



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
LABORATÓRIO DE IMUNOLOGIA KEIZO ASAMI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA APLICADA À SAÚDE

ROBERTA LUCIANA DO NASCIMENTO GODONE

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA DIAGNÓSTICO,
PREDIÇÃO E PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

Recife

2018

ROBERTA LUCIANA DO NASCIMENTO GODONE

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA
DIAGNÓSTICO, PREDIÇÃO E PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

Recife

2018

ROBERTA LUCIANA DO NASCIMENTO GODONE

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA
DIAGNÓSTICO, PREDIÇÃO E PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de
Programa de Pós-graduação em Biologia
Aplicada à Saúde do Laboratório de
Imunologia Keizo-Asami – LIKA da
Universidade Federal de Pernambuco –
UFPE, como requisito para obtenção do
título de doutor.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Souto

Recife

2018

Catálogo na fonte:
Bibliotecário Bruno Márcio Gouveia - CRB-4/1788

Godone, Roberta Luciana do Nascimento
Identificação de marcadores moleculares para diagnóstico, predição e prognóstico
de câncer de mama / Roberta Luciana do Nascimento. – 2018.

106 f. : il.

Orientador: Prof. Dr. Fabrício de Oliveira Souto.
Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de
Biociências. Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde,
2018.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Mamas – Câncer. 2. Câncer – Diagnóstico. I. Souto, Fabrício de Oliveira. (Orientador). II. Título.

616.99465

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2018 – 490

ROBERTA LUCIANA DO NASCIMENTO GODONE

**IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA
DIAGNÓSTICO, PREDIÇÃO E PROGNÓSTICO DE CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de
Programa de Pós-graduação em Biologia
Aplicada à Saúde do Laboratório de
Imunologia Keizo-Asami – LIKA da
Universidade Federal de Pernambuco –
UFPE, como requisito para obtenção do
título de doutor.

Aprovada em: 09/07/2018.

Prof. Dr. Fabrício Oliveira Souto (Orientador)

NCV-CAA- UFPE/ LIKA-UFPE

Prof. Dr. Lucas André Cavalcanti Brandão (Examinador Interno)

Departamento de Patologia – UFPE

Prof. Dr. José Luiz de Figueiredo (Examinador Externo)

Departamento de Cirurgia – UFPE

Prof^ª Dr^a Manuela Barbosa Rodrigues (Examinadora Externa)

Universidade Católica de Pernambuco – UNICAP

Prof^ª Dr^a Jaqueline de Azevedo Silva (Examinadora Externa)

Departamento de Genética – UFPE

AGRADECIMENTOS

A Deus, por toda força e fé que me deu durante esses anos.

A minha mãe, Aneide e ao meu irmão Matheus, por toda paciência, carinho e compreensão, durante essa etapa tão difícil.

A Carlos, por todo apoio e paciência nesses últimos anos tão difíceis.

A Wilton Santos, meu advogado que de forma tão brava aceitou a lutar a minha luta e nunca desacreditou na justiça.

A Clarence, meu médico psiquiatra, conselheiro e ouvinte que por tantas vezes me atendeu nos meus momentos de maior fragilidade, me ajudou a conquistar a resiliência que eu havia perdido.

Ao Professor Fabrício Souto, pois melhor pessoa não haveria para conduzir essa etapa tão importante pra mim.

Aos professores da banca de avaliação, que aceitaram o convite.

Aos meus alunos de graduação da Uninassau, por toda torcida e toda alegria que me proporcionaram durante todo esse tempo de espera.

A Henrique Castelletti, pela ajuda com as Patentes.

A Glauber Leitão e os demais, que contribuíram para realização do artigo.

A Prof^a. Dr^a. Luciana Duarte Martins da Matta, pela grande oportunidade de ingressar na ciência, pela amizade, atenção, carinho, compreensão e ensinamentos.

Aos meus grandes amigos: Anderson Paulo, José Manoel e Carol, por toda força e paciência.

A todos os colegas e amigos do Grupo de Prospecção Molecular e Bioinformática (PROSPERMOL), pelo convívio durante os anos de doutorado.

Aos amigos e colegas do Laboratório de Biotecnologia (BT), por toda disponibilidade e convivência tão agradável.

Aos amigos e colegas da Patologia em especial a Marina, Carmelita e João Quirino, por serem tão prestativos e disponíveis comigo.

A todos os amigos e colegas da Biomol e Bioquímica do LIKA-UFPE.

A todos os amigos e colegas do Laboratório do Professor João Ricardo.

Ao ex-coordenador do Programa de Pós-graduação em Biologia Aplicada à Saúde, Prof. Luiz Bezerra e a todos que fizeram e fazem parte do PPGBAS.

A Professora Ana Lucia Porto, a senhora é fonte de inspiração para mim e para

muitos.

A todos os funcionários do LIKA.

A todos que compõem a equipe da Mastologia do Hospital Barão de Lucena, em especial a Dr. Darley Ferreira e seus residentes Sheila, Rafael, Eduardo e Kamila, por toda atenção e disponibilidade em nos ajudar nas coletas.

A Nara, por estar sempre presente nos momentos mais difíceis e nos mais prazerosos, também.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo suporte financeiro durante o curso deste trabalho.

A todos que de forma direta e indireta contribuíram para a realização deste trabalho.

RESUMO

O câncer de mama representa uma das principais causas de morte em mulheres do mundo inteiro. Aproximadamente 1,38 milhões são diagnosticadas com a doença e 458.503 morrem anualmente. Para o ano de 2018, o INCA foi estimado mais de 59.700 novos casos no Brasil. Devido às altas taxas de mortalidade, inúmeros estudos têm buscado identificar marcadores moleculares, que sirvam tanto para alvos diagnósticos como terapêuticos, na tentativa de individualizar cada vez mais o tratamento para o câncer e melhorar a qualidade de vida das mulheres portadoras dessa doença. Os tumores de mama são caracterizados por um comportamento biológico complexo, onde o prognóstico e a evolução tem sido confirmados por meio de estudos moleculares. Os marcadores moleculares podem ser utilizados como indicadores do estado fisiológico durante a progressão do câncer, sendo importantes para determinar o melhor tratamento para o paciente. As variantes genéticas do câncer de mama estão relacionadas com características diferentes de subtipos moleculares, como o estado de fase clínica, o tamanho do tumor, grau e presença de receptores hormonais. A criação de perfis genéticos, que fornecem um diagnóstico molecular para o câncer de mama, já estão disponíveis comercialmente, mas apresentam como estudo base populações restritas. Atualmente, existem seis assinaturas genéticas sendo comercializadas, cada qual com seus pacientes alvos, com diferentes metodologias implementadas. As mais utilizadas na prática clínica são o *Oncotype DX* (Genomic Health, Inc., CA) que avalia o perfil molecular de 21 genes e o *MammaPrint®* (Agendia BV, Amsterdam) que se baseia na análise de 70 genes. Estes testes apresentam não apenas números diferentes de genes, mas tipos diferentes de genes na sua composição. A população de referência para a maioria destes testes genéticos são as europeias e a norte-americana. No entanto, é necessário procurar genes que são expressos em diferentes populações, devido à variabilidade genética populacional, permitindo um diagnóstico mais preciso na prática clínica. Este estudo teve como objetivo discutir esses métodos diagnósticos, prognósticos e preditivos mostrando: 1) Classificação de perfis fenotípicos por subtipo molecular de câncer de mama; 2) Kits comerciais disponíveis para testes de prognóstico e preditivo de câncer de mama de base molecular e 3) Marcadores moleculares e terapia direcionada em câncer de mama identificada por análise *network*; 4) Uso de ferramenta de bioinformática para validação a partir de amostras

clínicas frescas. Ao final da pesquisa, tais dados podem facilitar a escolha da conduta clínica de acordo com o tipo e estágio do câncer de mama.

Palavras-chave: Câncer de Mama. Biomarcadores. Condutas terapêuticas.

ABSTRACT

Breast cancer is a leading cause of death in women worldwide with 1.38 million of cases diagnosed and 458,503 deaths annually. According to INCA, in 2018 were estimated more than 59,700 new cases in Brazil. Due to high mortality rates, numerous studies have sought to identify molecular markers, which are used for both therapeutic and diagnostic targets in an attempt to individualize increasingly treatment for cancer and improve the quality of life of women suffering from this disease. Breast tumors are characterized by a complex biological behavior, which prognosis and evolution could be confirmed through molecular studies. Molecular markers can be used as an indicator of physiological state during progression of cancer. It also can be important for determine the best treatment for the patient, once breast cancer genetic variants are related to different characteristics of molecular subtypes, as clinical stage, tumor size, grade and presence or absence of hormone receptors. After the decoding of the human genetic code, it was possible to create genetic profiles that provide a molecular diagnosis for breast cancer, in which currently the prediction of therapeutic response is evaluated through commercial genetic tests. Currently, there are numerous types of genetic signatures being marketed, and each has developed their signature targets beyond its patients differ in methodology implemented. The most used in clinical practice are the *Oncotype DX* (Genomic Health, Inc., CA) which evaluates the molecular profile of 21 genes and *MammaPrint*® (Agendia BV, Amsterdam) which is based on analysis of 70 genes. These tests present different numbers of genes and types of genes in their composition, and also use European and North American population as reference. However, it is necessary to search for genes that are expressed in different populations because the genetic variability factor should be taken into consideration. This study aimed to discuss these prognostic methods showing: 1) Classification of phenotypic profiles by molecular subtype of breast cancer; 2) Commercial kits available for molecular-based breast cancer prognostic and predictive tests and 3) Molecular markers and targeted therapy in breast cancer identified by network analysis; 4) Use of bioinformatics tool for validation of fresh clinical samples. Therefore, we identify genes related with commercial gene panels using bioinformatic tools in an attempt to facilitate mastologist's treatment choice, according to the type and stage of breast cancer and giving an overview of targeted

therapies that represent the current standard of care for these patients.

Keywords: Breast cancer. molecular markers. target therapy.

LISTA DE SIGLAS

A	Adenina
C	Citosina
CD	Carcinoma Ductal
CDI	Carcinoma Ductal Invasivo
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In situ</i>
cDNA	DNA Complementar
CIS	Carcinoma <i>In situ</i>
CL	Carcinoma Lobular
CLI	Carcinoma Lobular Invasor
dATP	Desoxiadenosina Trifosfato
dCTP	Desoxicitosina Trifosfato
dGTP	Desoxiguanosina Trifosfato
dTTP	Desoxitimina Trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
G	Guanina
GB	Gigabase
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
INCA	Instituto Nacional do Câncer
MB	Megabase
NGS	<i>Next Generation Sequence</i>
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGM	<i>Personal Genome Machine</i>
pH	Potencial Hidrogeniônico
RE	Receptor de Estrogênio
RNA	Ácido Ribonucleico
RP	Receptor de Progesterona
RT-PCR	<i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SNPs	<i>Single-nucleotide polymorphism</i>
SOE	Sem outras especificações
T	Timina
WHO	<i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	OBJETIVOS	16
1.1.1	Objetivo Geral.....	16
1.1.2	Objetivos Específicos	16
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	17
2.1	CÂNCER DE MAMA	17
2.2	ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA.....	19
2.3	CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA MAMÁRIO	21
2.4	FATORES ENVOLVIDOS NO CÂNCER DE MAMA.....	25
2.5	MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA.....	27
2.6	ASSINATURAS GENÉTICAS NO CÂNCER DE MAMA	29
2.7	ALVOS TERAPÊUTICOS PARA O CÂNCER DE MAMA	34
2.8	FAMÍLIA HER.....	35
2.9	VIAS DE SINALIZAÇÃO.....	36
2.10	BIOINFORMÁTICA.....	38
2.11	TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA.....	39
2.11.1	Sequenciamento de Nova Geração- SNG.....	39
2.11.2	Plataforma <i>Ion Torrent PGM</i>	42
2.11.3	PCR quantitativo em tempo real (qPCR).....	44
3	RESULTADOS	46
3.1	CLINICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF BREAST CANCER: TARGETS AND THERAPIES	46
3.2	ANALYSIS OF THE EXPRESSION AND MUTATION THE THREE RECEPTOR TYROSINE KINASES, RET, PDGFRA AND ERBB4 IN TUMORS BREAST	47
4	CONCLUSÕES.....	66
	REFERÊNCIAS	67
	APÊNDICE A – PRIMEIRA PATENTE DEPOSITADA: PAINEL GENÉTICO NO DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E PREDIÇÃO DE NEOPLASIAS DE MAMA.....	77
	APÊNDICE B – SEGUNDA PATENTE DEPOSITADA: PAINEL GENÉTICO	

PARA ANÁLISE, IDENTIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE MUTAÇÕES EM CÂNCER DE MAMA	89
ANEXO A – FICHA DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS	101
ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE).....	103
ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA.....	105

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre a população feminina mundial, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A maioria das mortes por esta doença ocorre em países de baixa e média renda, pelo fato de as pacientes serem diagnosticadas em estágios avançados da patologia (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2017). A ocorrência mundial de novos casos de câncer estimada em 2012 foi de 14,1 milhões, sendo detectados 8,2 milhões de óbitos devido à doença. Segundo os dados do Globocan (2012), estima-se cerca de 20 milhões de novos casos até 2020 em todo o mundo (Torre et al., 2015). Em termos de prevalência, a situação no Brasil assemelha-se bastante ao cenário internacional, com esta neoplasia figurando como o câncer mais frequente na mulher nas regiões Sul, Sudeste, Centro-oeste e Nordeste. Ao todo, para o Brasil, em 2018/2019, são esperados 59.700 casos novos de câncer de mama (INCA, 2018).

A maioria dos tumores de mama, assim como os tumores em geral, é resultante de alterações genéticas e epigenéticas que se acumulam nas células e que podem mudar a morfologia e a função das mesmas (LOPEZ-GARCIA et al., 2010). Desta forma, os principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama relacionam-se com idade avançada, características reprodutivas, história familiar pessoal, hábitos de vida, terapia de reposição hormonal, índice de massa corpórea (IMC), densidade mamográfica com microcalcificações e influências ambientais (SILVA & RIUL, 2011; ERIKSSON et al., 2017).

Neste contexto, a análise do perfil genético no câncer de mama tem recebido crescente atenção nos últimos anos como ferramenta para fornecer informação prognóstica e preditiva da doença (ESPINOSA et al., 2011). A utilização de análises moleculares vem sendo descrita como uma forma de classificar o câncer de mama a nível clínico, identificando assim a grande diversidade de subtipos de tumores baseados nos perfis de expressão gênica e influenciando na conduta médica mais eficiente no combate ao câncer de mama (DUFFY et al., 2011; ESPINOSA et al., 2011; CAVALLARO et al., 2012).

Em muitos casos as mulheres não percebem que podem estar com um câncer se manifestando, e o diagnóstico precoce é um dos fatores que supostamente estão envolvidos no sucesso do tratamento. Quanto mais rápido for diagnosticado o câncer, maior poderá ser a sobrevida das mulheres, resultando em taxas menores de

mortalidade e consequentemente melhorando a qualidade de vida destas mulheres (GADGIL et al., 2017). O presente estudo está alinhado com a crescente atenção em relação aos perfis genéticos, que vêm se intensificando pelo desenvolvimento de técnicas de biologia molecular mais eficientes na detecção de alterações estruturais e funcionais das moléculas. Desta forma, o nosso objetivo foi identificar os principais marcadores moleculares do câncer de mama na nossa população, visando favorecer o avanço no diagnóstico precoce da doença e na decisão clínica quanto à seleção da melhor terapia para as mulheres em todos os estágios do câncer de mama.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar marcadores moleculares de diagnóstico, predição e prognóstico eficazes no uso de conduta clínica para câncer de mama.

1.1.2 Objetivos Específicos

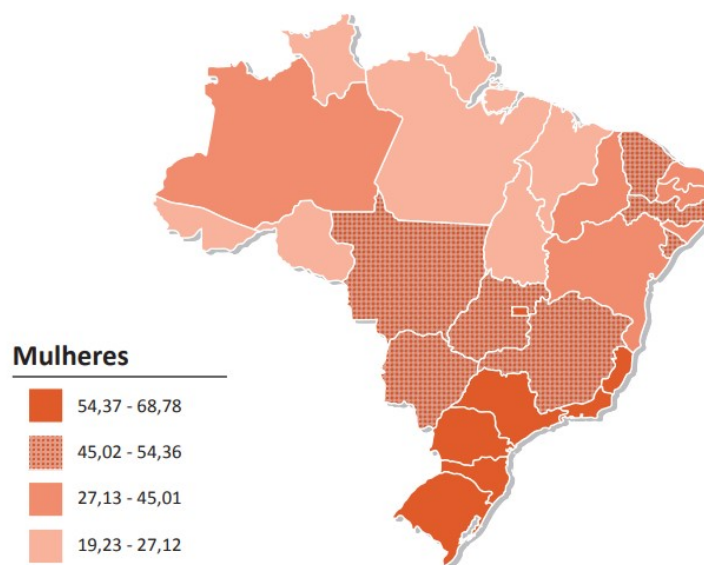
- Montar um painel genético de expressão gênica para diagnóstico, prognóstico e predição para câncer de mama, a partir de descritores mundiais utilizando técnica de bioinformática;
- Montar um painel genético baseado em mutações gênicas para detecção de *hotspots* em câncer de mama, a partir de descritores mundiais; técnicas de bioinformática;
- Determinar expressão e a integridade gênica dos principais marcadores moleculares para câncer de mama;
- Correlacionar os achados genômicos e de expressão para determinação dos marcadores mais relevantes para diagnóstico e prognóstico de câncer de mama;
- Determinar os aspectos farmacogenômicos dos pacientes considerados bons e maus-respondedores ao tratamento utilizado;
- Desenvolver patentes com painéis genéticos de expressão gênica e mutação para diagnóstico, predição e prognóstico para o câncer de mama.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre a população feminina mundial, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A maioria das mortes por esta doença ocorre em países de baixa e média renda, pelo fato das pacientes serem diagnosticadas em estágios avançados dessa patologia (*WORLD HEALTH ORGANIZATION*, 2017). Para o Brasil, em 2018/2019, são esperados 59.700 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,33 casos a cada 100 mil mulheres (Figura 1), sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o primeiro mais frequente nas mulheres das Regiões Sul (73,07/100 mil), Sudeste (69,50/100 mil), Centro-Oeste (51,96/100 mil) e Nordeste (40,36/100 mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19,21/100 mil) (INCA, 2018).

Figura 1. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2018, segundo Unidade da Federação (neoplasia maligna da mama feminina).



Fonte: INCA, 2018.

A incidência de câncer de mama está em constante crescimento no mundo em desenvolvimento, devido ao aumento da expectativa de vida, o aumento da urbanização e adoção de estilos de vida ocidentais. Apesar de a prevenção poder conferir redução do risco em países de baixa/média renda, ainda não é possível eliminar a maioria dos cânceres de mama que se desenvolvem, uma vez que o diagnóstico ocorre em estágios avançados. Portanto, a detecção precoce, a fim de melhorar o prognóstico do câncer de mama e de sobrevivência continua a ser a melhor saída para o controle dessa neoplasia (WHO, 2017).

O rastreo populacional é importante, pois, tem como objetivo detectar o câncer da mama numa fase precoce entre mulheres assintomáticas (IARC, 2014), reduzindo assim a morbidade e mortalidade desta doença. A mamografia de rastreo é o método mais eficaz disponível para a identificação do câncer de mama em um estágio inicial (IARC, 2014; ELMORE et al., 2005). A detecção precoce tem se mostrado importante devido à forte associação entre a fase de diagnóstico (ou tamanho do tumor) e a sobrevivência (ELMORE et al., 2005; SOERJOMATARAM et al., 2008).

Globalmente, 89% dos cânceres de mama são diagnosticados a partir dos 40 anos de idade (FERLAY et al, 2010). Estes, quando se desenvolvem em uma idade mais jovem, são geralmente maiores, menos diferenciados e mais propensos a metástases (AXELROD et al., 2008).

