viens P, Jordan B, Birnbaum D, Nguyen C. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet* 2000;9:2981-2991.
- [36] Hannemann J, Velds A, Halfwerk JB, Kreike B, Peterse JL, van de Vijver MJ. Classification of ductal carcinoma in situ by gene expression profiling. *Breast Cancer Res* 2006;8:R61.
- [37] Alexe G, Dalgin GS, Ganesan S, Delisi C, Bhanot G. Analysis of breast cancer progression using principal component analysis and clustering. *J Biosci* 2007;32:1027-1039.
- [38] Monte M, Benetti R, Buscemi G, Sandy P, Del Sal G, Schneider C. The cell cycle-regulated protein human GTSE-1 controls DNA damage-induced apoptosis by affecting p53 function. *J Biol Chem* 2003;278:30356-30364.
- [39] Dougherty GW, Adler HJ, Rzadzinska A, Gimona M, Tomita Y, Lattig MC, Merritt RC Jr, Kachar B. CLAMP, a novel microtubule-associated protein with EB-type calponin homology. *Cell Motil Cytoskeleton* 2005;62:141-156.
- [40] Orkin SH. GATA-binding transcription factors in hematopoietic cells. *Blood* 1992;80:575-581.

- [41] Ko LJ, Engel JD. DNA-binding specificities of the GATA transcription factor family. *Mol Cell Biol* 1993;13:4011-4022.
- [42] Hoch RV, Thompson DA, Baker RJ, Weigel RJ. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. *Int J Cancer* 1999;84:122-128.
- [43] Eeckhoute J, Keeton EK, Lupien M, Krum SA, Carroll JS, Brown M. Positive cross-regulatory loop ties GATA-3 to estrogen receptor alpha expression in breast cancer. *Cancer Res* 2007;67:6477-6483.
- [44] Kouros-Mehr H, Slorach EM, Sternlicht MD, Werb Z. GATA-3 maintains the differentiation of the luminal cell fate in the mammary gland. *Cell* 2006;127:1041-1055.
- [45] Mehra R, Varambally S, Ding L, Shen R, Sabel MS, Ghosh D, Chinnaiyan AM, Kleer CG. Identification of GATA3 as a breast cancer prognostic marker by global gene expression meta-analysis. *Cancer Res* 2005;65:11259-11264.
- [46] Finlin BS, Gau CL, Murphy GA, Shao H, Kimel T, Seitz RS, Chiu YF, Botstein D, Brown PO, Der CJ, Tamanoi F, Andres DA, Perou CM. RERG is a novel ras-related, estrogen-regulated and growth-inhibitory gene in breast cancer. *J Biol Chem* 2001;276:42259-42267.
- [47] Adams RR, Carmena M, Earnshaw WC. Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis. *Trends Cell Biol* 2001;11:49-54.
- [48] Li JJ, Li SA. Mitotic kinases: the key to duplication, segregation, and cytokinesis errors, chromosomal instability, and oncogenesis. *Pharmacol Ther* 2006;111:974-984.
- [49] Kanda A, Kawai H, Suto S, Kitajima S, Sato S, Takata T, Tatsuka M. Aurora-B/AIM-1 kinase activity is involved in Ras-mediated cell transformation. *Oncogene* 2005;24:7266-7272.
- [50] Temme A, Diestelkoetter-Bachert P, Schmitz M, Morgenroth A, Weigle B, Rieger MA, Kiessling A, Rieber EP. Increased p21(ras) activity in human fibroblasts transduced with survivin enhances cell proliferation. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;327:765-773.
- [51] Chieffi P, Cozzolino L, Kisslinger A, Libertini S, Staibano S, Mansueto G, De Rosa G, Villacci A, Vitale M, Linardopoulos S, Portella G, Tramontano D. Aurora B expression directly correlates with prostate cancer malignancy and influence prostate cell proliferation. *Prostate* 2006;66:326-333.
- [52] Qi G, Ogawa I, Kudo Y, Miyauchi M, Siriwardena BS, Shimamoto F, Tatsuka M, Takata T. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Arch* 2007;450:297-302.

- [53] Hershko A, Ciechanover A. The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 1998;67:425-479.
- [54] Joazeiro CA, Weissman AM. RING finger proteins: mediators of ubiquitin ligase activity. *Cell* 2000;102:549-552.
- [55] Rape M, Kirschner MW. Autonomous regulation of the anaphase-promoting complex couples mitosis to S-phase entry. *Nature* 2004;432:588-595.
- [56] Lukas C, Bartek J, Lukas J. Imaging of protein movement induced by chromosomal breakage: tiny 'local' lesions pose great 'global' challenges. *Chromosoma* 2005;114:146-154.
- [57] Okamoto Y, Ozaki T, Miyazaki K, Aoyama M, Miyazaki M, Nakagawara A. UbcH10 is the cancer-related E2 ubiquitin-conjugating enzyme. *Cancer Res* 2003;63:4167-4173.
- [58] Berlingieri MT, Pallante P, Guida M, Nappi C, Masciullo V, Scambia G, Ferraro A, Leone V, Sboner A, Barbareschi M, Ferro A, Troncone G, Fusco A. UbcH10 expression may be a useful tool in the prognosis of ovarian carcinomas. *Oncogene* 2007;26:2136-2140.
- [59] Ieta K, Ojima E, Tanaka F, Nakamura Y, Haraguchi N, Mimori K, Inoue H, Kuwano H, Mori M. Identification of overexpressed genes in hepatocellular carcinoma, with special reference to ubiquitin-conjugating enzyme E2C gene expression. *Int J Cancer* 2007;121:33-38.
- [60] Altieri DC. Validating survivin as a cancer therapeutic target. *Nat Rev Cancer* 2003;3:46-54.
- [61] Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2000;6:127-134.
- [62] Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, Fitz-Simons N, McDermott EW, Hill AD, O'Higgins NJ, Parkinson M, Linehan R, Clynes M. Prognostic importance of survivin in breast cancer. *Br J Cancer* 2003;88:1077-1083.
- [63] Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Hasnan J, Rusli J, Kamal Y, Imran AK, Ahmed M, Zakaria J. Expression of survivin and its clinicopathological correlations in invasive ductal carcinoma of the breast. *Singapore Med J* 2007;48:607-614.
- [64] Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, Tjan-Heijnen VC, Manders P, Beex LV, de Kok JB. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. *Clin Chem* 2004;50:1986-1993.
- [65] Kostadima L, Pentheroudakis G, Fountzilas G, Dimopoulos M, Pectasides D, Gogas H, Stropp U, Christodoulou C, Samantas E, Wirtz R, Hennig G, Bafaloukos D, Arapantoni P, Kalofonos H, Papakostas P, Economopoulos T, Bamias A, Pavlidis N. Survivin and glycodefin transcriptional

activity in node-positive early breast cancer: mRNA expression of two key regulators of cell survival. *Breast Cancer Res Treat* 2006;100:161-167.

Table 1. Clinical and pathological characteristics of the breast samples.

Variables	Number of patients (%)
Age	
≤50	21 (33.3)
>50	42 (66.7)
Familial History of Cancer	
Yes	15 (23.8)
No	48 (76.2)
Histologic type	
Infiltrating ductal	59 (93.7)
Infiltrating lobular	4 (6.3)
Lymph node status	
Negative	25 (39.7)
Positive	38 (60.3)
Tumour Size (cm)	
0 – 2	18 (28.6)
>2 - 5	41 (65.1)
>5	3 (4.8)
Nd	1 (1.5)
Clinical Stage	
I	11 (17.5)
IIA	20 (31.7)
IIB	21 (33.3)
IIIA	2 (3.2)
IIIB	9 (14.3)
Histological grade	
I	8 (12.7)
II	24 (38.1)
III	27 (42.9)
Nd	4 (6.3)
S phase	
Low (≤ 25%)	36 (57.1)
High (> 25%)	27 (42.9)

Nd: not determined.

Table 2. Genes differentially expressed in ESR1 cluster (68 sequences), grouped in Ki-67 status $\leq 25\%$ and $>25\%$. Information includes unigene code, gene symbol, molecular function, cytoband, and description of the sequences.