Alguns dados sugerem que a proporção de cânceres de mama diagnosticados precocemente é geralmente muito mais elevada em países desenvolvidos do que nos países menos desenvolvidos (YANKASKAS, 2005; AXELROD et al., 2008). Este fato pode ser devido à sensibilização do público em relação ao cuidado à saúde da mulher, a disponibilidade de rastreo do câncer da mama e à qualidade dos serviços de saúde primários oferecidos (AGARWAL et al., 2009; COUGHLIN & EKWUEME, 2009). A taxa de sobrevivência de câncer de mama é superior a maioria dos outros tipos de câncer, sendo de pelo menos cinco anos após diagnóstico (BAADE; YOULDEN; CHAMBERS, 2011).

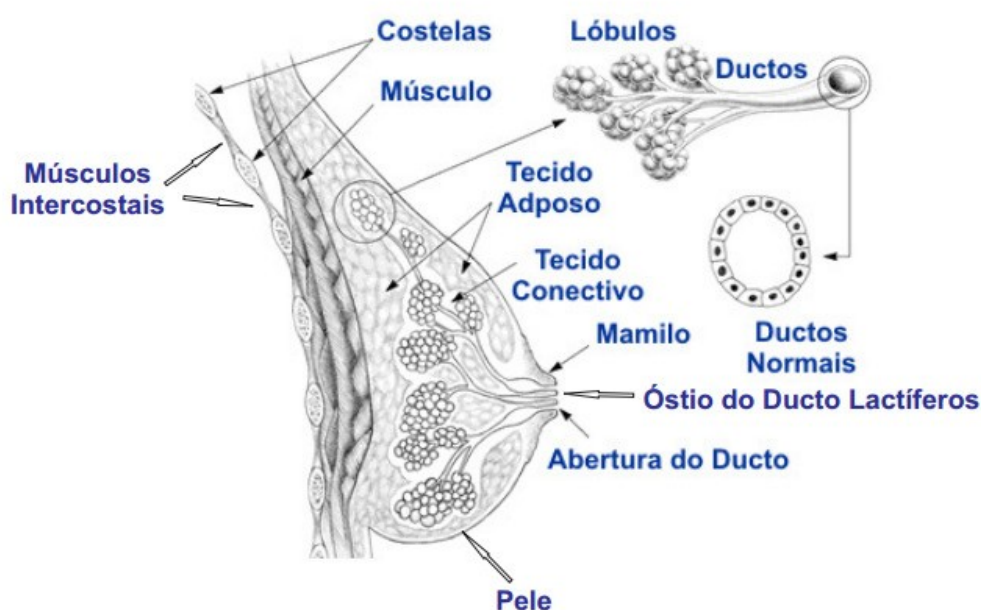
No câncer de mama há fatores histológicos determinantes no que diz respeito ao diagnóstico e a sobrevivência do paciente, sendo eles o tamanho do tumor e o comprometimento dos gânglios linfáticos ou outros tecidos. Outros fatores prognósticos e preditivos que estão associados com uma melhor sobrevida do câncer

de mama incluem: idade entre 40 e 69 anos, idade no momento do diagnóstico, menor grau tumoral (bem diferenciado), ausência de comorbidades (como doenças cardiovasculares, diabetes e outros cânceres), perfil genético favorável, fator de crescimento epidérmico humano receptor de tipo 2 (HER2/neu), e presença de receptores hormonais de estrogênio/progesterona (HAYES; ISAACS; STEARNS, 2001; CIANFROCCA & GOLDSTEIN, 2004).

2.2 ORIGEM E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

A glândula mamária apresenta estrutura celular complexa, com um sistema integrado de renovação do tecido. A mama é constituída de um epitélio secretor (parênquima) envolvido por um estroma de tecido conectivo e adiposo e uma rede de capilares. A porção parenquimal é formada por dois tipos de células epiteliais: as luminais glandulares e as mioepiteliais basais (Figura 2). Essas células, em conjunto com o estroma, produzem os componentes da matriz extracelular, que assim como hormônios e fatores de crescimento são essenciais para o crescimento, funcionamento e morfogênese da glândula mamária (GUIMARÃES, 2008).

Figura 2. Arquitetura esquemática da glândula mamária em corte sagital ao nível da papila.



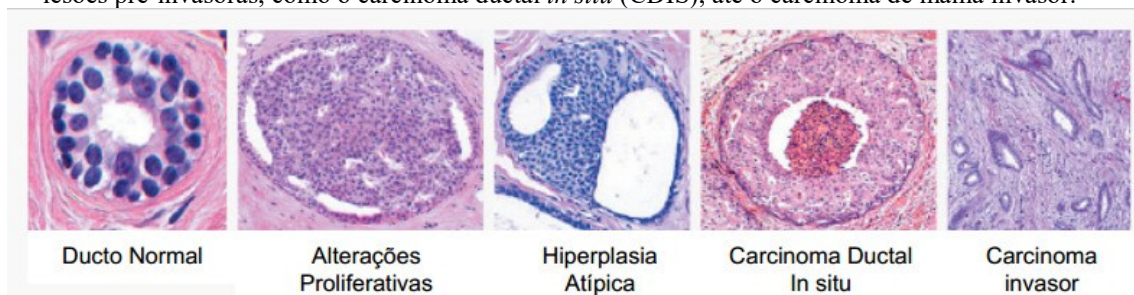
Fonte: <http://www.cancervic.org.au/about-cancer/cancertypes/breastcancer>.

Em menor número, também estão presentes células-tronco epiteliais mamárias, capazes de originar células lumbais e mioepiteliais e formar novas estruturas durante o desenvolvimento da mama (STINGL & CALDAS, 2007).

A maior parte dos casos de neoplasias mamárias inicia a proliferação em células de revestimento dos ductos e lóbulos mamários, formando os denominados carcinomas ductais (CD) e carcinomas lobulares (CL), respectivamente. Outras doenças da mama menos comuns incluem tumores mucinosos, inflamatórios, medulares, tubulares, papilares e filóides (GUIMARÃES, 2008).

As primeiras lesões aparentes no tumor constituem nas hiperplasias, onde células epiteliais apresentam alterações estruturais, mas não atipia citológica, e poucas alterações genéticas. À medida que a doença progride para a forma de carcinoma *in situ* (CIS), a atipia citológica torna-se proeminente, com aumento significativo no índice mitótico e nas alterações genéticas (BURSTEIN et al., 2004) (Figura 3).

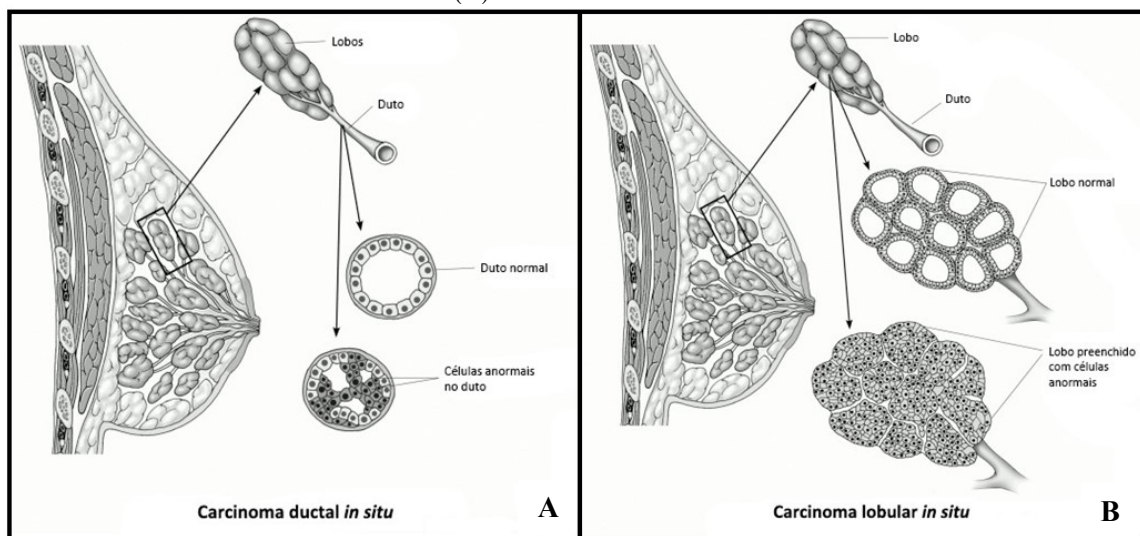
Figura 3. Eventos patológicos envolvidos no processo de transformação do tecido mamário normal a lesões pré-invasoras, como o carcinoma ductal *in situ* (CDIS), até o carcinoma de mama invasor.



Fonte: BURSTEIN et al., 2004.

As células tumorais podem, então, se estabelecer na área de origem ou romper a membrana basal. Os carcinomas *in situ* são caracterizados por apresentarem proliferação de células que permanecem restritas aos ductos ou lóbulos mamários, causando os carcinomas ductais *in situ* (CDIS) e os carcinomas lobulares *in situ* (CLIS) (Figura 4). Dentro deste grupo, os CDIS podem ser subclassificados seguindo padrões histomorfológicos do tecido, com os tipos mais frequentes designados comedo, cribiforme, micropapilar, papilar e sólido (BATEMAN, 2007).

Figura 4. Tipos de câncer de mama que ocorrem nos ductos e lóbulos mamários. (A) Carcinoma ductal *in situ*. (B) Carcinoma lobular *in situ*.



Fonte: Adaptado de *American Cancer Society*, 2016.

Os carcinomas ductais invasivos (CDI) apresentam maior frequência, compreendendo 65% a 80% dos casos de câncer de mama. O Carcinoma lobular invasor (CLI) tem incidência de aproximadamente 10% de todos os casos de câncer de mama (EHEMAN et al., 2009).

2.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA MAMÁRIO

O câncer de mama é uma doença heterogênea composta por diferentes achados biológicos, subtipos histológicos e comportamento clínico, que juntos determinam o prognóstico da paciente (TURNER & REIS-FILHO, 2006; WEIGELT et al., 2010).

As maiorias dos tumores mamários invasores apresentam padrão histológico ductal, chamados de carcinomas ductais invasivos sem outra especificação (SOE), com diferentes perfis de evoluções clínicas quando comparadas entre si num mesmo estadiamento clínico. Atualmente, com o advento de estudos dos perfis gênicos dos cânceres de mama, a sua taxonomia tem sido revista (SORLIE et al., 2003; MATOS et al., 2005). A classificação molecular do câncer de mama se originou a partir do agrupamento hierárquico através de análises de DNA complementar (cDNA) e dados de microarranjo por Perou e colaboradores no ano de 2000, que revelou a existência dos quatro principais subtipos moleculares intrínsecos: luminal A, luminal B, fator de crescimento epidermal humano do receptor 2 (HER2), enriquecido (HER2-E), e *basal-like*.

O subtipo Luminal A demonstrou ser o mais frequente, apresentando prognóstico geralmente favorável e com o benefício de terapia-alvo dirigida. Por outro lado, o subtipo *basal-like* é o único que não apresenta alvo terapêutico definido (MA & ELLIS, 2013).

O fenótipo luminal foi denominado dessa forma porque as neoplasias receptor de estrógeno positivas (RE^+) expressavam outros genes que também são encontrados em células luminais da mama, sendo assim, pode-se supor que os carcinomas de mama RE positivo poderiam ter origem a partir desse tipo celular (PEROU et al., 2000). O fenótipo luminal é o subtipo mais comum, correspondendo aos carcinomas mamários positivos para os receptores de estrógeno. Estes carcinomas expressam as citoqueratinas 8 e 18, além de genes associados com a ativação dos receptores de estrógeno, como a LIV1 e a ciclina D1 (PEROU et al., 2000).

Os carcinomas do subtipo molecular luminal geralmente são bem diferenciados e menos de 20% apresentam mutações no gene TP53 (SORLIE et al., 2003). Os carcinomas de imunofenótipo luminal podem ser divididos em luminal A e luminal B. Embora ambos expressem receptores hormonais, o subtipo luminal A tem uma expressão maior de genes associados aos receptores de estrógeno e uma expressão menor de genes proliferativos do que os carcinomas do subtipo luminal B (SORLIE et al., 2003). Pacientes com carcinomas luminais A têm melhor sobrevida global em comparação às pacientes com carcinomas luminal B (CHANG et al., 2004).

O fenótipo enriquecido com HER2 (HER2-E) é caracterizado pela amplificação de vários genes, incluindo o HER2/neu, o GRB7 e o TRAP100 (SORLIE et al., 2003). Estes tumores exibem alta taxa de mutação no gene TP53 (40-80%) e geralmente são carcinomas grau 3 e linfonodos positivos (BRENTON et al., 2005). Estes tumores estão associados a um péssimo prognóstico independente do grau, e quando o HER2 está amplificado, o tumor apresenta uma alta atividade mitótica, alto grau de pleomorfismo nuclear e uma associação com comedo necrose e carcinoma ductal *in situ* (HANBY, 2005).

Os piores prognósticos estão associados ao subtipo basal e HER2 (TURNER & REIS-FILHO, 2006). Perou e colaboradores (2000) observaram que as neoplasias que não expressam receptor de estrógeno (RE^-) representam um grupo clinicamente diferente daquelas neoplasias que expressam este receptor (RE^+). Através de expressões gênicas semelhantes dentro destes grupos RE^+ e RE^- , os autores definiram os quatro fenótipos de carcinoma mamário. As neoplasias RE^- foram divididas em

HER2⁺ e fenótipo basal.

O sistema ductal mamário engloba domínios com diferentes morfologias e funções. A camada de células basais é morfologicamente heterogênea e as células apresentam morfologia fusiforme ou cuboidais, dependendo das variações da estrutura dos ductos mamários, das variações hormonais ou na menopausa (GUSTERSON et al., 2005). O uso do termo “basal” é dado a essas células neoplásicas deste tipo tumoral, pois estas células expressam genes usualmente expressos em células basais e/ou mioepiteliais da mama normal (TURNER & REIS-FILHO, 2006) como as citoqueratinas (CK) de alto peso molecular (VAN DE VIJVER, 2000).

Os carcinomas basais são caracterizados por um mau prognóstico (RAKHA et al., 2010) e alto grau histológico, expressão de citoqueratinas e altos níveis de expressão de genes ligados a fatores de proliferação (TURNER & REIS-FILHO, 2006; VAN DE VIJVER, 2000). Nestes tumores, o índice mitótico é alto e o pleomorfismo nuclear é acentuado (CAREY et al., 2006). Estes tumores são geralmente negativos para receptores de estrógeno e progesterona (KORSCHING et al., 2002) e HER2 (DABBS et al., 2006) e estão associados a expressão de genes mutantes para determinados marcadores, como o p53, TP53, amplificação de CCND1 e CDK4 dentre outros (MA & ELLIS, 2013; TURNER & REIS-FILHO, 2006) e o receptor do fator de crescimento epitelial (KORSCHING et al., 2002), além disso, expressam CK 5/6, CK 14, CK17, vimentina, HER1 (DABBS et al., 2006), p-caderina e caveolina 1 (TURNER & REIS-FILHO, 2006).

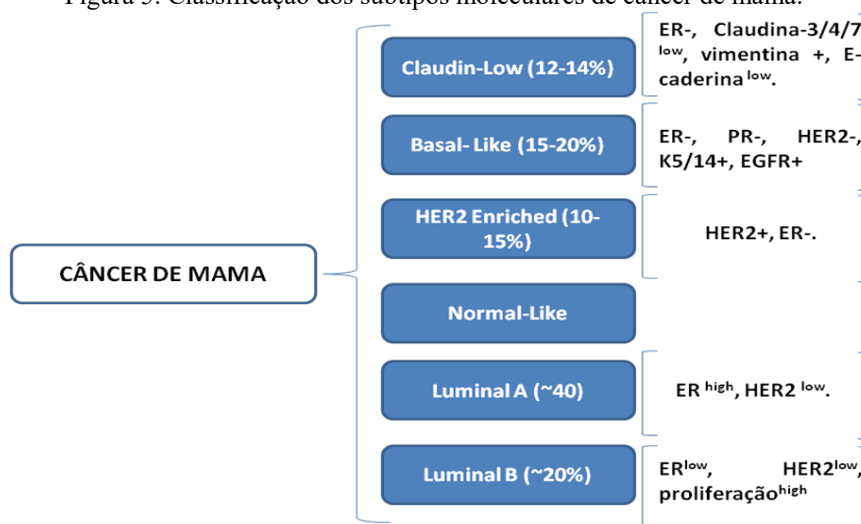
Outro perfil molecular existente é o triplo-negativo, que é definido como sendo negativo para os receptores hormonais (RE e RP) e para o HER2. Atualmente muito se discute a respeito desse perfil, que possui o comportamento clínico mais agressivo entre os outros perfis, e é encontrado em aproximadamente 11% dos carcinomas invasivos (THIKE et al., 2010).

Existem similaridades entre os cânceres triplo negativos, basal-like, e os que ocorrem em pacientes com mutações no gene BRCA1. Entre estas semelhanças está o fato de esses tumores, apesar de apresentarem frequentemente mutação de TP53, que prediz resposta aos taxanos, não mostram sensibilidade maior a este grupo de drogas em modelos experimentais. O fenótipo triplo-negativo parece ocorrer com maior incidência em mulheres jovens afrodescendentes predominantemente na pré-menopausa, conforme estudos realizados em pacientes com câncer de mama. Este

fenótipo está também consistentemente associado a mutações no gene BRCA1 (BIANCHINI et al., 2016).

Os subtipos moleculares do câncer de mama podem ser resumidos em 6 tipos, com cada subtipo possuindo características próprias. Algumas dessas características são resumidas a seguir: 1) Claudin-low: apresentam alta instabilidade do genoma, com células tumorais mais indiferenciadas, têm características de células estaminais (SABATIER et al., 2014), são negativas para o receptor de estrogênio, negativas para proteína Claudina e têm baixa expressão de E-caderina; 2) Basal like: mostram alta instabilidade do genoma, são EGFR positivo e são tipicamente triplo negativo (ER- / PR- / HER2-), possuem sobrevivência mais curta (MALHOTRA et al., 2010); 3) enriquecido HER2-E: alta expressão de HER2, baixa expressão do receptor de estrogênio e receptor de progesterona (SCHNITT, 2010); 4) Normal Like: menos caracterizado, p53 positivo (MUNIRAH et al., 2011); 5) Luminal A: receptor de progesterona positivo, receptor de estrogênio positivo e HER2 negativo (RE⁺ / RP⁺ / HER2⁻) (24); 6) Luminal B: receptor de estrogênio positivo, receptor de progesterona positivo e HER2⁺ (RE⁺/RP⁺/HER2⁺) no entanto, têm baixa expressão de ER e HER2 e têm alta taxa de proliferação (MALHOTRA et al., 2010, SCHNITT., 2010) (Figura 5).

Figura 5. Classificação dos subtipos moleculares de câncer de mama.

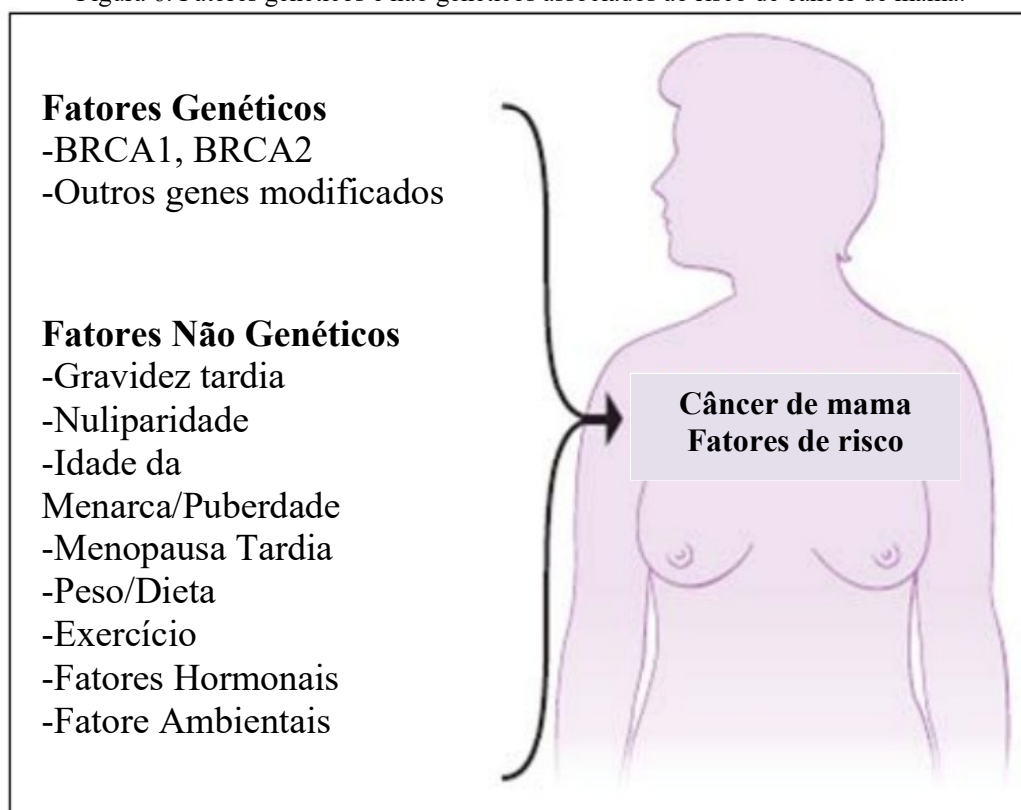


Fonte: Adaptado de MALHOTRA et al., 2010.

2.4 FATORES ENVOLVIDOS NO CÂNCER DE MAMA

Cerca de 90 a 95% dos casos de câncer da mama são esporádicos e ocorrem sem qualquer mutação gênica associada. Estes fatores não genéticos (Figura 6) estão relacionados com eventos reprodutivos (menarca, menopausa, gravidez e amamentação), alterações hormonais externas (terapia de substituição hormonal e contraceptivos orais), estilo de vida (dieta, exercício físico, consumo de bebidas alcoólicas), exposição ambiental e ocupacional (por exemplo, exposição a radiação ionizante) (LEVY-LAHAD & PLON, 2003; KOMEN, 2010).

Figura 6. Fatores genéticos e não genéticos associados ao risco de câncer de mama.



Fonte: Modificado de LEVY- LAHAD & PLON, 2003.

Algumas formas esporádicas podem estar relacionadas com polimorfismos em genes associados ao metabolismo de agentes cancerígenos (aumento da proliferação celular maligna, diminuição da apoptose e facilitação da neoangiogênese tumoral), de hormônios esteroides e à reparação de lesões genéticas no DNA (KOLONEL et al., 2004). Normalmente, a apresentação de formas variantes de genes comuns na população confere um risco baixo à moderado na susceptibilidade individual para o câncer de mama, mas a combinação dos diferentes polimorfismos pode conduzir a um

efeito aditivo.

Há indicativos de que estas formas esporádicas resultam da complexa interação entre a expressão dos genes de baixa penetrância e fatores ambientais (COSTA et al., 2007; LACROIX & LECLERCQ, 2005; OLDENBURG et al., 2007).

No entanto, alterações genéticas e epigenéticas em uma população de células também podem favorecer o desenvolvimento do câncer de mama (NUSSBAUM, 2008). As alterações genéticas associadas com o câncer de mama podem ser classificadas quanto ao grau de penetração em: mutações de alta penetrância (raros na população em geral), mutações de penetrância moderada (elevação moderada de risco) e polimorfismos de baixa penetrância (associação comum nas populações) (Tabela 1).

Tabela 1. Mutações de alta, média e baixa penetrância associadas ao câncer de mama.

Penetrância	Genes
Alta	BRCA1, BRCA2, TP53, STK11, PTEN, CDH1
Moderada	ATM, CHEK2, BRIP1, PALB2 FGFR2, MAP3K1, LSP1, COX11
Baixa	TNP1/IGFBP5/IGFBP2, TOX3, FAM84B/c-MYC, NEK10/SLC4A7, RAD51L1, NS1, CASP8 (D302H), NOTCH2/FCGR1B, MRPS30/FGFR10, ESR1

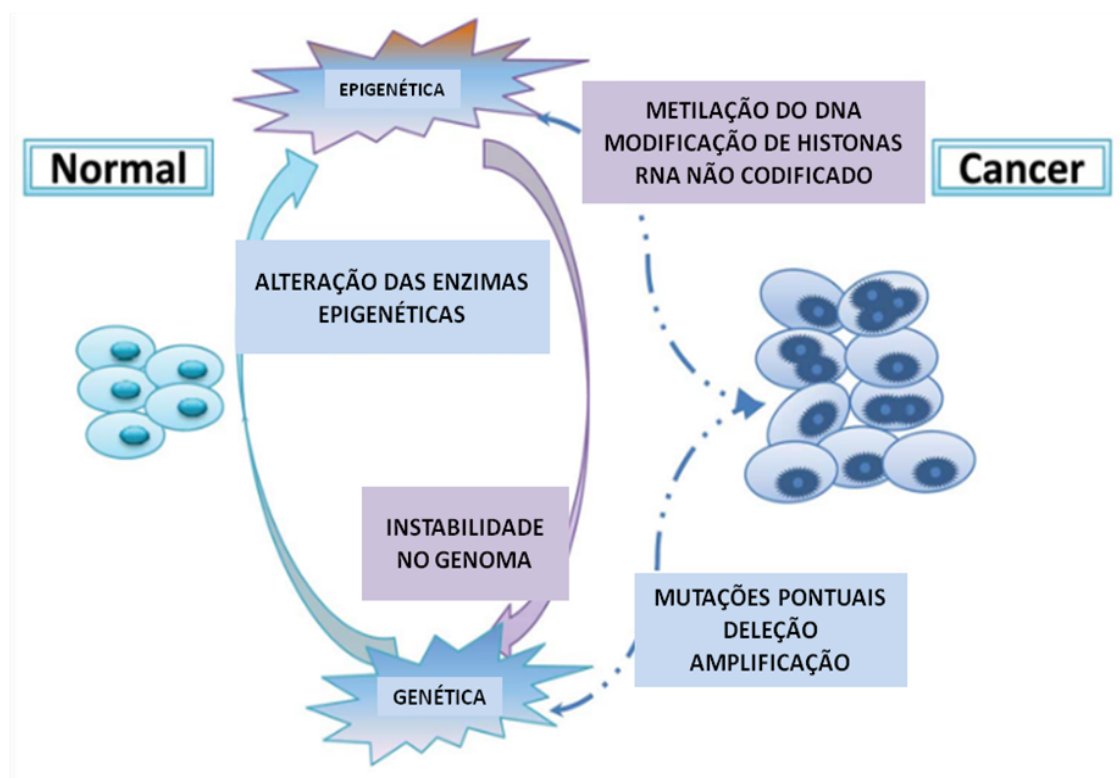
Fonte: Modificado de MAVADDAT et al., 2010.

Dentre as mutações associadas ao câncer de mama destacam-se mutações hereditárias dos genes supressores tumorais BRCA1 e BRCA2 (MAVADDAT et al., 2010). As mutações dos genes TP53, PTEN e CDH1 associam-se à ocorrência de síndromes com riscos elevados de desenvolvimento de câncer de mama, mas não há evidências de que estejam associados a substanciais proporções de casos de câncer de mama familiar ou esporádico na ausência das síndromes (WENDERPASS et al., 2011). Além das mutações comumente encontradas no câncer de mama, há um número significativo de genes mutados, incluindo: TBX3, RUNX1, CBF3, AFF2, PIK3R1, PTPN22, PTPRD, NF1, SF3B1, CCND dentre outros (TCGAN, 2012).

O acúmulo de mutações genéticas e alterações epigenéticas podem

transformar células normais em células tumorais metastáticas. Alterações nos padrões de metilação de ilhas CpG das regiões promotoras de genes supressores de tumor alteram a expressão de genes associados ao câncer, contribuindo para o silenciamento transcricional e a progressão de neoplasias (PARRELLA, 2010) (Figura 7).

Figura 7. Modificações genéticas e epigenéticas provocadas na formação do câncer.



Fonte: Adaptado de CHEN et al., 2014.

2.5 MARCADORES MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA

Por ser uma doença extremamente heterogênea, estudos têm buscado identificar preditores de resposta e prognósticos do câncer de mama, na tentativa de individualizar cada vez mais o tratamento das pacientes (EROLES et al., 2011).

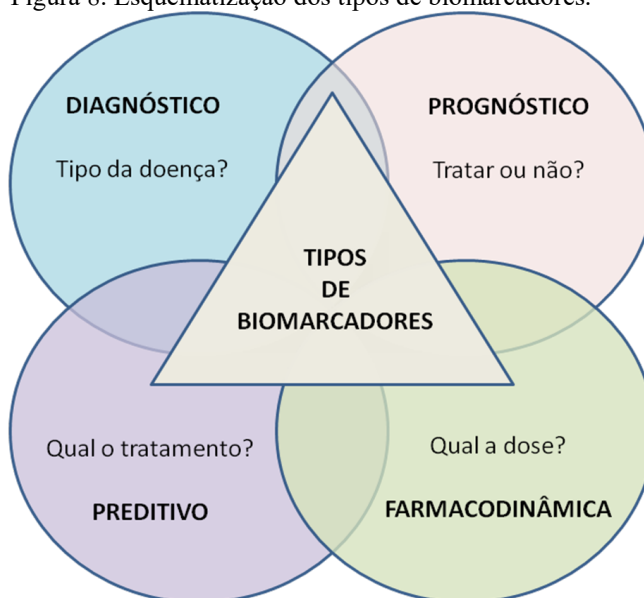
Os marcadores moleculares ajudam a definir subgrupos e aperfeiçoar a segurança sistêmica ao tratamento (LUPORSI et al., 2012). Um marcador molecular pode ser definido como qualquer marcador capaz de, no momento do diagnóstico (ou cirurgia), fornecer informações a respeito da evolução clínica da patologia. Para tal, este marcador deve estar relacionado a determinadas características biológicas envolvidas na transformação celular neoplásica, no crescimento tumoral ou no

processo de metástase. Este mesmo marcador poderá ser considerado como preditivo, quando fornecer informações úteis na seleção de pacientes susceptíveis à determinada terapêutica específica ou poderá ser considerado como prognóstico, elucidando se o paciente terá recidiva ou não da doença (AGRESTI et al., 2014).

Biomarcadores moleculares indicativos do estado fisiológico durante início e progressão do câncer podem fornecer maior sensibilidade e especificidade para diagnóstico e classificação da doença (MENG et al., 2011).

A *Food and Drug Administration* (FDA) define biomarcadores em 4 categorias gerais, principalmente relacionados aos usos no desenvolvimento de terapias: 1. Biomarcador diagnóstico: categoriza os pacientes pela presença ou ausência de um estado ou doença fisiológica ou fisiopatológica; 2. Biomarcador prognóstico: indica o grau de risco de ocorrência ou progressão da doença, distingue resultados “bons” e “ruins”; 3. Biomarcador preditivo: categoriza os pacientes pela probabilidade de resposta a uma determinada terapia benéfica ou prejudicial e 4. Biomarcador farmacodinâmico: mostra que ocorreu uma resposta biológica à terapia antes ou depois do tratamento; pode ser considerado tratamento específico ou informativo de resposta de doença (Figura 8) (MILLNER & STROTMAN, 2016).

Figura 8. Esquematização dos tipos de biomarcadores.



Fonte: Adaptado de MILLNER & STROTMAN, 2016.

Desta forma, o diagnóstico do câncer de mama é feito através da avaliação de variáveis histopatológicas, incluindo o tamanho do tumor, grau e status do linfonodo,

dentre outros. Alguns dos marcadores moleculares mais intensivamente estudados e com valores prognósticos e/ou preditivos mais bem estabelecidos para o câncer de mama são os receptores hormonais ER α e PR, o oncogene HER-2 e os genes supressores tumorais, BRCA1 e BRCA2 (HIRATA et al., 2014; HAMMOND et al., 2010).

No entanto, poucos estudos têm medido a expressão dos marcadores biológicos no prognóstico dos tumores (KRETSCHMER et al., 2011) e, dessa forma, ainda há pacientes cujo risco de recorrência é indistinguível por critérios clínico-patológicos com diferentes resultados principalmente no que diz respeito à resposta terapêutica (BARON, 2012).

A descoberta de preditores de resposta mais sensíveis é especialmente relevante em neoplasias de comportamento clínico muito heterogêneo, não só pelo aspecto farmacoeconômico, já que medicamentos caros podem ser reservados exclusivamente para casos com alta probabilidade de resposta, mas especialmente pela possibilidade de se poupar o paciente da toxicidade de um tratamento que será ineficiente (CORRÊA, 2010).

Desta forma a utilidade clínica de um biomarcador é mostrado por indícios que a sua utilização melhora os resultados de diagnóstico e prognóstico em comparação com a não utilização deles (COLEMAN, 2011). Nos últimos anos, a utilização de marcadores moleculares com potencial prognóstico e preditivo de resposta a tratamento tem sido proposta. Em especial a utilização de testes baseados em avaliação do perfil molecular dos pacientes individualmente (ESPINOSA et al., 2011).

2.6 ASSINATURAS GENÉTICAS NO CÂNCER DE MAMA

O perfil genético no câncer de mama tem recebido atenção crescente nos últimos anos como uma forma de fornecer informação prognóstica e preditiva. As técnicas de biologia molecular como, microarranjos de DNA, PCR em tempo real (qPCR) e o sequenciamento de nova geração são as mais comuns para estabelecer esse perfil (BONNEFOI et al., 2009).

Tais técnicas permitem a avaliação simultânea de milhares de transcritos de tal forma que qualquer grupo de transcritos associados com um determinado resultado (recidiva, resposta a tratamento, por exemplo) pode ser considerado como de natureza

ou perfil classificador (WADDELL et al., 2010).

Um grande número de assinaturas genéticas prognósticas está comercialmente disponível desde o final de 2010 (PAIK et al., 2007). A tabela 2 mostra as principais assinaturas genéticas mais relevantes para diagnóstico, predição e prognóstico em câncer de mama. A maioria delas foi criada comparando a expressão do gene em duas categorias, os pacientes que tiveram recidiva contra pacientes que não recidivaram, ou tumores com alta de proliferação contra tumores de baixa taxa de proliferação. Do ponto de vista clínico, a utilidade do uso dessas assinaturas depende da identificação de um subgrupo de pacientes, e identificação de tumores que respondem a drogas específicas, conduzindo assim o paciente para terapia-alvo (PARRELLA, 2010; ESPINOSA et al., 2011).

Tabela 2. Assinaturas genéticas comercialmente disponíveis para o câncer de mama.

Teste Comercial	Companhia	Técnica	Nº de genes	Material	Benefício
<i>MammaPrint</i> (FDA approved)	Agendia BV, (Amsterdam, Netherlands)	Microarray	70	Tecido parafinado	Prognostico
<i>Oncotype DX</i>	Genomic Health Inc. (Redwood City, CA, USA)	RT-qPCR	21	Parafina	Prognostico e preditivo
<i>MapQuant Dx</i>	Ipsogen (Breast Cancer Profiler)	Microarray	97	Tecido fresco	Prognostico
<i>THEROS Breast Cancer Index</i>	Biotheranostics (Biomérieux Alliance Groupe, San Diego, USA)	RT-qPCR	7	Parafina	Preditivo
<i>Breast BioClassifier</i>	University Genomics, Inc./ARUP Laboratories Ipsogen (Breast Cancer Profiler)	RT-qPCR	55	Parafina	Prognostico
<i>Mammostrat</i>	Applied Genomics, Inc., (Huntsville, Alabama)	IHC (5 proteínas/ 5 anticorpos monoclonais)	5	Tecido congelado fresco ou material parafinado	Prognostico e preditivo
<i>PAM50</i> (FDA)	(Prosigna; Nanostring)	RT-qPCR	50	Tecido parafinado	Prognostico e preditivo

<i>approved)</i>	Technologies, Seattle, WA, USA)				
	Sividon				Diagnostico,
<i>EndoPredict</i>	Diagnostics	RT-PCR	11	Tecido	Prognostico
<i>assay</i>	GmbH, Koln, Germany			parafinado	e preditivo
<i>Prosigna</i>	UK	RNA-Seq	50	Tecido	Prognostico
				parafinado	

Fonte: ESPINOSA et al., 2011; KWA et al., 2017.

O teste *Oncotype DX* é um ensaio de 21 genes que prediz a eficácia da hormonioterapia para pacientes com tumores em estágios iniciais (estádio I e II) que sejam RE-positivo e não apresentem acometimento linfonodal. Este teste é baseado em reações de RT-PCR, classifica tumores com baixo, intermediário ou alto *score* de recorrência, no qual pacientes com baixo *score* de recorrência apresentam maior benefício no tratamento apenas com tamoxifeno. A população de estudo abordada neste teste é unicamente americana (ALBAIN et al., 2009; HARRIS et al., 2007).

O *Mammaprint* é baseado em uma plataforma de microarranjos de cDNA contendo 70 genes e apresenta uma assinatura prognóstica do risco de desenvolvimento de metástases à distância em pacientes com câncer de mama que não apresentam comprometimento linfonodal. Esse teste também tem o intuito de melhorar a seleção dos pacientes que serão beneficiados pelo tratamento quimioterápico sistêmico adjuvante. O *Mammaprint* teve início estudando população unicamente holandesa e em alguns anos foi expandindo-se pela Europa, alcançando toda união europeia (VAN DE VIJVER et al., 2009; STRAVER et al., 2010; ESPINOSA et al., 2009).

Mapquant inclui 97 genes dividindo os pacientes em duas categorias tumores com alto risco *versus* baixo risco de recorrência. Os pacientes alinhados em grupos de alto risco são aconselhados a receber a quimioterapia adjuvante (LOI et al., 2007).

O teste *Breast BioClassifier* é baseado em um ensaio de RT-qPCR que avalia 55 genes e classifica-os de acordo com os receptores hormonais e subtipos moleculares (luminal A, luminal B, *basal-like* e enriquecido-HER2) (PEROU et al., 2000).

O *THEROS Breast Cancer Index®* (BCI) é uma combinação do teste

HOXB13:IL17BR (H/I) e do *Molecular Grade Index* (MGI), onde esta combinação tem por finalidade melhorar os fatores de predição para o melhor tratamento em pacientes com tumores ER positivos e linfonodos negativos (ARPINO et al., 2013).

O teste *Mammostrat* é um teste que utiliza abordagens de imunohistoquímica, é preconizada a avaliação de cinco biomarcadores que medem principalmente o grau de proliferação ou o estado dos receptores hormonais (BARTLETT et al., 2010).

O *PAM-50 Breast Cancer Intrinsic Classifier* assay (NanoString, ARUP Laboratories, Salt Lake City, UT) analisa um painel de 50 genes, que acredita-se serem inerentes aos subtipos moleculares, em material de tumor embebido em parafina, através de RT-PCR e classifica o tumor individualmente no subtipo molecular que é mais similar (ALLISON, 2012).

O *EndoPredict* assay é um teste utilizado para prever riscos de metástase em pacientes com câncer de mama, que possuam receptor de estrógeno positivo e HER2 negativo (MÜLLER et al., 2013).

Por fim o *Prosigna* foi aprovado pelo FDA em 2013 para uso em mulheres na pós-menopausa com tumores RE-positivos com ou sem envolvimento linfonodal. Este ensaio envolve a extração de RNA de tecido parafinado, seguido por avaliação da expressão gênica usando tecnologia de codificação digital por *barcoding*. O ensaio pode ser realizado em qualquer laboratório clínico certificado por *Improvement Amendments* (CLIA), o sistema de análise utilizado é o *NanoCounter* da *NanoString*, o qual analisa a expressão de 50 genes classificadores e cinco genes de controle para categorizar as amostras de câncer de mama dos quatro subtipos intrínsecos (luminal A, luminal B, HER2-enriquecido e basal-like) (KWA et al., 2017).

Apesar da busca por marcadores, a maioria dos tratamentos oncológicos ainda beneficia apenas uma pequena proporção de pacientes, o que leva a efeitos adversos desnecessários e altos custos de tratamento pelo fato destes não responderem adequadamente à escolha clínica. Neste contexto, é essencial que as novas drogas sejam desenvolvidas em paralelo com testes preditivos (KOH et al., 2008).