UniGene	Gene Symbol	Molecular Function	Cytoband	Description
Ki-67 $\leq 25\%$				
Hs.61638	MYO10	motor activity, actin binding, ATP binding	5p15.1-p14.3	myosin X
Hs.62264	DTX4	metal ion binding, protein binding, zinc ion binding	11q12.2	deltex 4 homolog (Drosophila)
Hs.77311	BTG3	nd	21q21.1-q21.2	BTG family, member 3
Hs.100691	EST	nd	nd	nd
Hs.207481	nd	nd	nd	nd
Hs.159651	TNFRSF21	receptor activity	6p21.1-12.2	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
Hs.173162	COX4NB (NOC4)	nd	16q24	neighbor of COX4
Hs.371841	EST	nd	10p13	nd
Hs.520455	nd	nd	nd	nd
Hs.442658	AURKB	protein serine/threonine kinase activity, protein binding, ATP binding, transferase activity, nucleotide binding	17p13.1	aurora kinase B
Hs.449009	VWA1	nd	1p36.33	von Willebrand factor A domain containing 1
Hs.56145	TMSL8 (TMSNB)	actin binding	Xq21.33-q22.3	thymosin, beta, identified in neuroblastoma cells
Hs.513743	nd	nd	16q23.1	nd
Hs.415762	LY6D	protein binding	8q24-qter	lymphocyte antigen 6 complex, locus D
Hs.14449	KIAA1609	nd	16q24.1	hypothetical protein
Hs.4302	SLC29A4	nucleoside transmembrane transporter activity	7p22.1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4
Hs.355835	EST	nd	16q22.1	nd
Hs.416456	FN5 (C11orf75)	nd	11q13.3-q23.3	FN5 protein, chromosome 11 open reading frame 75
Hs.282557	CP	ferroxidase activity, copper ion transporter activity, copper ion binding, oxidoreductase activity	3q23-q25	ceruloplasmin (ferroxidase)
Hs.434975	RELT	receptor activity	11q13.4	RELT tumor necrosis factor receptor
Hs.301921	CCR1	rhodopsin-like receptor activity, C-C chemokine receptor activity	3p21	chemokine (C-C motif) receptor 1
Hs.49932	C21orf45	nd	21q22.11	chromosome 21 open reading frame 45
Hs.3416	ADFP	nd	9p22.1	adipose differentiation-related protein
Hs.2393	PHKA1	phosphorylase kinase activity, catalytic activity, calmodulin binding, kinase activity, phosphorylase kinase regulator activity	Xq12-q13	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
Hs.198363	MCM10	metal ion binding, protein binding, zinc ion binding	10p13	minichromosome maintenance deficient 10 (S cerevisiae), transcript variant 2
Hs.438462	MT1H	metal ion binding, cadmium ion binding, copper ion binding, protein binding, zinc ion binding	16q13	metallothionein 1H
Hs.528329	UBXD4	nd	2p23.3	UBX domain containing 4
Ki-67 $>25\%$				
Hs.121820	nd	nd	nd	nd
Hs.72620	SPEF1 (C20orf 28)	nd	20pter-q11.23	sperm flagellar 1, chromosome 20 open reading frame 28
Hs.311208	EST	nd	16p13.3	nd
Hs.102406	MLPH	Rab GTPase binding, actin binding, microtubule plus-end binding, myosin V binding	2q37.3	melanophilin
Hs.162309	EST	nd	nd	nd
Hs.144151	hCG25653	nd	10p11.21	hypothetical protein
Hs.36567	CCDC24	nd	1p34.1	coiled-coil domain containing 24
Hs.444414	AFF3	DNA binding	2q11.2-q12	AF4/FMR2 family, member 3
Hs.280878	ERBB4	protein heterodimerization activity, receptor activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)

Hs.283853	THSD4	metalloendopeptidase activity, peptidase activity	15q23	thrombospondin, type I, domain containing 4
Hs.8036	EST	nd	19p13.2	nd
Hs.118918	SLC25A35	binding, transporter activity	17p13.1	Solute carrier family 25, member 25
Hs.132701	CCDC11	nd	18q21.1	coiled-coil domain containing 11
Hs.371949	EST	nd		nd
Hs.443740	EST	nd	11q23.1	nd
Hs.7888	ERBB4	protein heterodimerization activity, receptor activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
Hs.169333	TIGD6	DNA binding	5q33.1	tigger transposable element derived 6
Hs.387057	THSD4	metalloendopeptidase activity, peptidase activity	15q23	thrombospondin, type I, domain containing 4
Hs.38070	EST	nd	2q11.2-q12	nd
Hs.27373	LOC400451	nd	15q26.1	hypothetical gene
Hs.13211	EST	nd	nd	nd
Hs.125352	EST	nd	nd	nd
Hs.201134	TTC25	nd	17q21.2	hypothetical protein
Hs.116301	EST	nd		nd
nd	ERBB4	protein heterodimerization activity, receptor activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
Hs.411317	TBC1D9	GTPase activator activity, activator activity, calcium ion binding	4q31.1	TBC1 domain family, member 9 (with GRAM domain)
Hs.351875	COX6C	cytochrome-c oxidase activity, oxidoreductase activity	8q22-q23	cytochrome c oxidase subunit VIc
Hs.23729	EST	nd	nd	nd
Hs.88417	SUSD3	nd	9q22.31	sushi domain containing 3
Hs.72050	NME5	nucleoside-diphosphate kinase activity, ATP binding	5q31	non-metastatic cells 5, protein expressed in (nucleoside-diphosphate kinase)
Hs.416854	RERG	GTPase activity, GTP binding, GDP binding, estrogen receptor binding	12p12.3	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor
Hs.524134	GATA3	transcription factor activity	10p15	GATA binding protein 3, transcript variant 1
Hs.446354	TCEA3	DNA binding, RNA polymerase II transcription factor activity, metal ion binding, translation elongation factor activity, zinc ion binding	1p36.12	transcription elongation factor A (SII), 3
Hs.281351	EST	nd	nd	nd
Hs.406684	EST	nd	2q21-q23	nd
Hs.260720	DNAJC12	chaperone activity	10q22.1	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 12, transcript variant 1
Hs.355232	EST	nd	16p13.3	nd
Hs.278408	TREX1	magnesium ion binding, single-stranded DNA binding, 3-5 exonuclease activity, exodeoxyribonuclease III activity, hydrolase activity, protein homodimerization activity	3p21.31	three prime repair exonuclease 1, transcript variant 1
Hs.7888	ERBB4	protein heterodimerization activity, receptor activity, transmembrane receptor protein tyrosine kinase activity	2q33.3-q34	v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4 (avian)
Hs.281901	EST	nd		nd
nd	EST	nd		nd