Assim como os biomarcadores tradicionais, que apresentam divergências na sensibilidade e especificidade para determinada patologia, os testes genéticos possuem controvérsias em suas validações e nem sempre são ideais para serem aplicados em decorrência da heterogeneidade dos tumores de mama. Por exemplo, em nenhum dos testes exemplificados há um consenso para tumores HER positivos e avançados (SAPINO et al., 2013).

O *Oncotype DX*®, talvez o mais realizado e confiável entre as validações, apresenta uma faixa de resultado intermediária, que traz dúvidas, para médico e paciente, sobre qual conduta tomar. Quimioterapia ou não quimioterapia? No mesmo cenário, o *MammaPrint*, embora exclua esta faixa intermediária, apresenta taxas de recorrência superiores ao *Oncotype DX*®. Por fim, o *PAM-50*, bastante pretensioso, ainda apresenta dúvidas e ausência de vantagens sobre os demais testes no mercado, sendo necessários mais estudos para comprovar sua eficiência. Em recente publicação, há crescentes evidências da utilização destes testes moleculares na prática clínica, trazendo validação prognóstica para alto e baixo risco de necessidade de tratamento e quimioterapia, assim como de validação de recorrências a partir de cinco anos da data da cirurgia (PARKER et al., 2009).

Uma consequência direta da seleção dos pacientes será a definição de novos subgrupos, o que enfatiza a necessidade de trabalhar em grupos cooperativos para encontrar pacientes elegíveis para os ensaios clínicos. Assim as assinaturas genéticas passaram a fazer parte da propedêutica clínica de rotina ajudando na tomada de decisões clínicas (AMIR et al., 2010; KARLSSON et al., 2010).

2.7 ALVOS TERAPÊUTICOS PARA O CÂNCER DE MAMA

O primeiro grande avanço em busca da terapia individualizada do câncer de mama foi a possibilidade de identificação dos receptores de estrógeno (RE) e de progesterona (RP). Os tumores positivos para RE (RE⁺), cujo crescimento depende de estímulo hormonal, são eficazmente tratados com terapia antiestrogênio, seja pelo uso de antagonistas do RE, como o tamoxifeno, ou pela inibição da síntese endógena, com inibidores da aromatase, tais como: anastrozol e letrozol (LIN & WINER, 2008).

Os inibidores de aromatase são uma opção ao tamoxifeno para pacientes em pós-menopausa e a conduta atual sugere que, após cinco anos de terapia com tamoxifeno, as pacientes sejam transferidas para um inibidor de aromatase (GUARNERI et al., 2006).

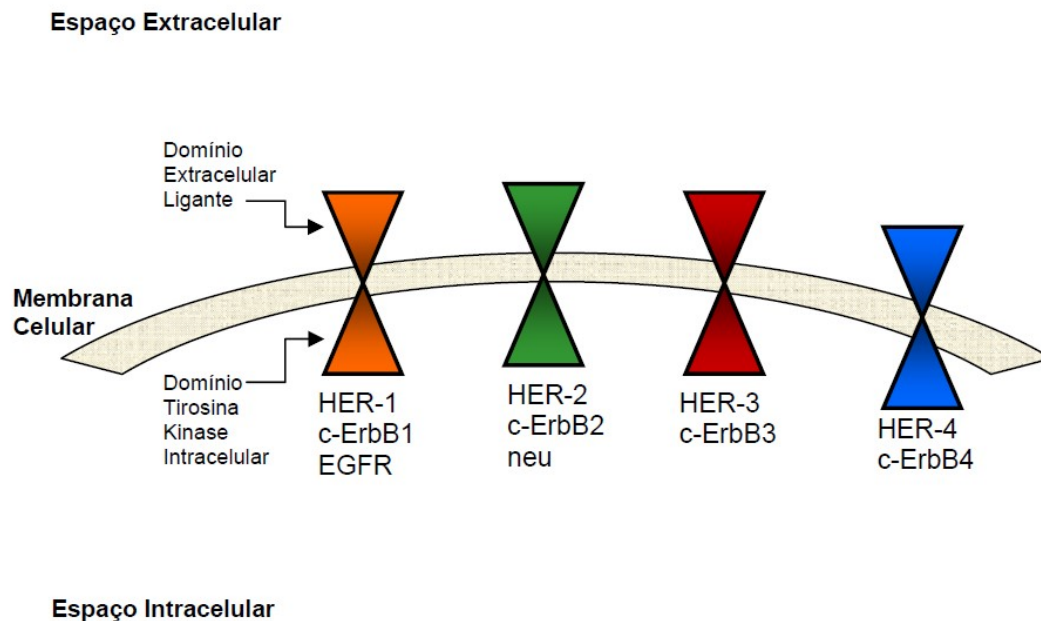
Tumores negativos para RE (RE⁻) não apresentam proliferação dependente de estrogênio e, portanto, não apresentam indicação para terapia com tamoxifeno ou com inibidores de aromatase. Por outro lado, tais tumores são mais sensíveis às combinações de quimioterápicos de primeira linha, envolvendo antraciclina e taxanos. Outro marcador tumoral bem caracterizado é o Receptor do Fator de Crescimento

Epidérmico Humano 2 (HER2). O HER2 foi identificado como um marcador de pior prognóstico e de maior agressividade do câncer. O prognóstico dos tumores positivos para HER2 (HER2⁺) alterou-se significativamente com a inclusão de trastuzumab, um anticorpo monoclonal com especificidade para o receptor HER2 (LEVEQUE et al., 2008).

2.8 FAMÍLIA HER

As células epiteliais da mama estão sob influência de uma gama de hormônios e fatores de crescimento. Os receptores de fatores de crescimento com atividade tirosino-quinase estão entre os mais estudados e têm sido subclassificados em diferentes famílias baseado na estrutura de seus domínios extracelular ligante e quinase intracelular e a natureza de seus ligantes ativos. Neste grupo está a família dos receptores de fatores de crescimento epidermal humano (ErbB), composta por quatro receptores envolvidos em vias de sinalização celular que regulam a atividade proliferativa: EGFR ou HER-1 (c-Erb-b1), HER-2/neu (c-Erb-b2), HER-3 (c-Erb-b3) e HER-4 (c-Erb-b4) (Figura 9). Essas moléculas compreendem o tipo I de 20 famílias de receptores tirosino-quinases (RTKs) (BARROS et al., 2010).

Figura 9. Família dos receptores de fatores de crescimento epidermal humano (ErbB).



Fonte: Adaptado de LASTRAIOLI et al., 2012.

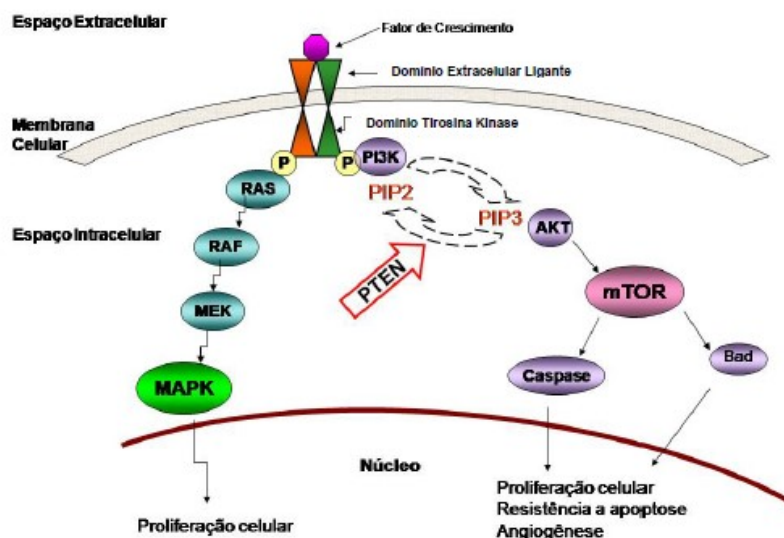
2.9 VIAS DE SINALIZAÇÃO

Os receptores da família HER exercem sua função através de ligação com fator de crescimento e formação de dímeros com um receptor do mesmo tipo (homodímero) ou de outro da mesma família (heterodímero). Os ligantes ou fatores de crescimento são conhecidos para HER-1, HER-3 e HER-4 (BARROS et al., 2010). Homodímeros de HER-3 não tem atividade tirosina quinase, embora o HER-3 exerça esta atividade na forma de heterodímero. O HER-2 não tem ligante conhecido, porém, pode sofrer homodimerização independente do ligante em situações de superexpressão, como a que ocorre em alguns carcinomas de mama (GORI et al., 2009).

O resultado da dimerização é a fosforilação dos resíduos de tirosina das tirosina-quinases das subunidades do receptor dimerizado e depois das proteínas sinalizadoras intracelulares ativadas por estes receptores. Dessa maneira, desencadeiam-se os múltiplos processos celulares relacionados principalmente ao controle da proliferação, estímulo da angiogênese e regulação da apoptose. Sua ação envolve pelo menos duas importantes vias de sinalização intracelular: a via da MAPK (*mitogen-activated protein kinase* ou proteína quinase ativada por mitógenos) que envolve a cascata de fosforilação do produto de proto-oncogene RAS seguido do

RAF e ativação da quinase MEK, culminando com a proliferação celular, e a via de AKT/PKB (proteína quinase B) que através da proteína mTOR (*mammalian target of rapamycin*), está implicada na inibição da apoptose, aumento da proliferação celular e estímulo da angiogênese (DILLON et al., 2007) (Figura 10).

Figura 10. Vias de sinalização MAPK e AKT.



Fonte: DILLON et al., 2007.

A ativação da via PI3K pode ocorrer em resposta a uma variedade de sinais extracelulares, seja através do receptor de fator de crescimento ou do receptor de integrina. Essa ativação do receptor ocorre através da subunidade p85 da PI3K, via seu domínio SH2 para resíduos de fosfotirosina localizados dentro do receptor. Uma vez recrutada para a membrana celular, a subunidade catalítica p110 da PI3K fosforila fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato (PIP2) gerando fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3) (SAAL et al., 2007). Uma vez feita a fosforilação de PIP2 para PIP3, AKT é recrutada e medeia várias funções celulares implicadas na sobrevivência celular, tendo como substratos a mTOR, molécula importante no crescimento celular, algumas proteínas envolvidas com a inibição da proliferação, como p21 e p27, e várias moléculas envolvidas com a inibição da apoptose, como as caspases e Bad (TOKUNAGA et al., 2007).

A atividade do PI3K sofre oposição do PTEN (*phosphatase and tensin homolog*), importante produto de gene supressor, que remove uma molécula de fosfato do PIP3, regenerando PIP2 e atenuando os efeitos da cascata de sinalização

do PI3K ativado (SAAL et al., 2007). Dessa forma, a regulação negativa da via do PI3K pelo PTEN é essencial para a manutenção do delicado balanço que controla o crescimento celular e a perda da função deste supressor tumoral proporciona um ambiente favorável a tumorigênese (BANNEAU et al., 2010).

2.10 BIOINFORMÁTICA

Com a descoberta de Watson e Crick em 1953, de que o DNA é estruturado como dupla hélice e a posterior descoberta do código genético e do fluxo de informação biológica dos ácidos nucleicos para proteínas, definiu-se um novo ramo da biologia, a biologia molecular, mas ainda não era possível ler a informação guardada no código genético (WATSON, 2004).

Na década de 40 foi inventado o computador digital, que foi chamado de digital por utilizar dígitos binários (zeros e uns) para armazenar informações e sua lógica também é digital baseada no fundamento de ligado ou desligado (SETUBAL, 2003). O que de certa forma fez com que ele se tornasse o parceiro ideal para lidar com dados genéticos, pois a informação genética também é digital, só que com um alfabeto quaternário A, T, C, G (Adenina, Timina, Citosina, Guanina), as bases nitrogenadas que armazenam a “informação genética”. Interessantemente, até certo ponto, os genes também têm um comportamento digital, pois podem ser “ligados” ou “desligados”. Apesar dessas similaridades, somente após muitos anos surgiu a bioinformática, pois foi preciso esperar até a década de 80 para o aparecimento dos primeiros equipamentos que permitissem a “leitura”, ou sequenciamento do código genético. Além disso, a computação também precisou evoluir, com máquinas capazes de armazenar cada vez mais dados e processá-las com maior velocidade. Com esta evolução paralela, foi na década de 90 que a bioinformática ganhou destaque no mundo científico (DINIZ & CANDURI, 2017).

Há na literatura diferentes interpretações do conceito de Bioinformática. Na sua definição ampla, a Bioinformática envolve a aplicação de tecnologia de informação computacional (TIC) nas análises de qualquer área da Biologia (COSTA, 2004).

De forma mais restrita, a Bioinformática é a aplicação de informática aos experimentos de Biologia Molecular, ou mais especificamente, de Genômica. Também se advoga que Bioinformática aplica os princípios da Ciência da Informação para interpretar dados biológicos, enquanto a Biologia Computacional aplica os algoritmos

matemáticos e computacionais aos experimentos biológicos (CATANHO et al., 2007). Como trabalho foca em uma organização biofarmacêutica voltada à pesquisa em câncer, define-se Bioinformática como os experimentos de Genômica, Proteômica e Dinâmica Molecular que se apoiam em ferramentas de TIC para conduzir suas análises (PITASSI et al., 2014).

Os softwares usados em Bioinformática envolvem a construção de armazéns de dados, apoiando-se em web semântica, ontologias e inteligência artificial para capturar e tratar dados distribuídos por inúmeras fontes (HEATH, 2005). A existência de base dados clínicos permite a aplicação de poderosas técnicas de mineração em análises epidemiológicas, testes clínicos e Genômica, permitindo estabelecer associações entre doenças e novos tratamentos para grupo de pacientes com padrões genéticos específicos (PITASSI et al., 2014). Experimentos em Genômica, Proteômica e Dinâmica Molecular estão constantemente produzindo novos dados, correlacionando-os, por meio de análise, aos dados já existentes, o que requer sofisticadas ferramentas de busca e *screening* (HEATH, 2005) (DINIZ & CANDURI, 2017)

Estudos de Bioinformática requerem a análise de múltiplos sequenciamentos genéticos, tornando a manipulação manual de dados praticamente impossível (VERONA et al., 2006). O uso no ramo biofarmacêutico de sistemas computadorizados acoplados à modelagem matemática permitiu a realização de experimentos que processam uma grande quantidade de dados em curto espaço de tempo (MACMULLEN, 2005). Ferramentas de *High Throughput Screening* (HTS) são consideradas habilitadoras importantes na descoberta de novas drogas e são definidas como uma coleção de tecnologias, geralmente envolvendo softwares matemáticos, banco de dados, robótica, ótica, instrumentos para manipulação de líquidos e técnicas de visualização, aplicadas nas fases “hit-to-lead” das pesquisas *in vitro* (PITASSI et al., 2014).

2.11 TÉCNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR PARA O DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA

2.11.1 Sequenciamento de Nova Geração- SNG

O advento da tecnologia dos sequenciadores de nova geração, as quais promovem o sequenciamento do DNA em plataformas capazes de gerar informações

sobre milhões de pares de bases em uma única corrida, está revolucionando não só o conhecimento sobre estudos de variantes alélicas, SNPs (*single nucleotide polymorphism*) como também o desenvolvimento de marcadores biológicos para detecção do câncer, sendo assim uma espécie de impressão digital mutacional dos agentes cancerígenos que agora poderão ser determinados numa escala em todo o genoma (CARVALHO & SILVA, 2010).

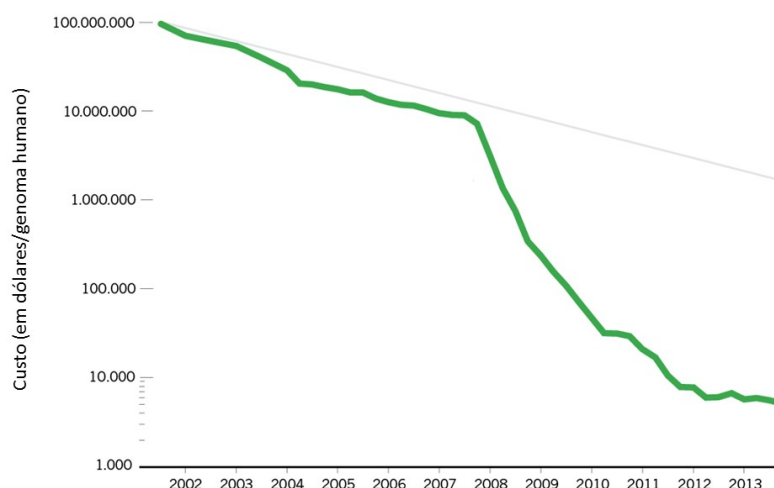
Adicionalmente, com esta tecnologia é possível fazer o levantamento do perfil do genoma humano no câncer e revelar as impressões digitais atribuídas a fatores ambientais (LIU et al., 2010).

O surgimento do sequenciamento de nova geração (SNG) tem proporcionado novas abordagens com alto nível de confiabilidade para testes de diagnóstico. Estas tecnologias em rápida evolução demonstraram vantagens sobre sequenciamento por eletroforese capilar de Sanger, tais como a capacidade para gerar gigabases (GB) de dados, útil para detectar mosaicismos genéticos (LIU et al., 2012; SUZUKI et al., 2011).

A partir de 2005, diversas plataformas de SNG surgiram no mercado, rapidamente tornando o sequenciamento de larga escala mais rápido, barato e acessível (MARDIS, 2011).

Nos últimos 12 anos o custo do sequenciamento genético apresentou queda exponencial (Figura 11), tornando o SNG uma prática cotidiana em diversos laboratórios de pesquisa e diagnóstico no mundo todo, expandindo o escopo de descobertas tanto no nível individual como populacional. Ao mesmo tempo em que a geração de dados de SNG cresceu, uma série de ferramentas computacionais foram desenvolvidas com intenção de acelerar a capacidade de análise desses dados, aumentando o campo de intersecção entre a biologia molecular e informática, assim consolidando a área de atuação conhecida hoje como bioinformática. Tais processos computacionais levaram ao surgimento de programas de encadeamento de dados (*pipelines*) específicos para SNG, sendo peças fundamentais no tipo e na qualidade da análise desejada (PABINGER et al., 2014).

Figura 11. Queda no custo de sequenciamento de DNA no período de 2002 a 2013 (em dólares/genoma humano).



Fonte: Adaptado de HAYDEN, 2014.

A alta capacidade de geração de dados, somada ao constante desenvolvimento de *pipelines* levou o SNG a apresentar um largo espectro de aplicações na pesquisa científica, sendo utilizado não apenas no estudo de genomas completos, como também em conjuntos específicos de genes, regiões regulatórias do genoma, sequenciamento de RNA, entre outras técnicas passíveis de aplicação tanto para seres procariotos como eucariotos (SHENDURE & LIEBERMAN, 2012).

No que diz respeito aos cuidados com a saúde humana, e mais especificamente ao câncer de mama, o SNG tem como principais aplicações o sequenciamento de regiões de mutações, não se limitando apenas a alguns grupos de genes (também chamados de “painéis genéticos”) já envolvidos com a doença de interesse, apresentando a finalidade de encontrar alterações em regiões codificantes para as quais se possa atribuir causalidade direta a um fenótipo observado (BAMSHAD et al., 2011).

No entanto, as plataformas atuais de SNGs tem alguns pontos fracos, incluindo o tempo de sequenciamento, a escalabilidade da amostra, e custo de entrada, que precisam ser enfrentadas para que essas tecnologias venham a ser utilizados para fins de diagnóstico de rotina. Além disso, a quantidade total de dados produzidos é tipicamente excessiva mesmo para um pequeno número de genes (JENSEN et al., 2010).