nd: not determined.

Table 3. Genes differentially expressed in PGR cluster (83 sequences), grouped in Ki-67 status $\leq 25\%$ and $>25\%$. Information includes unigene code, gene symbol, molecular function, cytoband, and description of the sequences.

UniGene	Gene	Molecular Function	Cytoband	Description
Ki-67 $\leq 25\%$				
Hs.36567	CCDC24	nd	1p34.1	coiled-coil domain containing 24
Hs.292692	nd	nd	nd	nd
Hs.8036	EST	nd	19p13.2	nd
Hs.411081	FGD3	zinc ion binding, small GTPase binding	9q22	FGD1 family, member 3
Hs.335524	C6orf85	ion transporter	6p25.2	chromosome 6 open reading frame 85
Hs.144151	hCG25653	nd	10p11.21	hypothetical protein
Hs.132449	EST	nd	nd	nd
Hs.132701	CCDC11	nd	18q21.1	coiled-coil domain containing 11
Hs.283417	EST	nd	nd	nd
Hs.387057	THSD4	metalloendopeptidase activity, peptidase activity	15q23	thrombospondin, type I, domain containing 4
Hs.29190	C1orf64	nd	1p36.13	hypothetical protein
Hs.71968	IL6ST	receptor activity, interleukin-6 receptor activity, oncostatin-M receptor activity, protein binding	5q11	interleukin 6 signal transducer (gp130, oncostatin M receptor), transcript variant 1
Hs.371949	EST	nd	nd	nd
Hs.412022	ABHD2	catalytic activity, hydrolase activity,	15q26.1	abhydrolase domain containing 2
Hs.74120	EST	nd	10q23.2	nd
Hs.118918	SLC25A35	binding, transporter activity	17p13.1	Solute carrier family 25, member 25
Hs.116465	EST	nd	16q12.2	nd
Hs.167380	ZMYND10 ou BLU	metal ion binding, protein binding, zinc ion binding	3p21.3	zinc finger, MYND domain containing 10
Hs.352591	FANK1	nd	10q26.2	fibronectin type 3 and ankyrin repeat domains 1
Hs.336403	nd	nd	nd	nd
Hs.154918	EST	nd	11q22.1	nd
Hs.32405	EST	nd	11q22.1	nd
Hs.162143	ERP27	isomerase activity	12p12.3	hypothetical protein
Hs.351344	TMEM25	nd	11q23.3	transmembrane protein 25
Hs.133152	EST	nd	11q24.3	nd
Hs.88417	SUSD3	nd	9q22.31	sushi domain containing 3
Hs.171168	EST	nd	nd	nd
Hs.21492	PIB5PA	hydrolase activity, inositol-polyphosphate 5-phosphatase activity, inositol/phosphatidylinositol phosphatase activity	22q11.2-q13.2	phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate 5-phosphatase, A
Hs.159643	DEGS2	oxidoreductase activity, oxidoreductase activity, acting on paired donors, with oxidation of a pair of donors resulting in the reduction of molecular oxygen to two molecules of water	14q32.2	degenerative spermatocyte homolog 2, lipid desaturase (Drosophila)
Hs.443740	EST	nd	11q23.1	nd
Hs.177557	Hypothetical protein	nd	15q26.1	hypothetical protein
Hs.72620	SPEF1 (C20orf28)	nd	20pter-q11.23	chromosome 20 open reading frame 28
Ki-67 $>25\%$				
Hs.378501	TSEN54	nd	17q25.1	hypothetical protein
Hs.66378	EST	nd	10q23.32	nd
Hs.443014	ETS2	sequence-specific DNA binding, transcription factor activity	21q22.3; 21q22.2	v-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)
Hs.282700	EST	nd	nd	nd

Hs.448346	EST	nd	19q13.33	nd
Hs.115285	DLAT	dihydrolipoyllysine-residue acetyltransferase activity, protein binding, acyltransferase activity, transferase activity	11q23.1	dihydrolipoamide S-acetyltransferase (E2 component of pyruvate dehydrogenase complex)
Hs.24135	EST	nd	12q22	nd
Hs.1194	SLC6A6	taurine:sodium symporter activity, symporter activity, beta-alanine transmembrane transporter activity	3p25-p24	solute carrier family 6 (neurotransmitter transporter, taurine), member 6
Hs.407115	RAD51	ATP binding, ATPase activity, double-stranded DNA binding, single-stranded DNA binding	15q15.1	RAD51 homolog (RecA homolog, E. coli) (S. cerevisiae)
Hs.22315	CREB1	transcription factor activity, transcription cofactor activity, protein binding, sequence-specific DNA binding	2q34	cAMP responsive element binding protein 1, transcript variant A
Hs.387385	EST	nd	17q24.1	nd
Hs.440695	KBTBD4	protein binding	11p11.2	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4, transcript variant 1
Hs.438882	EST	nd	nd	nd
Hs.526858	nd	nd	nd	nd
Hs.342274	EST	nd	1p22.3	nd
Hs.38363	EST		6q21	full length insert cDNA clone YU07D12
nd	nd	nd	nd	INCYTE UNIQUE
Hs.371841	EST	nd	10p13	nd
Hs.159651	TNFRSF21	receptor activity	6p21.1-12.2	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 21
Hs.100691	EST	nd	nd	nd
Hs.158665	LYNX1	GPI anchor binding	8q24.3	Ly6/neurotoxin 1
Hs.82933	EST	nd	1p13.3	nd
Hs.320834	ZNRF1	ligase activity, metal ion binding, protein binding, zinc ion binding	16q23.1	zinc and ring finger protein 1
Hs.155109	HSD17B2	estradiol 17-beta-dehydrogenase activity, oxidoreductase activity	16q24.1-q24.2	hydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2
Hs.355835	nd	16q22.1	nd	nd
Hs.16244	SPAG5	nd	17q11.2	sperm associated antigen 5
Hs.528329	UBXD4	nd	2p23.3	UBX domain containing 4
Hs.11806	DHCR7	oxidoreductase activity, 7-dehydrocholesterol reductase activity, protein binding	11q13.2-q13.5	7-dehydrocholesterol reductase
Hs.93002	UBE2C	ubiquitin conjugating enzyme activity, ubiquitin-protein ligase activity, ligase activity	20q13.12	ubiquitin-conjugating enzyme E2C, transcript variant 6
Hs.121028	ASPM	calmodulin binding	1q31	asp (abnormal spindle)-like, microcephaly associated (Drosophila)
Hs.656	CDC25C	protein tyrosine phosphatase activity, hydrolase activity	5q31	cell division cycle 25C, transcript variant 2
Hs.323032	STIL ou SIL	regulation of the mitotic spindle checkpoint	1q32	TAL1 (SCL) interrupting locus
Hs.383913	BLM	DNA binding, ATP-dependent DNA helicase activity, ATP binding, hydrolase activity	15q26.1	Bloom syndrome
Hs.442658	AURKB	protein serine/threonine kinase activity, protein binding, ATP binding, transferase activity, nucleotide binding	17p13.1	aurora kinase B
Hs.73239	C1orf106	nd	1q32.1	hypothetical protein
Hs.4302	SLC29A4	nucleoside transmembrane transporter activity	7p22.1	solute carrier family 29 (nucleoside transporters), member 4