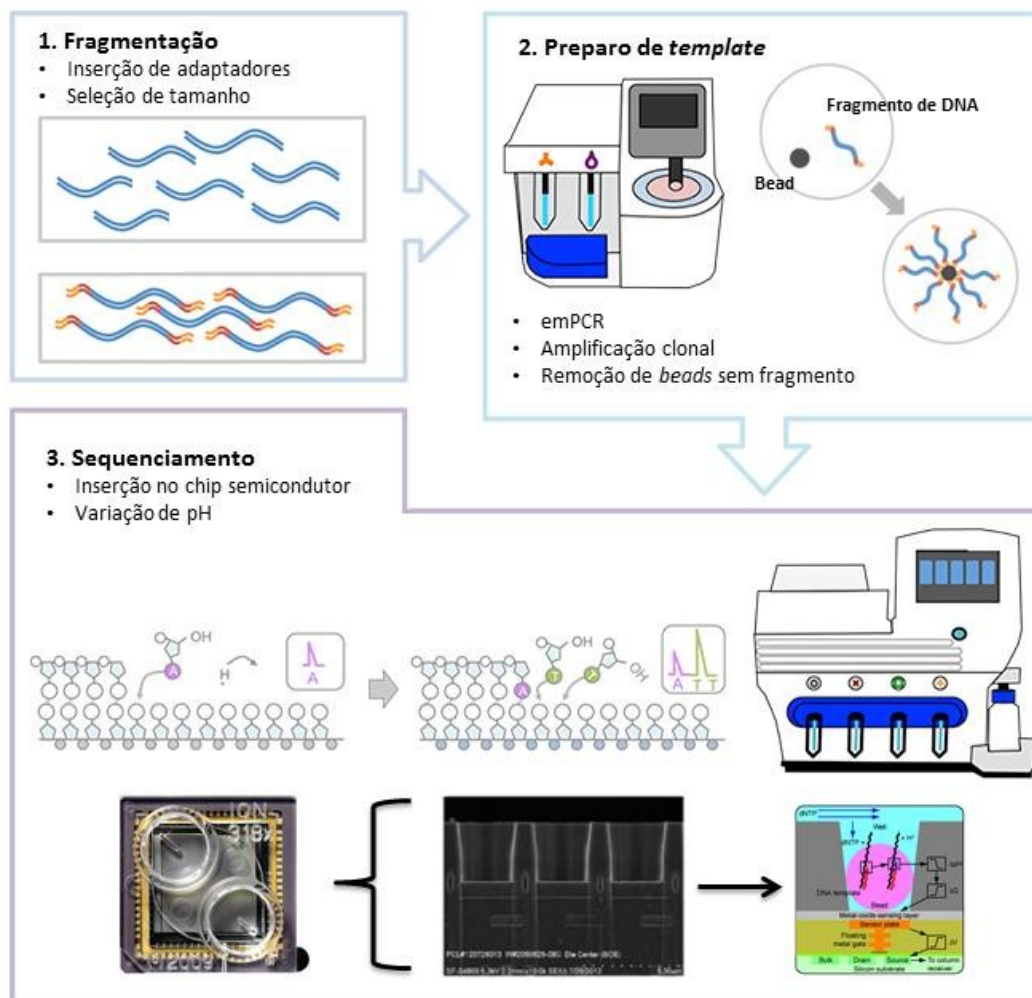
2.11.2 Plataforma *Ion Torrent PGM*

Lançada em 2011, a plataforma Ion Torrent PGM™ (Life Technologies, Thermo Scientific) foi apresentada como um sequenciador de bancada (*benchtop*), direcionado para sequenciamento de pequenos genomas e/ou grupos de genes. Foi a primeira a apresentar uma química de sequenciamento totalmente independente de moléculas modificadas, sem uso de nucleotídeos fluorescentes, o que dispensa o uso de aparatos ópticos, tornando tanto o equipamento como seus reagentes mais baratos (MERRIMAN et al., 2012).

O fluxo de bancada completo inclui três etapas: 1) Construção da biblioteca, 2) Preparo de *template* e 3) Sequenciamento em chip de semicondutor (Figura 10). A construção de biblioteca inicia-se com a fragmentação do DNA de interesse, seja por via enzimática ou mecânica. Em seguida, os fragmentos recebem em suas extremidades dois adaptadores de DNA com sequência conhecida (denominados A e P1), os quais são essenciais para garantir o seu sequenciamento (Figura 12, Paine 1). Caso haja intenção de se processar mais de uma amostra por corrida de sequenciamento, são utilizados juntos a esses adaptadores sequências denominadas *barcodes*, as quais são específicas para cada amostra, permitindo que no momento da análise cada amostra seja devidamente separada (MERRIMAN et al., 2012).

Geralmente nesse passo, também se realiza uma seleção de tamanho de fragmentos para que a maioria dos fragmentos a serem sequenciados estejam entre 200 e 400pb (MERRIMAN et al., 2012).

Figura 12. Etapas envolvidas no processo de sequenciamento na plataforma Ion Torrent PGM™.



Fonte: BRAGG et al., 2013.

Preparados os fragmentos, estes são encaminhados para o preparo de *template*, cuja principal etapa é a PCR em emulsão (emPCR), a qual consiste na amplificação clonal dos fragmentos dentro de micelas geradas em uma solução emulsionada. Dentro de cada microrreator há um grânulo magnético (*bead*) com sequências de DNA na superfície, no qual um fragmento se acoplará através de seu adaptador P1 (Figura 12, Paine 2). A amplificação clonal dos fragmentos ocorre através do pareamento dos sítios de ligação dos *primers* presentes nos adaptadores e, conseqüentemente, com a extensão de uma nova fita de DNA. Terminado o tempo da emPCR, uma fase de enriquecimento separará os *beads* acoplados à fragmentos dos não acoplados, e aqueles selecionados serão inseridos no chip semiconductor e encaminhados para o equipamento, onde acontecerá a reação de sequenciamento

(MERRIMAN et al., 2012).

Na última etapa, a amostra já devidamente preparada é inserida em um chip semicondutor, o qual é constituído por poços de diâmetro micrométrico nos quais as *beads* com DNA serão depositados para sequenciamento. Cada poço recebe uma *bead* e embaixo de cada um há um aparato semicondutor capaz de detectar variações elétricas. Assim, o equipamento passa a fornecer às *beads* os quatro nucleotídeos (A,C, T ou G) soltos, porém sempre um de cada vez, nunca misturados. Caso haja a incorporação de algum nucleotídeo em algum fragmento de DNA, a ligação fosfodiéster gerada liberará íons de hidrogênio no meio, alterando o pH e fazendo com que essa variação seja detectada pelos semicondutores. Assim, sempre que houver o fornecimento de um nucleotídeo seguido de variação de pH, significa que aquela base foi incorporada, permitindo a geração de sequências ao final do processo (MERRIMAN et al., 2012).

O tempo total de sequenciamento pode chegar a 5 horas, porém ao final do processo podem ser lidas mais de um bilhão de pares de bases (>1Gb), fazendo dessa plataforma uma técnica extremamente eficaz no que diz respeito ao consumo de tempo na geração de dados brutos (TSONGALIS et al., 2014).

2.11.3 PCR quantitativo em tempo real (qPCR)

A técnica de PCR quantitativo em tempo real é um dos métodos mais utilizados para a quantificação da expressão gênica devido à sua dinamicidade, sensibilidade, especificidade e alta reprodutibilidade, não havendo necessidade de processos pós- amplificação e (WONG & MEDRANO, 2005).

O RT-qPCR difere do PCR clássico por detectar o produto de reação a cada ciclo durante a reação. Assim, esta técnica permite o acompanhamento da amplificação durante a fase exponencial da reação e uma determinação precisa da quantidade de material presente (GACHON et al., 2004). Para tanto, existem diversos métodos de detecção que podem ser utilizados no PCR em tempo real, dentre estes, os mais comuns são o *SYBR Green*, *TaqMan* e *Molecular Beacons*. O *SYBR Green* liga-se entre a fita dupla de DNA e com a excitação da luz emitida pelo sistema óptico do termociclador, emite uma fluorescência verde. As vantagens da utilização do *SYBR Green* são: baixo custo, facilidade no uso e sensibilidade (BRUCE et al., 2004).

A *TaqMan* é uma sonda utilizada para detectar sequências específicas nos fragmentos de DNA amplificados na PCR. Essa sonda apresenta em uma das extremidades um fluoróforo e na outra extremidade um *quencher* (molécula que aceita energia do fluoróforo na forma de luz e a dissipa na forma de luz ou calor). Os produtos da reação são detectados pela fluorescência gerada após a atividade exonuclease 5'→3' da *Taq* DNA polimerase. Durante a PCR em tempo real a sonda *TaqMan* hibridiza com a sequência da fita simples de DNA complementar alvo para a amplificação (NOVAIS & PIRES-ALVEZ, 2004).

Molecular beacons são oligonucleotídeos usados como sondas de fita simples que formam uma estrutura secundária entre a extremidade 5' e 3', chamada de haste-e-loop. O loop contém uma sequência que é complementar a sequência-alvo e a haste é formada pelo anelamento das sequências complementares que estão localizadas nas extremidades (TSYBULSKY et al., 2016).

Em geral, existem dois métodos de avaliação em *REAL TIME PCR*: quantificação absoluta e relativa. Por quantificação absoluta uma curva padrão tem de ser gerado, o que é um processo trabalhoso, demorado e um procedimento caro. Em contrapartida, para a quantificação relativa tem que ter apenas uma normalização do gene de expressão para um gene de referência. O gene de referência é chamado gene repórter porque é expresso ubiquamente. Genes repórteres mais utilizados são GAPDH ou beta-actina (ZEBISCH et al., 2012).

O PCR em Tempo Real é amplamente utilizado para a detecção e análise de células de tumor em material sólido e sangue em diversos cânceres incluindo o câncer de mama (WADDELL et al., 2010; DEVONSHIRE et al., 2013).

Mas o desafio futuro será a combinação de métodos como PCR em Tempo Real com métodos de sequenciamento de nova geração (SNG) (DEVONSHIRE et al., 2013). Tal combinação deverá levar a uma análise mais precisa de amostras de tumores além da determinação do prognóstico e do benefício do tratamento com base nestes novos métodos de biologia molecular (AZIM et al., 2012).

A pesquisa de biomarcadores eficazes, utilizando ferramentas de moleculares e de bioinformática, pode favorecer a prática clínica, tanto no diagnóstico precoce do câncer de mama como no prognóstico e predição nesta neoplasia. Muitas novas terapias direcionadas em breve estarão disponíveis para testes clínicos, mas estudos mais amplos são necessários para identificar subgrupos específicos de pacientes que irão se beneficiar desses tratamentos em nossa população.

3 RESULTADOS

3.1 CLINICAL AND MOLECULAR ASPECTS OF BREAST CANCER: TARGETS AND THERAPIES

Artigo publicado no periódico *Biomedicine and Pharmacotherapy*, fator de impacto 2,79.

Biomedicine & Pharmacotherapy 106 (2018) 14–34



Contents lists available at ScienceDirect

Biomedicine & Pharmacotherapy

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bioph



Review

Clinical and molecular aspects of breast cancer: Targets and therapies

R.L.N. Godone^{a,1}, G.M. Leitão^{a,b,1}, N.B. Araújo^a, C.H.M. Castelletti^{a,c}, J.L. Lima-Filho^{d,e}, D.B.G. Martins^{a,e,*}

^a Molecular Prospection and Bioinformatics Group, Laboratory Keizo Asami of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil

^b Clinical Hospital of Pernambuco – Professor Romero Marques, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil

^c Agronomic Institute of Pernambuco (IPA), Recife, Pernambuco, Brazil

^d Laboratory Keizo Asami of Immunopathology (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil

^e Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco (UFPE), Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

Biological markers
Molecular targeted therapy
Breast cancer

ABSTRACT

Breast Cancer is a complex disease characterized by the occurrence of multiple molecular alterations. Currently, some molecular markers are in use for breast cancer diagnostic, prognostic, and predictive purposes. Thus, genetic signatures are available for improving the decision-making. The biomarkers are also essential as therapeutic approaches, but many questions remain due to the lack of efficacy on breast cancer treatment, mainly for triple-negative breast cancer subtype. Since the genetic profile of breast cancer can also be related to different ethnic groups and geographic areas, the reference populations of the genetic assays and clinical trials need to include a broader population beyond the European and North American patients. In this review, we analyzed the current and potential molecular markers that could help to improve the strategies for breast cancer therapy.

1. Introduction

Cancer is a multifactorial disease with a striking heterogeneity due to genetic, epigenetic and transcriptional changes involving a myriad of genes and proteins. While these factors are relevant to clinical prognosis and medical treatment, a broad approach is needed to unravel the complexities underlying carcinogenesis mechanisms [1]. The breast cancer is the second most common cancer in the world and, by far, the most frequent cancer among women. It is the most frequent cause of cancer death in women in less developed regions (324,000), and the second in more developed ones (198,000) [2], but more equally distributed compared to other cancers across regions [3].

Nowadays, we are tackling the precision oncology era whose patients can be treated according to their genetic profile [4]. In breast cancer research, the goal in the field of oncogenomics is to respond to relevant clinical issues related to patients whose tumors will remain inactive for a long time, the appropriate targeted therapy according to the adjuvant scenario, and the most effective approach to improve the life quality of these patients [5]. Despite advances in innovative clinical trial designs, intratumoral and intertumoral heterogeneity persist as challenges [6].

An overview in breast cancer genomes demonstrated remarkable

genomic complexity and variability. Individual tumors often carry aberrations that deregulate hundreds or even thousands of genes, which can occur at various levels such as chromosomal, gene replication, transcription, and epigenetics [7]. Although genetic variants in breast cancer can be related to either geographic areas or ethnic groups, the reference populations of the leading commercial tests are European and North American. It is undeniable that development of molecular panels of genetic mutations and gene expression is helping the therapeutic decision, but it is not taking into account all the genetic variability of this neoplasm across the globe. This review summarizes the main molecules studied in prognostic and predictive assays, discusses the molecules used for targeted therapy in breast cancer and underlines new potential biomarkers.

2. Molecular markers in breast cancer

The discovery of the first significant breast cancer susceptibility gene *BRCA1* occurred in 1994, highlighting the inheritance of a mutation in *BRCA1* and *BRCA2* as a risk factor. These tumor suppressors genes are involved in critical functions, like DNA damage response (DDR) and DNA repair [8]. The identification of women at high risk of breast and ovarian cancer is not easy since the loss of one copy of

* Corresponding author at: Av. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária – CEP: 50690-701, Universidade Federal de Pernambuco, Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA), Setor de Prospecção Molecular, Brazil.

E-mail address: bruneska@prospecmol.org (D.B.G. Martins).

¹ These authors contributed equally to the study.

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2018.06.066>

Received 20 January 2018; Received in revised form 1 June 2018; Accepted 13 June 2018
0753-3322/ © 2018 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

3.2 ANALYSIS OF THE EXPRESSION AND MUTATION THE THREE RECEPTOR TYROSINE KINASES, RET, PDGFRA AND ERBB4 IN TUMORS BREAST

Artigo a ser submetido ao periódico: *Clinical Genetics*. Fator de Impacto 3,9.

ANALYSIS OF THE EXPRESSION AND MUTATION THE THREE RECEPTOR TYROSINE KINASES, RET, PDGFRA AND ERBB4 IN TUMORS BREAST

GODONE, R.L.N.^{1*}; ARAÚJO, N.B.¹; FERREIRA FILHO, D. L.²; CASTELLETTI, C.H.M.¹; LIMA-FILHO, J.L.¹; MARTINS, D.B.G.¹

1 Grupo de Prospeção Molecular e Bioinformática (PropescMol), Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) and Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego, 1235 Cidade Universitária, Recife, PE CEP 50670-901, Brazil.

2 Barão de Lucena Hospital, Mastology Service, Av. Caxangá, 3860 Cordeiro, Recife, PE CEP 50731-000, Brazil.

* Author for correspondence: Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA), Federal University of Pernambuco (UFPE), Av. Prof. Moraes Rego s/n, Cidade Universitária, CEP 50670-901, Recife – PE, Brasil. robertagodone@hotmail.com.

Abstract:

Breast cancer is the most common malignancy and the leading cause of cancer deaths in women worldwide. Breast tumors are characterized by a complex biological behavior, which prognosis and evolution could be confirmed through molecular studies. Receptor tyrosine kinases (RTKs) may facilitate tumor progression if activated aberrantly. Because of their potential role in the genesis/progression of several tumors, RTKs represent potential therapeutic targets and different strategies have been developed to inhibit their function. These studies can be important for determine the best treatment for the patient, once genetic variants of breast cancer are related to different characteristics of molecular subtypes, as clinical stage, tumor size, grade and presence

or absence of hormone receptors. The aim of this study was to analyse levels of expression and mutations on RTKs in breast tumors. We demonstrate, that overexpression of RET, PDGFRA and ERBB4 has been associated with the Luminal subtype in breast cancer. Also we showed novel mutations in RET, PDGFRA and ERBB4 genes in the triple negative breast cancer. Thus, this study demonstrates the necessity of studies molecular markers, as RTKs in human cancers in order to develop personalized drugs or combination therapies to effectively target individual, breast cancer-specific mutations.

Keywords: Breast Cancer; Receptor Tyrosine Kinase; Expression; Mutation; Targeted Therapy

Introduction:

Breast cancer is one of the most common causes of cancer related death in women over the world (1), is a heterogeneous disease that consists of diverse disease subtypes that each has prognostic and predictive value (2). Traditionally, breast cancer has been classified into three distinct subtypes: hormone receptor (HR)-positive breast cancer, in which tumors overexpress estrogen receptors (ERs) and/or progesterone receptors (PRs); human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)-positive breast cancer, which is driven by the oncogene HER2 (also known as ERBB2 or NEU); and triple-negative breast cancer (TNBCs), which do not overexpress ER, PR or HER2 (3).

The ability of cancer cells to resist the growth inhibitory and cytotoxic actions of chemotherapeutic agents reflects their capacity to undergo the equivalent of molecular evolution and develop survival strategies. Multiple mechanism(s) have been identified as being responsible for cancer cell chemo resistance/drug tolerance, these range from acquisition of survival-enhancing mutations in key signaling molecules to “switching” between different receptor-driven signaling pathways, to the induction of transporter protein expression enabling efflux of drug (4).

Receptors of the tyrosine kinase family play an important role in the integration and interpretation of diverse extracellular stimuli, allowing a cell to respond appropriately to its environment. Alterations in receptor tyrosine kinase (RTK) expression and activation, and in the signalling molecules that lie downstream of the receptors play important roles in the development of cancer (5).

The recent identification of oncogenic mutations that spatially deregulate

specific RTKs, spatial deregulation is likely to be a primary consequence of other well-known oncogenic mutations and phenotypic hallmarks of tumor cells. For example, overexpression, amplification or mutation of RTKs themselves can alter their spatial distribution, thereby contributing to the formation of tumors more resistant to some therapies. Gene amplification or overexpression is a common mechanism of RTK deregulation in many cancers that not only yields increased surface abundance and signalling, but that is also likely to alter the lateral distribution, clustering and dimeric partnering of RTKs (6). Deregulated RTK signalling has been causally implicated in the development and progression of nearly all types of cancer, prompting a major effort to develop and test pharmacological inhibitors of various RTKs (7). In this scenario the receptors tyrosine kinase has emerged as a potential target to enhance sensitivity of cancers including of breast to sensitize tumors that have resistance some therapy, as endocrine (8).

In this study, we evaluated the expression and mutation of RTKs: RET, PDGFRA, ErbB4 and its influence on the intrinsic characteristics of tumors and therapies used in breast cancer patients.

Materials and Methods:

Patients and Breast cancer samples

A total of 42 patients were enrolled in this study, from December 2013 to May 2014. Fragments of fresh tumors were collected at the time of surgical procedure at Barão de Lucena Hospital, Recife, Brazil. According to histological analysis, 31 patients were diagnosed with Invasive Ductal Carcinoma (IDC) Breast Cancer, being 07 Triple Negative Breast Cancer (TNBC) and 24 ER+ patients. Tumors histologically classified as HER2+ subtype (n=2), Lobular (n=2), Micropapilar (n=1), Mucinous (n=2) and Papilar (n=1), as well tumors not classified (n=3) were excluded. Tissues from the healthy opposite breast were obtained from four patients during an oncoplastic surgery (procedure realized immediately after the excision of the tumor from other breast). All patients signed the informed consent for research and attended to a short questionnaire to provide personal data. Clinical details were retrieved from their medical records.