Hs.153034	EST	nd	nd	nd
Hs.127286	OXR1	nd	8q23	nd
Hs.422848	MGC39900	actin binding	Xq22.2	hypothetical protein
Hs.173162	COX4NB	nd	16q24	neighbor of COX4
Hs.425125	STAG3	nd	7q22.1	nd
Hs.1578	BIRC5	cysteine protease inhibitor activity, microtubule binding, zinc ion binding, protease inhibitor activity, caspase inhibitor activity	17q25	baculoviral IAP repeat-containing 5 (survivin)
Hs.283532	CENPN	nd	16q23.2	centromere protein N
Hs.88523	C13orf3	nd	13q12.11	hypothetical protein
Hs.439524	GTSE1	nd	22q13.3-q13.3	G-2 and S-phase expressed 1
Hs.84113	CDKN3	phosphoprotein phosphatase activity, protein tyrosine/serine/threonine phosphatase activity, kinase activity, hydrolase activity	14q22	cyclin-dependent kinase inhibitor 3 (CDK2-associated dual specificity phosphatase)
Hs.2393	PHKA1	phosphorylase kinase activity, catalytic activity, calmodulin binding, kinase activity, phosphorylase kinase regulator activity	Xq12-q13	phosphorylase kinase, alpha 1 (muscle)
Hs.238679	RRAGD	GTP binding, nucleotide binding, protein binding	6q15-q16	Ras-related GTP binding D
Hs.434886	CDCA5	chromatin binding, protein binding	11q12.1	cell division cycle associated 5
Hs.69360	KIF2C	microtubule motor activity, ATP binding, centromeric DNA binding, nucleotide binding, protein binding	1p34.1	kinesin family member 2C
Hs.170114	POP1	ribonuclease MRP activity, ribonuclease P activity, hydrolase activity, identical protein binding	8q22.1	processing of precursor 1, ribonuclease P/MRP subunit (S. cerevisiae)

nd: not determined.