All fragment tissues were conserved in TRIzol® Reagent (Life Technologies) and stored in freezer at -20°C until extraction procedure.

Analysis Expressions

RNA Extraction

RNA was obtained using respectively QIAasympohony® DSP DNA Kit (QIAGEN) and QIAasympohony® RNA Kit (QIAGEN), dedicated to QIAasympohony system, according to the instructions. All sample eluates were quantified using NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Scientific), then RNA samples were stored at -80°C.

cDNA Conversion

cDNA was synthesized and amplified by using QuantiTect Reverse Transcription Kit (QIAGEN), quantified using NanoDrop™ Spectrophotometer (Thermo Scientific) and stored at -20°C.

qPCR analysis for mRNA expression

All primers (RET, PDGFRA and ERBB4) were obtained from QIAGEN, diluted and stored according to manufacturer's instructions. Quantitative real-time polymerase chain reaction (qPCR) was performed in Rotor-Gene Q (QIAGEN), using GoTaq® qPCR Master Mix (Promega), according the instruction of the manufacturer. All samples, as well NTCs (non-template control), were tested twice and melting curve analysis was performed to check the specificity of all reactions. Only duplicates with standard deviation (SD) lower than 1.00 in quantification cycle (Ct) were accepted. Relative quantification of target gene expression was performed according to the comparative Ct method using β -actin as an endogenous control.

Mutation Analysis (NGS Assay)

Library Preparation and Sequencing

An Ion Torrent adapter-ligated library was constructed with the Ion AmpliSeq Library Kit 2.0 (Life Technologies) as per manufacturer's protocol. Briefly, 50 ng of pooled amplicons were end-repaired, and Ion Torrent adapters P1 and A were ligated with DNA ligase. Adapter-ligated products were then purified with AMPure beads (Beckman Coulter, Brea, CA, USA), nick-translated, and PCR-amplified for a total of 5 cycles. The resulting library was purified with AMPure beads (Beckman Coulter), and the concentration and size of the library was determined by Qubit 2.0 fluorometric quantitation (Life Technologies). Sample emulsion PCR, emulsion breaking, and enrichment were performed using the Ion PGM 200 Xpress Template Kit (Life

Technologies), according to the manufacturer's instructions. Briefly, an input concentration of one DNA template copy/Ion Sphere Particles (ISPs) was added to emulsion PCR master mix and the OT2 (Life Technologies) was used to generate the emulsion. Next, ISPs were recovered and template-positive ISPs were enriched for use with Dynabeads MyOne Streptavidin C1 beads (Life Technologies). The Qubit 2.0 fluorometer (Life Technologies) was used to confirm ISP enrichment. 314 chips were used to sequence barcoded samples on the Ion Torrent PGM, and an Ion PGM 200 Sequencing Kit (Life Technologies) was used for sequencing reactions, as per the recommended protocol.

Bioinformatic Analysis

Variant Calling

Data from the PGM runs were processed initially using the Ion Torrent platform-specific pipeline software Torrent Suite to generate sequence reads, trim adapter sequences, filter, and remove poor signal-profile reads. Initial variant calling from the Ion AmpliSeq sequencing data was generated using Torrent Suite Software v3.2 with a plug-in "variant caller v3.2" program.

Experimental Validation

We used the COSMIC3 (version 72), MyCancerGenome database (<http://www.mycancergenome.org/>) and some publications to assess mutations reappearing in breast cancer. In order to find regions of mutations in the RET, PDGFRA and ErbB4 genes, we used the software feature CLC Mean Workbench 6.

Statistical analysis

GraphPad Prism version 5.0 for Windows™ was used in all calculations. Mann-Whitney test was used to compare gene expressions between two groups. Correlation analysis was performed by Pearson test to parametric variables and by Spearman test to nonparametric variables. All p-values are two-sided and considered significant when $p < 0.05$.

Results:

Description of breast cancer cases

A total of 29 cases of breast tumor were selected between December 2014 and May

2015. The overall patient age range was 34–100 years (mean and median 54 years). Tumor size range was 1–6 cm (mean 2.9 cm, median 2 cm). Most patients 22 (76%) were ER+/PR±/HER2- in tissue immunohistochemistry analysis, against 7 (24%) that were triple negative (ER-/PR-/HER2-).

Besides, the patients were categorized based on their family history of BC, Node Involvement, clinical staging (TNM) and prognosis (NPI) (Table 1).

Expression of RET, PDGFRA and ERBB4 according to molecular subtype

The expression of RET, PDGFRA and ERBB4 was examined in different subtypes of breast cancer. RET and ERBB4 expressions levels were slightly enhanced in breast cancer tissues compared to healthy tissues from the opposite breast, although without statistically significance.

Already, PDGFRA expression levels was higher in healthy opposite breasts tissues than in breast cancers tissues. The high expression of RET, PDGFRA and ERBB4 was more commonly observed in luminal subtypes of breast cancer ($p=0,0020$, $p=0,0024$ and $p=0,0002$, respectively). While the expressions RET, PDGFRA and ERBB4 were not significantly relevant to the TNBC subtype (Figure 1).

Correlation between Different Expressions of RET, PDGFRA and ERBB4 in Breast Cancer

The RET expression level when correlated with the expression PDGFRA were significant ($p=0,0399$). On the other hand, RET expression level also had correlation significant when compared with ERBB4 ($p=0,0315$).

Furthermore, when it was made the correlation of gene expression levels RET, PDGFRA and ErbB4, classifying them by molecular subtype of breast cancer (LBC and TNBC), showing that there was no significant relevance of expression levels. These results demonstrate that expression levels among genes studied are not associated at the molecular phenotype (Figure 2).

Analysis of Genes Expression Levels in Patients Submitted to Chemotherapy

Our next investigation was to consider whether the expression levels of RET, PDGFRA and ERBB4 had any relationship with chemotherapy treatment in patients. We found that there was a statistically significant relationship between PDGFRA lower expression and patients who made treatment chemotherapy ($p=0,0020$) (Figure 3).

The ErbB4 expression levels were also lower in patients who have made the use of chemotherapy, but it was not significantly relevant. It was observed high levels expression RET, when it is compared with patients submitted chemotherapy, in the meantime not been found significant relevance.

RET, PDGFRA and ERBB4 Expression in Breast Cancer Correlates with Clinicopathologic Features

There was an significantly association between the overexpression of RET and staging breast cancer ($p= 0,0289$). PDGFRA expressions levels were slightly enhanced in breast cancer on clinical stage I, while ERBB4 high expression levels were on clinical stage III. There was no statistically significant when using other clinicopathologic factors, as: Node Involvement, Clinical staging and Prognosis (Table 2).

Mutation Analysis and Coverage of Samples

For the analysis of mutations in breast cancer samples was used panel personalized cancer mutation (Ion AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel v2) designed to target 50 key cancer genes: ABL1, AKT1, ALK, APC, ATM, BRAF, CDH1, CDKN2A, CSF1R, CTNNB1, EGFR, ERBB2, ERBB4, EZH2, FBXW7, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FLT3, GNAS, GNA11, GNAQ, HNF1A, HRAS, IDH1, IDH2, JAK2, JAK3, KDR, KIT, KRAS, MET, MLH1, MPL, NOTCH1, NPM1, NRAS, PDGFRA, PIK3CA, PTEN, PTPN11, RB1, RET, SMAD4, SMARCB1, SMO, SRC, STK11, TP53, and VHL.

The mean uniformity of base coverage TNBC sample was 95,52%, percent base reads on target was 83,88% and average reads per amplicon at least 355,6 reads. Already, the mean uniformity of base coverage Luminal samples was 97,09%, percent base reads on target was 88,81% and average reads per amplicon at least 140,15 reads.

Distribution of Mutations in Genes Involved with Breast Cancer

This study it was able to identify novel mutations in different genes in breast cancer patients. The three genes containing novel mutations are RET, ERBB4 (HER-4) and PDGFRA (Table 3). RET mutations was focused in exons 13, position 43613843 and causing the exchange of bases G/T.

The mutations found in the RET gene are the single-nucleotide polymorphism type (SNP) with an mean allelic frequency of 68.23%, causing change of amino acid leucine at position 769 (Leu/Leu). The PDGFRA gene is located on 4q12 chromosome

and spans 69.15 kb genomic DNA encompassing 23 exons. PDGFRA mutations was found in exon 13, position 55141055 and causing the exchange of bases A/G, with an mean allelic frequency of 83,7%.

The location where this mutation is, affects the amino acid proline at position 567 (Pro/Pro). ERBB4 gene is known to produce functionally distinct isoforms as a result of alternative splicing, located between exons 15b -16 and also in exon 26. ERBB4 mutations were found between exons 25 -26, position 212812097 and causing the exchange of bases T/C. Mutation of the ErbB4 gene for it is a intron region, you cannot precisely locate which amino acid will be affected and what position. All mutations detected in our sample set by Ion Torrent sequencing were single-nucleotide polymorphism (SNP).

Discussion

Our results from the present study indicated differential expression of RET, PDGFRA and ERBB4 in distinct molecular subtypes of breast cancer. Different molecular subtypes of breast cancer exhibit various clinical, histological, molecular, and therapeutic features, possibly owing to different cancer cell characteristics (9). The present study showed high expression of all genes in subtype Luminal breast cancer.

RET, PDGFRA and ERBB4 are members Receptor Tyrosine Kinases (RTK) and are associated with many process related of the development, tumoral dissemination, regulation of growth, metabolism, cell size, motility, and survival (10). A RTK is a transmembrane receptor protein that upon binding of its ligand initiate an intracellular signal cascade ultimately leading to changes in the cell's gene expression phenotype (11).

Our data demonstrate relation with the high expression of RET, PDGFRA and ERBB4 in Luminal subtypes of breast cancer. RET is expressed in 30-70% of invasive breast cancers, with expression being relatively more frequent in estrogen receptor positive tumors when compared with normal breast tissues (12).

Overexpression of PDGFRa in breast cancer has been associated with tumor progression and in the metastasis process. Differing of our findings the PDGFRA has recently been associated with Basal-like breast cancer (11), however other studies correlate the expression of PDGFRA with Luminal subtypes to breast cancer (13, 14).

ErbB4 has been reported to induce cell apoptosis, possibly through modulation of cell death pathways, and might therefore be related to a good prognosis in breast

cancer. Studies indicate a positive association between ErbB4 expression and the Luminal breast cancer (15, 16).

RTKs are key elements in human oncogenic transformation and important therapeutic targets (17). In this study we show that expression of RET, PDGFRA and ERBB4 can be correlated with clinicopathologic features in breast cancer as: Clinical staging and chemotherapy treatment. Furthermore, we found mutations focused along three hotspot loci, RET, PDGFRA and ERBB4 in the TNBC subtypes of our sample set.

Recently there has been interest in searching for novel therapeutic targets in breast cancers, not only and specifically oncogenic drivers of the disease but also modulators of response to therapy. Receptor tyrosine kinases have emerged as an important family of proteins implicated in the modulation of response to therapy. Thus, RET can be effectively inhibited by several small-molecule tyrosine kinase inhibitors (TKIs) that have been developed to target other RTKs (18).

Previous studies have identified tyrosine kinase-activating mutations in breast cancer are characterized by amplification or overexpression of receptor tyrosine kinases such as HER2, EGFR, IGFR and FGFR1 that can drive tumor growth (19, 20).

The great success of targeted therapies has fostered this change of view. Along these lines, RET gained a high visibility because it was described as an oncogene various controller cancers as thyroid cancer, lung and breast cancer (21).

The PDGFRA to be a receptor tyrosine kinase, have attracted great interest as a therapeutic target in the treatment of various diseases such as gastrointestinal stromal tumors and breast. Previous studies have shown strong evidence between mutations and overexpression of the PDGFRA gene with aggressiveness parameters, and presence of regional lymph node metastasis (22).

Despite of active research on ERBB4 biology in normal mammary tissue and breast cancer, significance of ERBB4 for breast carcinogenesis is still poorly understood. Previous study showed that a single nucleotide polymorphism (SNP) 2782 G.T in the promoter region of ERBB4 gene is a novel risk variant for breast cancer in German population (23). Two recent studies have also discovered variants of ERBB4 gene that are associated with increased risk for breast cancer. According to the Catalogue Of Somatic Mutations In Cancer (COSMIC), somatic ERBB4 mutations in breast cancer are rare (24). Some studies suggest that patients having mutation in the gene ErbB4 acquire resistance to trastuzumab-based chemotherapy in the metastatic setting (25).

The use of tyrosine-kinase inhibitors is important in treating these patients. The combination of tyrosin-kinase inhibitor as RET gene, with multiple targets are already being tested in breast cancer patients and obtained results (26).

As regards PDGFRA genetic an alteration has demonstrating that activating mutations a major role in the development in tumors such as Clowdin-Low and TNBC. As regards PDGFRA genetic alterations has demonstrating that activating mutations have high importance in the development in breast tumors. It has also been shown that this receptor can be a therapeutic target for developed of drugs (22, 27).

ErbB4 could become one of the prognostic factors, and the ErbB4 signaling mechanism might be a potential therapeutic target (23).

Conclusion:

In conclusion, this study demonstrated that the expression level RET, PDGFRA and ERBB4 are associated to the breast cancer subtype Luminal. No correlation between genes expression and TNBC breast cancer. On the other hand, we found novel mutations in TNBC breast cancer, in genes potentially associated with target therapies. As there is increasing information about the changes in breast cancer cells in recent times, newer drugs that specifically target these changes have been developed. These targeted drugs either work synergistically with the chemo drugs or by themselves with less toxicity due to a selective effect to a more systemic modulation. However, we need further investigation of the signaling mechanism, especially these genes, RET, PDGFRA and ERBB4 to explain the phenotypic heterogeneity observed within defined breast cancer subtypes.

Acknowledgements

The authors acknowledge the assistance of National Counsel of Technological and Scientific Development (CNPq), Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES), Foundation for Science and Technology of the State of Pernambuco (FACEPE) and to all clinicians and patients.

Conflict of interest

The authors declare no conflict of interest.

References:

1. Ferlay, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1 .0, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. (IARC CancerBase, 11).
2. Abdelkrim S B, Trabelsi A, Missaoui N et al. Distribution of molecular breast cancer subtypes among Tunisian women and correlation with histopathological parameters: A study of 194 patients *Pathology – Research and Practice* 2010;206: 772–775.
3. Reis-Filho J S, Puztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction *Lancet* 2011; 378: 1812–23.
4. Dawood S. Triple-Negative Breast Cancer Epidemiology and Management Options *Drugs* 2010; 70 (17): 2247-2258.
5. Couch F J., Hart S N., Sharma P et al. Inherited Mutations in 17 Breast Cancer Susceptibility Genes Among a Large Triple-Negative Breast Cancer Cohort Unselected for Family History of Breast Cancer *Journal of Clinical Oncology* 2014.
6. Bauer K R, Brown M, Cress R D et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)- negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry *Cancer* 2007; 109: 1721-8.
7. Foulkes W D., Smith I E., Reis-Filho J S. Triple-Negative Breast Cancer *The new England journal of medicine* 2010; 363:1938-48.
8. Ellis P, Barrett-Lee P, Johnson L et al. Sequential docetaxel as adjuvant chemotherapy for early breast cancer (TACT): an open-label, phase III, randomised controlled trial *Lancet* 2009;373:1681-92.
9. Park S Y, Kim H M, Koo J S. Differential Expression of cancer-associated fibroblast-related proteins according to molecular subtype and stromal histology in breast cancer *Breast cancer Res Treat* 2015; 149: 727-741.
10. Chakrabarty A, Sánchez V, Kuba M G et al. Feedback upregulation of HER3 (ErbB3) expression and activity attenuates antitumor effect of PI3K inhibitors *PNAS* 2012; 109: 2718–2723.
11. Jansson S, Bendahl P, Grabau D A et al. The Three Receptor Tyrosine Kinases c-KIT, VEGFR2 and PDGFR α , Closely Spaced at 4q12, Show Increased Protein Expression in Triple-Negative Breast Cancer *PLOS ONE* 2014: e102176.
12. Mulligan L M. RET revisited: expanding the oncogenic portfolio *Nature Reviews -Cancer* 2014: 14.

13. Stalker L, Pemberton J, Moorehead R A. Inhibition of proliferation and migration of luminal and claudin-low breast cancer cells by PDGFR inhibitors *Cancer Cell International* 2014; 14: 89.
14. Weigel M T, Banerjee S, Arnedos M et al. Enhanced expression of the PDGFR/Abl signaling pathway in aromatase inhibitor-resistant breast cancer *Annals of Oncology Advance* 2012; 00: 1-8.
15. Fujiwara S, Ibusuki M, Yamamoto S et al. Association of ErbB1–4 expression in invasive breast cancer with clinicopathological characteristics and prognosis *Breast Cancer* 2012; DOI 10.1007/s12282-012-0415-5.
16. Veikkolainen V, Vaparanta K, Halkilahti K et al. Function of ERBB4 is determined by alternative splicing *Cell Cycle* 2011; 10: 2647-57.
17. Templeton A J, Diez-Gonzalez L, Ace O et al. Prognostic relevance of receptor tyrosine kinase expression in breast cancer: A meta-analysis *Cancer Treatment Reviews* 2014; 40: 1048-55.
18. Knowles, P P et al. Structure and chemical inhibition of the RET tyrosine kinase domain *J Biol Chem* 2006; 281: 33577–33587.
19. Morandi, A et al. GDNF-RET signaling in ER-positive breast cancers is a key determinant of response and resistance to aromatase inhibitors *Cancer Res* 2013; 73: 3783–3795.
20. deGraffenried, L A et al. Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity *Clin Cancer Res* 2004; 10: 8059–8067.
21. Menacho P, Mologni L, McDonald N Q. Mechanisms of RET signaling in cancer: Current and future implications for targeted therapy *Cellular Signalling* 2014; 26: 1743-1752.
22. Zhu Y, Wang Y, Guan B et al. C-kit and PDGFRA gene mutations in triple negative breast cancer *Int J Clin Exp Pathol* 2014; 7(7):4280-4285.
23. Rokavec M, Justenhoven C, Schroth W, Istrate MA, Haas S et al. A novel polymorphism in the promoter region of ERBB4 is associated with breast and colorectal cancer risk. *Clin Cancer Res* 2007; 13: 7506–7514.
24. Kurppa K J, Rokavec M, Sundvall M et al. ERBB4 Promoter Polymorphism Is Associated with Poor Distant Disease-Free Survival in High-Risk Early Breast Cancer *PLOS ONE* 2014; 9.

25. Boulbes D R. , Arold S T. , Chauhan G B et al. HER family kinase domain mutations promote tumor progression and can predict response to treatment in human breast cancer Molecular Oncology 2015: 9: 586 e600.
26. Baselga J, et al. SOLTI-0701: A multinational double-blind, randomized phase 2b study evaluating the efficacy and safety of sorafenib compared to placebo when administered in combination with capecitabine in patients with locally advanced or metastatic breast cancer (BC) Cancer Res 2009: 69.
27. Lehmann B D. PG 3.02 Heterogeneity of triple negative subtype: gene expression profile and phenotype The Breast 2015: 24, Supplement 1: S6.

Table 1. Patient clinical-pathological parameters in breast cancer

Characteristics	Total (n=29) (%)	Median
Age (years)		
≤ 50	10 (34.4)	47.50
>50	19 (65.6)	57.50
Adjuvant Therapy		
No	9 (31)	N/A
Yes	20 (69)	
Imunohistochemistry		
ER±/ PR±/ HER2-	22 (75.9)	N/A
Triple Negative	7 (24.1)	
Ki67		
<14%	5 (17.2)	5%
>14%	13 (44.8)	30%
N/A	6 (20.7)	
Tumor Size		
<2 cm	8 (27.5)	1.6 cm
2-5 cm	18 (62)	2.4 cm
>5 cm	2 (6.9)	7 cm
N/A	1 (3.4)	
Node Involvement		N/A
No	14 (48.2)	
Yes	15 (51.7)	
1-3 nodes	6 (20.7)	
4-9 nodes	6 (20.7)	
>10 nodes	2 (6.9)	
Clinical staging (TNM)		N/A
Stage I	7 (24.1)	
Stage II	13 (44.8)	
Stage III	14 (48.2)	
Prognosis (NPI)		N/A
Good	14 (48.2)	
Moderate	13 (44.8)	
Bad	2 (6.9)	

N/A Not Available.