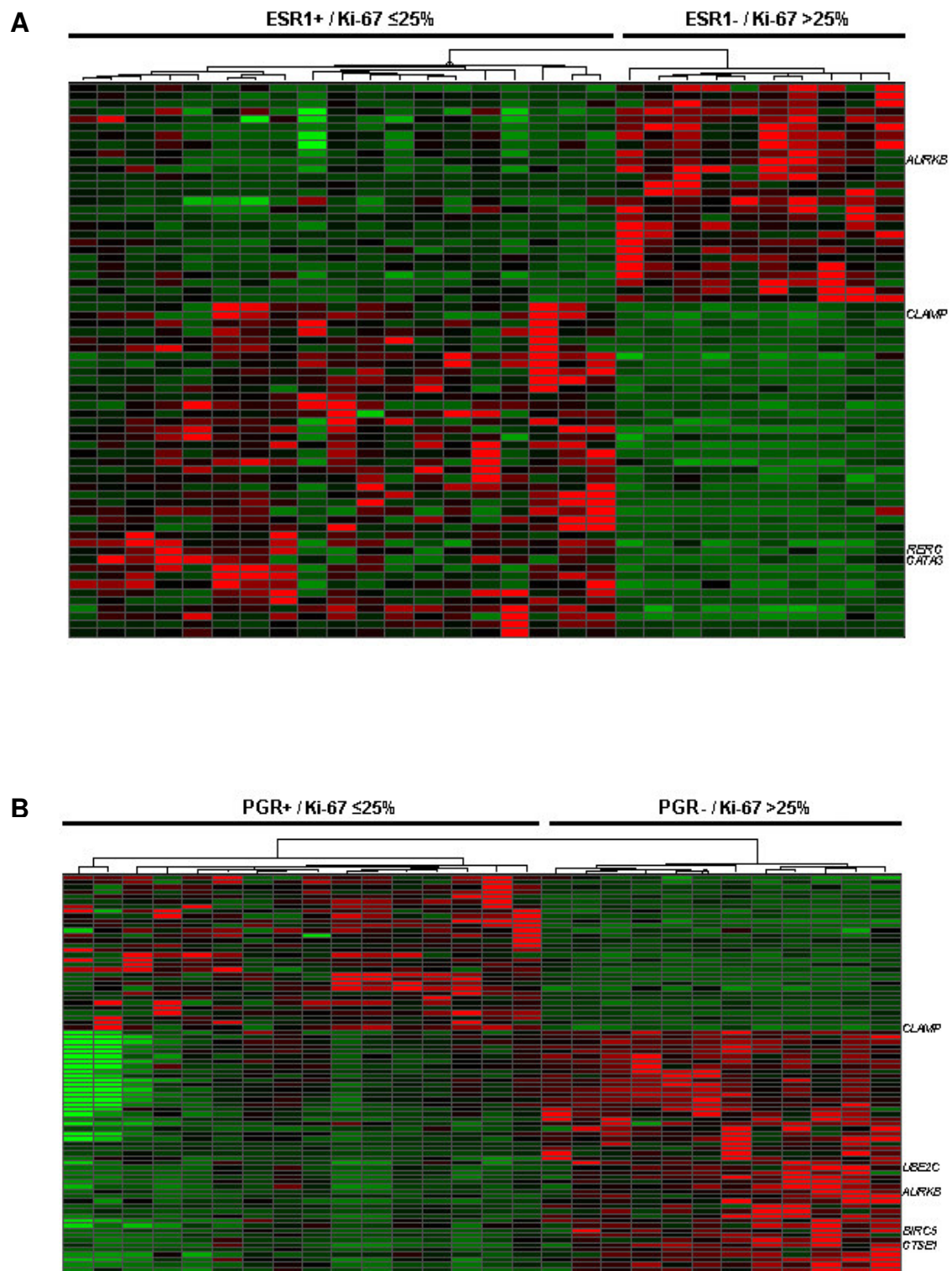


Figure 1. Supervised hierarchical clustering of 68 (A) and 83 (B) sequences in breast cancer samples. A) ESR1 cluster; B) PGR cluster. Hormonal receptors were distributed inversely to Ki-67 status. Individual genes are represented in lines and different samples are represented in rows. Genes showed at right were selected for validation set.

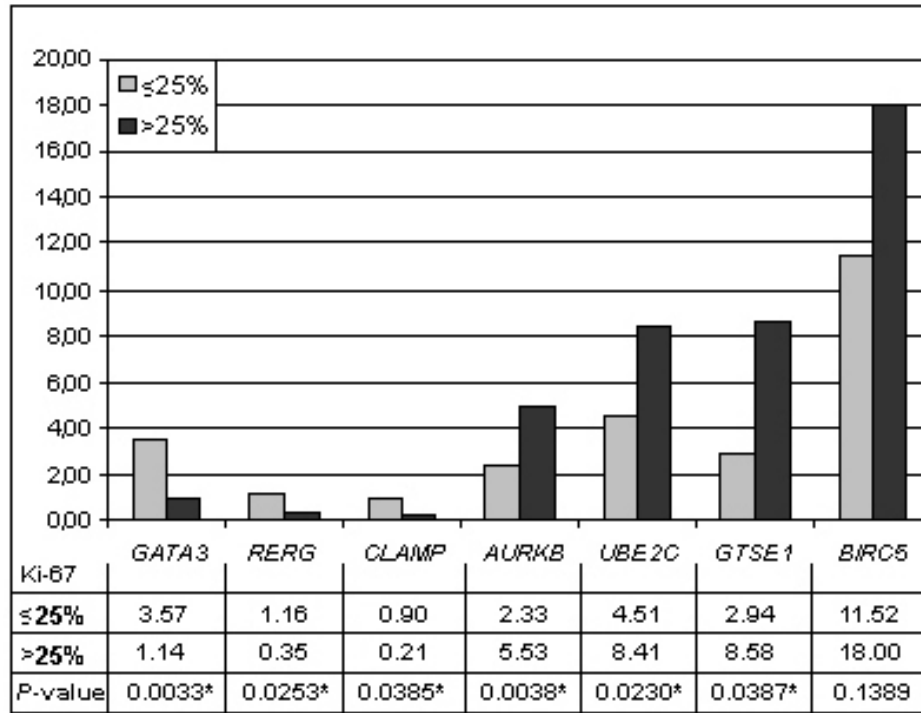


Figure 2. The relative expression median of the genes *GATA3*, *RERG*, *CLAMP*, *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1*, and *BIRC5* in comparison with Ki-67 status ($\leq 25\%$ and $> 25\%$). P values are shown. (*) significant value.