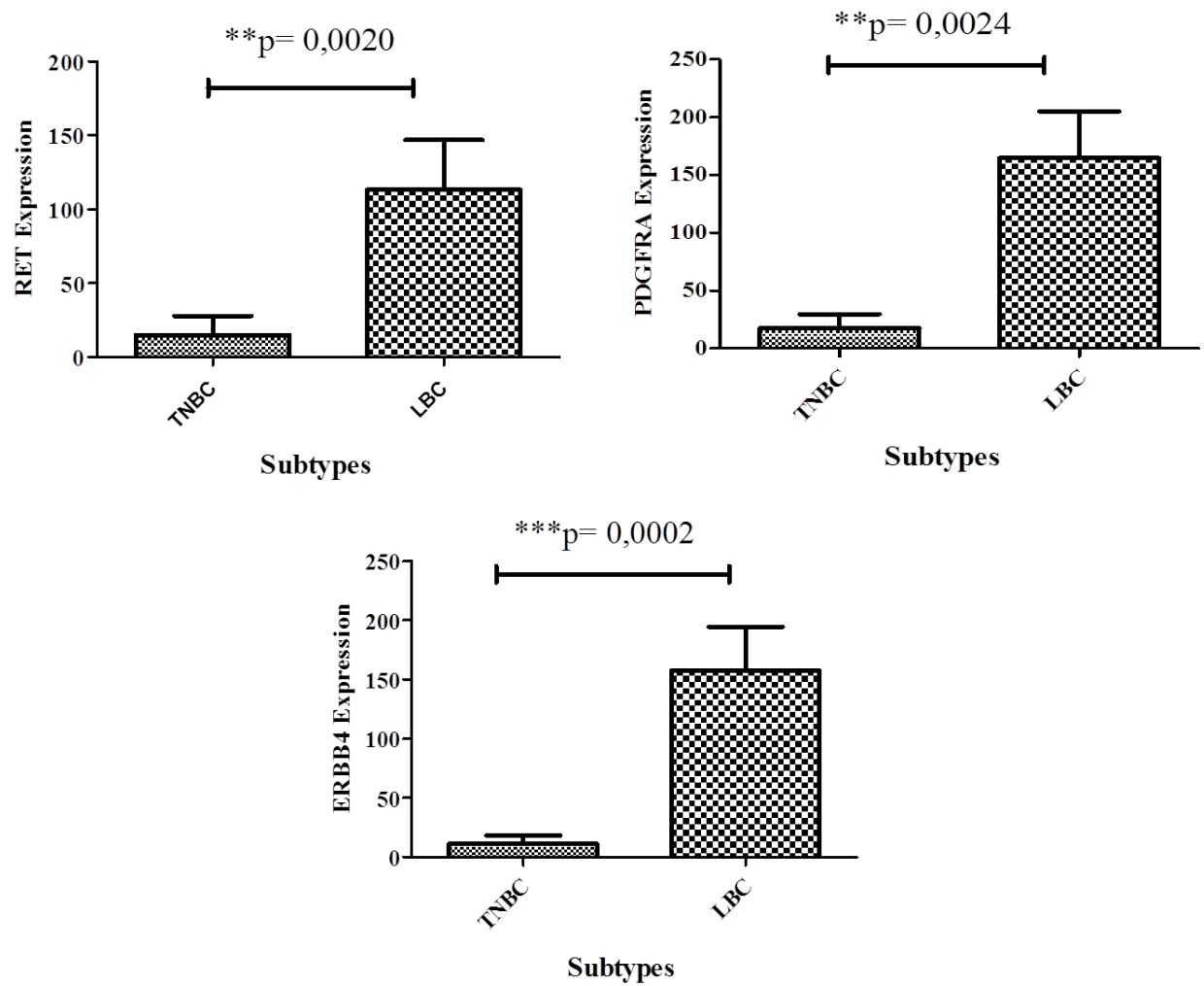


Figure 1. Relationship between levels expression of RET, PDGFRA and ERBB4 in different subtypes breast cancer. Relationship between RET with different subtypes breast cancer (A), PDGFRA (B) and ERBB4 (C). TNBC (Triple-negative breast cancer) and LBC (Luminal breast cancer).

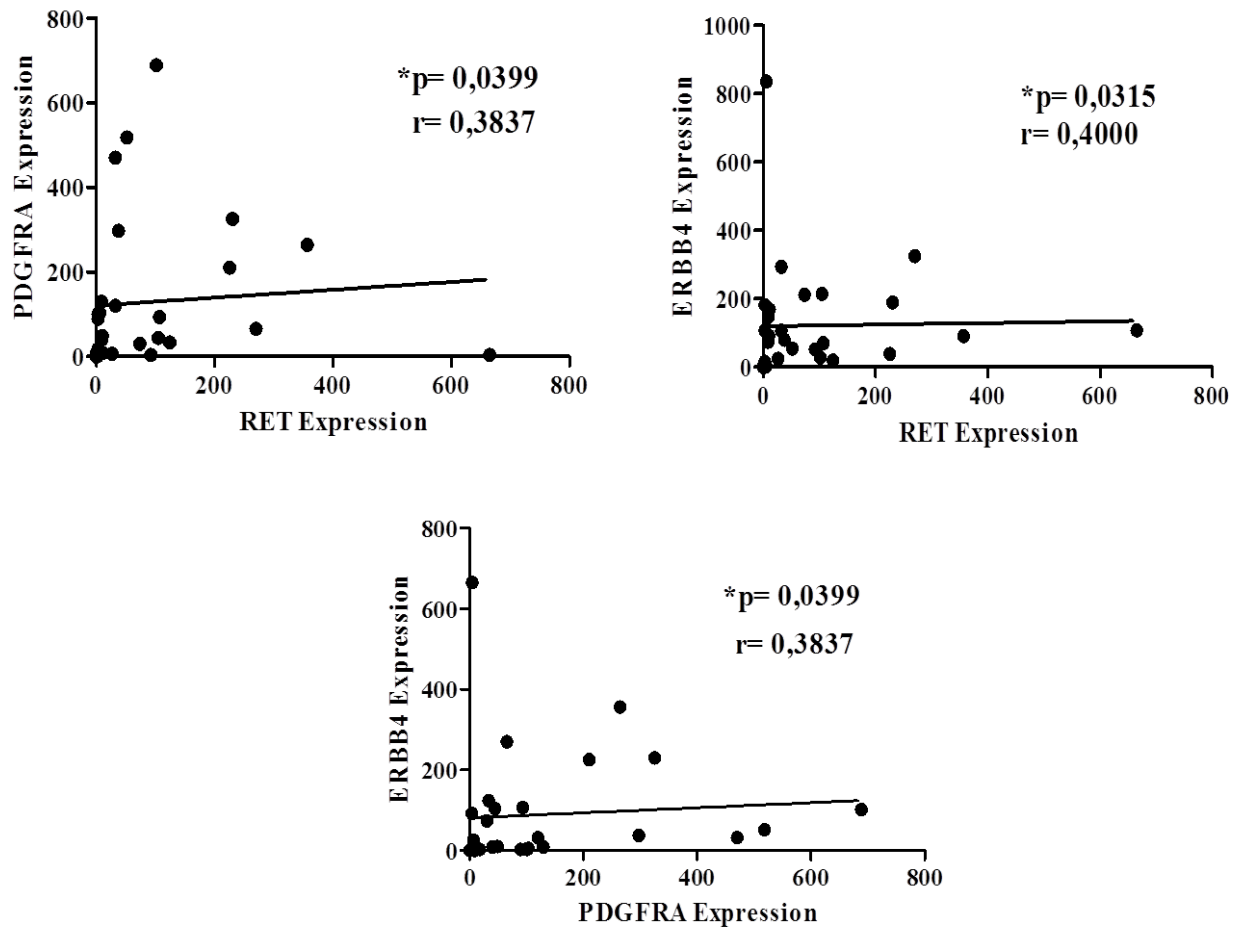


Figure 2. Correlation between PDGFRA expression with RET (A), ERBB4 expression with RET (B) and ERBB4 expression with PDGFRA (C).

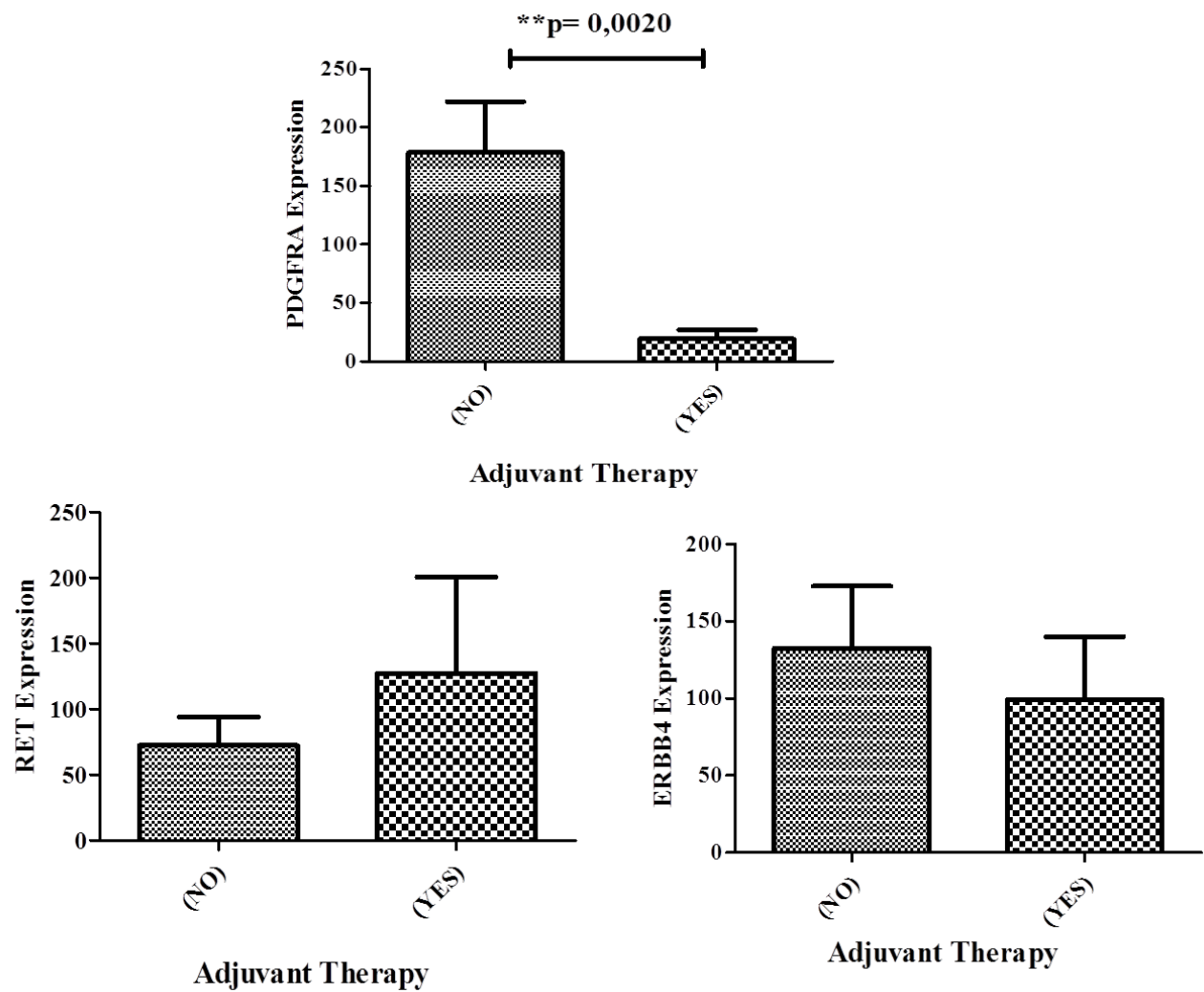


Figure 3. Relationship between expression levels of RET, PDGFRA and ERBB4 with adjuvant therapy in breast cancer patients. Relationship between expression levels of PDGFRA with adjuvant therapy (A), Relationship between expression levels of RET with adjuvant therapy (B), Relationship between expression levels of ERBB4 with adjuvant therapy (C).

Table 2. Expression of RET, PDGFRA and ERBB4 according to clinicopathologic characteristics of tumors breast.

Parameters	n (%)	RET Expression Median	<i>p value</i>	PDGFRA Expression Median	<i>p value</i>	ERBB4 Expressio n Median	<i>p value</i>
Age (years)							
≤ 50	10 (34.4)	44.68	0.6629	57.4	0.8724	62.4	0.5059
>50	19 (65.6)	11.37		44.56		106.7	
Adjuvant Therapy							
No	9 (31)	32.28	0.6543	102.03	0.0020**	85.65	0.4366
Yes	20 (69)	26.5		8.04		24.21	
Imunohistochemistry							
ER±/ PR±/ HER2-	22 (75.9)	44.68	0.0020**	97.26	0.0024**	106.7	0.0002***
Triple Negative	7 (24.1)	2.28		5.65		2.5	
Tumor Size							
<2 cm	8 (27.5)	62.22		57.4		71.62	0.5085
2-5 cm	18 (62)	10.27	0.2972	91.64	0.8587	77.63	
>5 cm	2 (6.9)	49.95		18.64		118.09	
N/A	1 (3.4)	-		-		-	
Node Involvement							
No	14 (48.2)	29.33		57.4		99.51	
Yes	15 (51.7)	32.4	0.9226	44.56	0.4715	70.41	0.3593
1-3 nodes	6 (20.7)	5.83		55.04		82.96	
4-9 nodes	6 (20.7)	72.08		82.31		53.37	
>10 nodes	2 (6.9)	53.36		50.79		36.23	
Clinical staging (TNM)							
Stage I	7 (24.1)	106.72	0.0289*	93.55	0.5272	90.99	0.2301
Stage II	13 (44.8)	5.31		33.54		28.99	
Stage III	14 (48.2)	11.37		40.16		108.21	
Prognosis (NPI)							
Good	14 (48.2)	29.33	0.6104	57.4	0.4233	99.5	0.3081
Moderate	13 (44.8)	32.4		44.56		54.48	
Bad	2 (6.9)	53.36		50.79		36.23	

N/A Not Available * statistical significance (p<0.05)

Table 3. Mutation distribution in the RET, PDGFRA and ERBB4.

Gene	Chromosome	Position	Mutation	Allele change	Allele Source	Amino Acid Translation
RET	Chr 10	43613843	SNP	G/T	Novel	Leu769Leu
PDGFRA	Chr 4	55141055	SNP	A/G	Novel	Pro567Pro
ERBB4	Chr 2	212812097	SNP	T/C	Novel	N/A

Chr: chromosome; SNP: single nucleotide polymorphisms; Leu: Leucine; Pro: Proline;
N/A: Not available.

4 CONCLUSÕES

Através da análise de bioinformática, foi possível fazer a curagem e compilação de dados de genes associados à neoplasias mamárias, correlacionando-os com os subtipos moleculares de cada câncer, além de determinar moléculas-alvo capazes de direcionar a terapia através da medicina personalizada;

O desenvolvimento de novas estratégias capazes de associar os subtipos moleculares de cancer de mama com as diferentes raças, etnias e outros aspectos clínicos, pode contribuir com o direcionamento do tratamento de cada paciente, melhorando seu prognóstico;

Os três principais marcadores moleculares correlacionados com a desregulação da expressão gênica foram RET, PDGFRA e ERBB4. Após análise em pacientes positivas para câncer de mama, foi verificado que os genes mutados estão associados ao subtipo luminal;

É importante ressaltar que os três genes estudados (RET, PDGFRA e ERBB4) estão relacionados a receptores do tipo tirosina-quinase e possuem grande importância no desenvolvimento de novas moléculas-alvo na terapia direcionada, sendo importantes;

As patentes depositadas no INPI abordam as análises de bioinformática que forneceram dados para a montagem de dois painéis genéticos, um para análise de mutação e outro da expressão gênica do câncer de mama, possuindo potencial de diagnóstico, prognóstico e predição de neoplasias mamárias.

Determinar expressão e a integridade gênica dos principais marcadores moleculares para câncer de mama;

Correlacionar os achados genômicos e de expressão para determinação dos marcadores mais relevantes para diagnóstico e prognóstico de câncer de mama;

Determinar os aspectos farmacogenômicos dos pacientes considerados bons e maus-respondedores ao tratamento utilizado.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL G, RAMAKANT P, FORGACH ER, RENDON JC, CHAPARRO JM, BASURTO CS, et al. Breast cancer care in developing countries. **World J Surg.** 33(10): 2069–76. 2009.
- ALBAIN KS, BARLOW WE, SHAK S, HORTOBAGYI GN, LIVINGSTON RB, YE H I-T, et al. Prediction of 10-Year Chemotherapy Benefit and Breast Cancer-Specific Survival by the 21-Gene Recurrence Score (RS) Assay in Node-Positive, ER-Positive Breast Cancer – An Update of SWOG-8814 (INT0100). In: **San Antonio Breast Cancer Symposium.** LBA 112. 2009.
- ALLISON, K. H. Molecular pathology of breast cancer: what a pathologist needs to know. **American journal of clinical pathology,** 138(6), 770–80. 2012.
- AMIR E , CLEMONS M , PURDIE CA , MILLER N , QUINLAN P , GEDDIE W, COLEMAN RE , FREEDMAN OC , JORDAN LB , THOMPSON AM . Tissue confirmation of disease recurrence in patients with breast cancer: Pooled analysis of two large prospective studies. In: **Proc Am Soc Clin Oncol,** abs 1007: Chicago; 2010.
- ARPINO G, GENERALI D, SAPINO A, DEL MATRO L, FRASSOLDATI A, DE LAURENTIS M, PAOLO P, MUSTACCHI G, CAZZANIGA M, DE PLACIDO S, CONTE P, CAPPELLETTI M, ZANONI V, ANTONELLI A, MARTINOTTI M, PUGLISI F, BERRUTI A, BOTTINI A, DOGLIOTTI L. Gene expression profiling in breast cancer: a clinical perspective. **Breast.** 22, 109-20. 2013.
- AXELROD D, SMITH J, KORNREICH D, GRINSTEAD E, SINGH B, CANGIARELLA J, et al. Breast cancer in young women. **J Am Coll Surg.** 206(6):1193–203. 2008.
- BAADE PD, YOULDEN DR, CHAMBERS SK. When do I know I am cured? Using conditional estimates to provide better information about cancer survival prospects. **Med J Aust.** 194(2):73–7. 2011.
- BAMSHAD MJ, NG SB, BIGHAM AW, TABOR HK, EMOND MJ, NICKERSON DA, SHENDURE J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. **Nat Rev Genet.** 2011.
- BANNEAU, G., et al., Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations. **Breast Cancer Res,** 12(4): p. R63, 2010.
- BARON. JOHN A.; Screening for cancer with molecular markers: progress comes with potential problems. **Nature Reviews Cancer** 12, 368-371. 2012.
- BARROS, F.F., et al., Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments. **Histopathology,** 56(5): p. 560- 72, 2010.
- BARTLETT JM, THOMAS J, ROSS DT, SEITZ RS, RING BZ, BECK RA, et al.

Breast Cancer Res, 2010.

BATEMAN, A.C. Breast Pathology. **Basic Science. Surgery**, 25(6): 245-250, 2007.

BIANCHINI G, BALKO JM, MAYER IA, SANDERS ME, GIANNI L. Triple-negative breast cancer: challenges and opportunities of a heterogeneous disease. **Nat Rev Clin Oncol**. Nov;13(11):674-690. 2016.

BONNEFOI H, UNDERHILL C, IGGO R, CAMERON D. Predictive signatures for chemotherapy sensitivity in breast cancer: are they ready for use in the clinic? **Eur J Cancer** 2009. 45:1733–43. 2009.