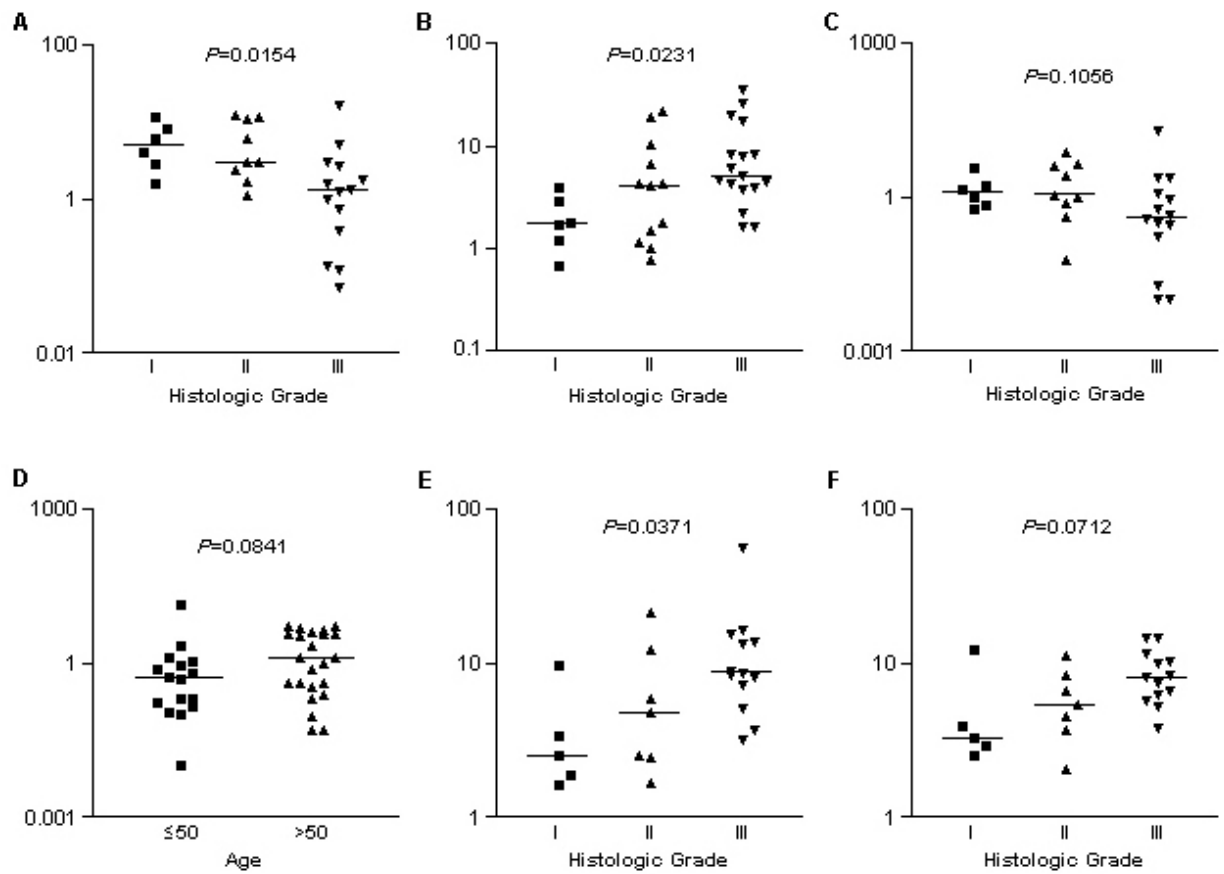


Figure 3. A, B and C) *GATA3*, *AURKB*, and *REERG* transcript level in association with histological grade, respectively. D) *CLAMP* expression in comparison with patients' age. E and F) *GTSE1* and *UBE2C* expression in comparison with histological grade, respectively. Bars indicate the median value. P values are shown.

Conclusão

O câncer de mama é uma doença complexa e clinicamente heterogênea. Apesar do grande esforço para encontrar marcadores biológicos preditivos e prognósticos, até o momento, poucos são utilizados na rotina clínica, como os genes *ESR1*, *PGR* e o *HER-2*. Assim, a compreensão das vias biológicas alteradas e o delineamento de novos marcadores são fatores importantes para o tratamento de pacientes com o carcinoma mamário.

Os resultados obtidos por nosso estudo mostraram que:

- o grau histológico e o nível de Ki-67 estão associados negativamente com os níveis de expressão gênica e protéica dos genes *ESR1* e *PGR*, sugerindo o envolvimento destes receptores em tumores bem diferenciados e menos diretamente com a proliferação celular;
- a expressão protéica elevada do *ESR2* foi correlacionada com ausência de acometimento de linfonodos, indicando que o *ESR2* pode ser um marcador prognóstico em câncer de mama humano;
- a avaliação do padrão do *HER-2* pode ser realizada pelas metodologias de qRT-PCR e CISH, baseado na alta concordância encontrada entre estes procedimentos;
- uma correlação significativa foi encontrada entre a baixa expressão gênica do *HER-2* e o envolvimento de menos que quatro linfonodos, confirmando os dados em literatura que apontam este receptor como um marcador prognóstico;
- a análise de *microarray* comparando a expressão protéica e gênica dos receptores hormonais (*ESR1* e *PGR*) com o índice de proliferação celular, Ki-67, identificou a expressão diferencial de vários genes, incluindo *GATA3*, *REG*, *CLAMP*, *AURKB*, *UBE2C*, *GTSE1* e *BIRC5*;
- a expressão diminuída dos genes *GATA3*, *REG* e *CLAMP* e a elevada dos genes *AURKB*, *UBE2C* e *GTSE1* foram significativamente associadas com índice elevado de proliferação celular;
- a expressão diminuída do *GATA3* e aumentada dos genes *AURKB* e *GTSE1* foram correlacionadas com grau histológico III em comparação aos tumores de graus I e II.