BRAGG LM, STONE G, BUTLER MK, HUGENHOLTZ P, TYSON GW, Shining a light on dark sequencing: Characterising errors in Ion Torrent PGM data. **Plos Computer Biology**. 9(4). 2013.

BRENTON, J.D. et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? **J Clin Oncol**. v.23, p.7350-60, 2005.

BURSTEIN, H.J., POLYAK, K., WONG, J.S., LESTER, S.C., KAELEN, C. Ductal Carcinoma in Situ of the Breast. **New England Journal of Medicine**, 350, 1430–1441. 2004.

CAREY, L. A; PEROU, CHARLES M; LIVASY, C. A; et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA. The journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 21, p. 2492-502, 2006.

CARVALHO M C C G, SILVA D C G. Next generation DNA sequencing and its applications in plant genomics. **Ciência Rural, Santa Maria**. 40 (3): 735-744. 2010.

CATANHO M, DE MIRANDA AB, DEGRAVE W. Comparando genomas: bancos de dados e ferramentas computacionais para a análise comparativa de genomas procarióticos. **R Eletr de Com Infor & Inov**; 1(2):335-358. 2007.

CAVALLARO S, PARATORE S, SNOO F, SALOMONE E, VILLARI L, BUSCARINO C, FERRAÙ F, BANNA G, FURCI M, STRAZZANTI A, CUNSOLO R, PEZZINO S, GANGI S, BASILE F. Genomic analysis: Toward a new approach in breast cancer management. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**. 81: 207–223. 2012.

CHANG HY, SNEDDON JB, ALIZADEH AA, SOOD R, WEST RB, MONTGOMERY K, CHI JT, VAN DE RIJN M, BOTSTEIN D, BROWN PO. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: Similarities between tumors and wounds. **PLoS Biol** 2: E7. 2004.

CHEN QW, ZHU XY, LI YY, MENG ZQ. Epigenetic regulation and cancer (review). **Oncol Rep**. Feb;31(2):523-32. 2014.

CIANFROCCA M, GOLDSTEIN LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**. 9(6):606–16. 2004.

COLEMAN, R. E. Bone cancer in 2011: Prevention and treatment of bone metastases. **Nat. Rev. Clin. Oncol.** 9, 76–78. 2012.

CORRÊA, P. B; TORALLES, M. B. P; ABE-SANDES, K; MACHADO, T. M. B; BONFIM, T. F; MEYER, L; ABE-SANDES, C. NASCIMENTO, I .Breast cancer triple negative and yours associations between african ancestry , **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, 2010.

COSTA LF. Bioinformatics: perspectives for the future. **Gen Mol Res**; 3(4):564-574. 2004.

COSTA S., PINTO D., PEREIRA D., RODRIGUES H., CAMESELLE-TEIJEIRO J., MEDEIROS R., E SCHMITT F. DNA repair polymorphisms might contribute differentially on familial and sporadic breast cancer susceptibility: a study on a Portuguese population. **Breast Cancer Res.Treat.**, 103, 209-217. 2007.

COUGHLIN SS, EKWUEME DU. Breast cancer as a global health concern. **Cancer Epidemiol.** 33(5):315–8. 2009.

DABBS, D.; CHIVUKULA, M.; CARTER, G.; BHARGAVA, R. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. **Mod Pathol.** 1506-11. 2006.

DEVONSHIREAS, SANDERS R, WILKES TM, TAYLOR MS, FOY CA, HUGGETT JF. Application of next generation qPCR and sequencing platforms to mRNA biomarker analysis. **Methods.** Jan;59(1):89-100. 2013.

DILLON, R.L., D.E. WHITE, AND W.J. MULLER, The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer. **Oncogene.** 26(9): p. 1338-45. 2007.

DINIZ WJ, CANDURI F. Bioinformatics: an overview and its applications. **Genet Mol Res.** Mar 15;16(1). 2017.

DUFFY M J, DONOVAN N O’, CROWN J. Use of molecular markers for predicting therapy response in cancer patients. **Cancer Treatment Reviews.** 37: 151–159. 2011.

EHEMAN CR, SHAW KM, RYERSON AB, MILLER JW, AJANI UA, WHITE MC. The Changing Incidence of In situ and Invasive Ductal and Lobular Breast Carcinomas: United States, 1999-2004. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, 18(6): 1763-1769, 2009.

ELMORE JG, ARMSTRONG K, LEHMAN CD, FLETCHER SW. Screening for breast cancer. **JAMA.** 293(10):1245–56. 2005.

ERIKSSON M, CZENE K, PAWITAN Y, LEIFLAND K, DARABI H, HALL P. A clinical model for identifying the short-term risk of breast cancer. **Breast Cancer Research.** 19:29. 2017.

EROLE P, BOSCH A, J. PÉREZ-FIDALGO A, LLUCH A. Molecular biology in breast cancer: Intrinsic subtypes and signaling pathways. **Cancer Treatment Reviews** 2011.

ESPINOSA E, SANCHEZ-NAVARRO I, GAMEZ-POZO A, MARIN AP, HARDISSON D, MADERO R, et al. **PLoS One**. 4:e5911. 2009.

ESPINOSA, E; VARA, J. Á. F; NAVARRO, I. S; GÁMEZ-POZO, A; PINTO, A; ZAMORA, P; REDONDO, A; FELIU, J. Gene profiling in breast cancer: Time to move forward, **Cancer Treatment Reviews**. (37): 416–421. 2011.

FERLAY J, SHIN H, BRAY F, FORMAN D, MATHERS C, PARKIN D. GLOBOCAN 2008: cancer incidence and mortality worldwide. In: IARC CancerBase No. 10 (version 2.0). Lyon: **IARC**, 2010.

FERLAY, J. et al. GLOBOCAN 2012 v1 .0, cancer incidence and mortality worldwide. Lyon, France: IARC, 2013. **IARC CancerBase**. Disponível em: <<http://globocan.iarc.fr>>. Acesso em: 20 FEV. 2016.

GACHON, C.; MINGAM, A.; CHARRIER, B. Real-time PCR: what relevance to plant studies. **J Exp Bot**, v.55, p.1445-1454, 2004.

GADGIL A, SAUVAGET C, ROY N, MUWONGE R, KANTHARIA S, CHAKRABARTY A, BANTWAL K, HALDAR I, SANKARANARAYANAN R. Cancer early detection program based on awareness and clinical breast examination: Interim results from an urban community in Mumbai, India. **Breast**. Feb;31:85-89. 2017.

GORI, S., et al., EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab. **Ann Oncol**. 20(4): p. 648-54. 2009.

GUARNERI V, BROGLIO K, KAU SW, CRISTOFANILLI M, BUZDAR AU, VALERO V, et al. Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. **J Clin Oncol**. 24(7):1037-44. 2006.

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

GUSTERSON, B.; ROSS, D T; HEATH, V J; STEIN, T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast cancer research : BCR**, v. 7, n. 4, p. 143-8, 2005.

HAMMOND ME, HAYES DF, DOWSETT M, et al. American society of clinical oncology/college of American pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **J Clin Oncol**. 28:2784–95. 2010.

HANBY, A M. Aspects of molecular phenotype and its correlations with breast cancer

- behaviour and taxonomy. **British journal of cancer**, v. 92, n. 4, p. 613-7, 2005.
- HARRIS L, FRITSCH H, MENNEL R, NORTON L, RAVDIN P, TAUBE S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol**. 25:5287–312. 2007.
- HAYDEN CHECK E. Technology: The \$1,000 genome. **Nature**; 507(7492):294-295. 2014.
- HAYES D, ISAACS C, STEARNS V. Prognostic factors in breast cancer: current and new predictors of metastasis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia**. 6(4): 375–92. 2001.
- HEATH SL, RAMAKRISHNAN N. The emerging landscape of Bioinformatics software systems. **IEEE C**; 35(7):41-45. 2005.
- HIRATA, B. K.B., ODA, J. M. M., GUEMBAROVSKI, R.L, ARIZA, C. B., DE OLIVEIRA, C. E. C., & WATANABE, M. A. E. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. **Disease markers**, 513158. 2014.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. ESTIMATIVA 2016: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Ministério da Saúde**, 2016.
- INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **IARC** handbooks of cancer prevention, vol. 7: breast cancer screening. Lyon: IARC Press, 2014.
- JENSEN T. J. ET AL: "Detection of Microdeletion 22q11.2 in a Fetus by Next-Generation Sequencing of Maternal Plasma", **Clinical Chemistry**, vol. 58, no. 7, pages 1148 - 1151, 2012.
- KARLSSON E, LINDSTRÖM L, WILKING U, SKOOG L, JOHANSSON U, BERGH J. Discordance in hormone receptor status in breast cancer during tumor progression. In: **Proc Am Soc Clin Oncol**, abs 1009: Chicago; 2010.
- KOH KH, RHEE H, KANG HJ, YANG E, YOU KT, LEE H, et al. Differential gene expression profiles of metastases in paired primary and metastatic colorectal carcinomas. **Oncology**. 75:92–101. 2008.
- KOMEN SUSAN G. 1 American Cancer Society, **Breast Cancer Facts & Figures** 2009-2010.
- KORSCHING, E. et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. **Lab Invest**. v.82, p.1525-33, 2002.
- KRETSCHMER CÉLINE, ANJA STERNER-KOCK, FRIEDERIKE SIEDENTOPF, WINFRIED SCHOENEGG, PETER M SCHLAG, WOLFGANG KEMMNER; KRETSCHMER et al. Identification of early molecular markers for breast cancer. **Molecular Cancer**. 10:15. 2011.
- KWA M, MAKRIS A, ESTEVA FJ. Clinical utility of gene-expression signatures in

early stage breast cancer. **Nature reviews | clinical oncology**. 2017.

LACROIX M, E LECLERCQ G. The "portrait" of hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res.Treat.**, 89, 297-304. 2005.

LEVY-LAHAD E, E PLON S.E. Cancer. A risky business--assessing breast cancer risk. **Science**, 302, 574-575. 2003.

LEVEQUE D, GIGOU L, BERGERAT JP. Clinical pharmacology of trastuzumab. **Curr Clin Pharmacol**. 3(1):51-5. 2008

LIN NU, WINER EP. Advances in adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women. **J Clin Oncol**. 26(5):798-805. 2008.

LIU L et al. Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. 251364, 11. 2012.

LOI S, HAIBE-KAINS B, DESMEDT C, LALLEMAND F, TUTT AM, GILLET C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. **J Clin Oncol**. 25:1239–46. 2007.

LOPEZ-GARCIA, M. A; GEYER, F. C.; Lacroix-Triki, M.; Marchió, C.; REIS-FILHO, J. S. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways. **Histopathology**. 57 (2): 171-92. 2010.

LUPORSI, E. et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. **Breast Cancer Res. Treat** 132, 895–915. 2012.

MA, C. X., ELLIS, M. J. The Cancer Genome Atlas: Clinical Applications for Breast Cancer. **Published on Cancer Network**. 2013.

MACMULLEN WJ, DENN S. Information problems in molecular biology and Bioinformatics. **J of the Amer Soc for Info Sci & Tech**; 56(5):447-456. 2005.

MALHOTRA GK, ZHAO X, BAND H, BAND V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. **Cancer Biol Ther**. Nov 15;10(10):955-60. 2010.

MARDIS ER. A decade's perspective on DNA sequencing technology. **Nature**. 2011.

MATOS, I. et al. Cytokeratin 5, and cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Arch., Berlin**, v.447, p. 688-694, 2005.

MAVADDAT N, ANTONIOU AC, EASTON DF, GARCIA-CLOSAS M. Genetic susceptibility to breast cancer. **Mol Oncology**. 4 (3): 174-91. 2010a.

MENG R, GORMLEY M, BHAT V B, ROSENBERG A, QUONG A A. Low abundance protein enrichment for discovery of candidate plasma protein biomarkers for

early detection of breast cancer. **Journal of Proteomics**. (75): 366-374. 2011.

MERRIMAN, B; ROTHBERG, J. M. Progress in Ion Torrent semiconductor chip based sequencing. Ion Torrent R&D Team, **Electrophoresis**. 33, 3397–3417. 2012.

MILLNER LM, STROTMAN LN. The Future of Precision Medicine in Oncology. **Clin Lab Med. Sep**;36(3):557-73. 2016.

MÜLLER BM, KEIL E, LEHMANN A, WINZER K-J, RICHTER-EHRENSTEIN C, PRINZLER J, BANGEMANN N, RELES A, STADIE S, SCHOENEGG W, EUCKER J, SCHMIDT M, LIPPEK F, JÖHRENS K, PAHL S, SINN BV, BUDCZIES J, DIETEL M, DENKERT C. The EndoPredict Gene-Expression Assay in Clinical Practice - Performance and Impact on Clinical Decisions. **PLoS One**. 8, e68252. 2013.

MUNIRAH MA, SITI-AISHAH MA, REENA MZ, SHARIFAH NA, ROHAIZAK M, NORLIA A, RAFIE MK, ASMIATI A, HISHAM A, FUAD I, SHAHRUN NS, DAS S. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. **Rom J Morphol Embryol**;52(2):669-77. 2011.

NOVAIS, C.M. & PIRES-ALVES, M. PCR em tempo real: uma inovação tecnológica da reação em cadeia da polimerase. **Biotecnologia, Ciência & Sociedade**, v.33, p. 10-13, 2004.

NUSSBAUM, R. L. **Genética Médica**. 7a ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

OLDENBURG R.A., MEIJERS-HEIJBOER H., CORNELISSE C.J., E DEVILEE P. Genetic susceptibility for breast cancer: how many more genes to be found? **Crit Rev.Oncol.Hematol.**, 63, 125-149. 2007.

PABINGER S, DANDER A, FISCHER M, SNAJDER R, SPERK M, EFREMOVA M, KRABICHLER B, SPEICHER MR, ZSCHOCKE J, TRAJANOSKI Z. A survey of tools for variant analysis of next- generation genome sequencing data. **Brief Bioinform.**;15(2):256-278. 2014.

PAIK S, SHAK S, TANG G, KIM C, BAKER J, CRONIN M, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med**. 351:2817–26. 2004.

PARKER JS, MULLINS M, CHEANG MC, LEUNG S, VODUC D, VICKERY T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**. 27:1160–7. 2009.

PARRELLA P. Epigenetic Signatures in Breast cancer: Clinical Perspective. **Breast Care** (Basel). 5 (5): 66-7. 2010.

PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 406:747–52. 2000.

PITASSI C, GONÇALVES A A, MORENO JÚNIOR V A. Factors affecting the

- adoption of ICT tools in experiments with bioinformatics in biopharmaceutical organizations: a case study in the Brazilian Cancer Institute. **Ciência & Saúde Coletiva**, 19(1):257-268, 2014.
- RAKHA, E. A; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, IAN O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast cancer research and treatment**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.
- SAAL, L.H., et al., Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity. **Proc Natl Acad Sci U S A**. **104**(18): p. 7564-9. 2007.
- SABATIER R, FINETTI P, GUILLE A, ADELAIDE J, CHAFFANET M, VIENS P, BIRNBAUM D, BERTUCCI F. Claudin-low breast cancers, pathological, molecular and prognostic characterization. **Mol Cancer**. Oct 2;13:228. 2014.
- SAPINO A, ROEPMAN P, LINN SC, et al. Mammaprint molecular diagnostics on formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. **J Mol Diagn**. 2013.
- SCHNITT SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol**. May;23 Suppl 2:S60-4. 2010.
- SETUBAL, J.C. A origem e o sentido da bioinformática. **Com Ciência [internet]**. <http://www.comciencia.br/reportagens/bioinformatica/bio10.shtml>. 2003.
- SHENDURE J, LIEBERMAN AIDEN E. The expanding scope of DNA sequencing. **Nat Biotechnol**.30(11):1084-1094. 2012.
- SILVA P A, RIUL S S. Breast cancer: risk factors and early detection. **Rev Bras Enferm**, 64(6): 1016-21. 2011.
- SOERJOMATARAM I, LOUWMAN M, RIBOT J, ROUKEMA J, COEBERGH J. An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. 107(3):309–30. 2008.
- SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**. 100:8418–23. 2003.
- STINGL, J. & CALDAS, C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n° 10, p. 791-799, 2007.
- STRAVER ME, GLAS AM, HANNEMANN J, WESSELING J, VAN DE VIJVER MJ, RUTGERS EJ, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. 119:551–8. 2010.
- SUZUKI S, ONO N, FURUSAWA C, YING B, YOMO T. Comparison of sequence reads obtained from three next-generation sequencing platforms. **PLoS One**. 6:e19534. 2011.

TCGAN. Comprehensive molecular characterization of human colon and rectal cancer. **Nature**; 487:330–7. 2012.

THE CANCER GENOME ATLAS NETWORK, Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. v 490. 61. 2012.

TOKUNAGA, E., et al., Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma. **Breast Cancer Res Treat**, 101(3): p. 249-57. 2007.

TSONGALIS GJ, PETERSON JD, DE ABREU FB, TUNKEY CD, GALLAGHER TL, STRAUSBAUGH LD, WELLS WA, AMOS CI. Routine use of the Ion Torrent AmpliSeq™ Cancer Hotspot Panel for identification of clinically actionable somatic mutations. **Clin Chem Lab Med**. May;52(5):707-14. 2014.

TSYBULSKY DA, KVACH MV, RYAZANTSEV DY, APARIN IO, STAKHEEV AA, PROKHORENKO IA, MARTYNENKO YV, GONTAREV SV, FORMANOVSKY AA, ZATSEPIN TS, SHMANAI VV, KORSHUN VA, ZAVRIEV SK. Molecular beacons with JOE dye: Influence of linker and 3' couple quencher. **Mol Cell Probes**. Oct;30(5):285-290. 2016.

TURNER, N.; REIS-FILHO, J. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**, v. 25, n. 43, p. 5846-53. 2006.

VAN DE VIJVER MJ, HE YD, VAN'T VEER LJ, DAI H, HART AA, VOSKUIL DW, et al. A gene expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med** 2002;347:1999–2009.

VAN DE VIJVER, M. Genetic alterations in breast cancer. Current Diagnostic **Pathology**, v. 6, n. 4, p. 271-281, 2000.

VERONA G, PRANDELLI E, SAWHNEY M. Innovation and virtual environment: toward virtual knowledge brokers. **Org Studies**; 27(6):765-788. 2006.

WATSON, J. DNA: The secret of life. **Arrow Books**. 2004.

WADDELL N, COCCIARDI S, JOHNSON J, HEALEY S, MARSH A, RILEY J, et al. Gene expression profiling of formalin-fixed, paraffin-embedded familial breast tumours using the whole genome-DASL assay. **J Pathol**. 221:452–61. 2010.

WEIGELT, B., GEYER, F. C., & REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular oncology**, 4(3), 192–208. 2010.

WONG, M.L. & MEDRANO, J.F. Real-time for mRNA quantitation. **BioTechniques**, v.39, n.1, 2005.

YANKASKAS BC. Epidemiology of breast cancer in young women. **Breast Dis**. 23:3– 8. 2005.

ZEBISCH M, KÖLBL AC, SCHINDLBECK C, NEUGEBAUER J, HEUBLEIN S, ILMER M, RACK B, FRIESE K, JESCHKE U, ANDERGASSEN U. Quantification of breast cancer cells in peripheral blood samples by real-time rt-PCR. **Anticancer Res.** 32(12):5387-91. 2012.

**APÊNDICE A – PRIMEIRA PATENTE DEPOSITADA: PAINEL GENÉTICO
NO DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E PREDIÇÃO DE NEOPLASIAS DE
MAMA**

Espaço reservado para o protocolo	Espaço reservado para a etiqueta	Espaço reservado para o código QR
  INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL Sistema de Gestão da Qualidade Diretoria de Patentes		
		Tipo de Documento: Formulário
Título do Documento: Depósito de Pedido de Patente		DIRPA Código: FQ001 Procedimento: DIRPA-PQ006
		Página: 1/3 Versão: 2

Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:

O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas:

1. Depositante (71):

1.1 Nome: **José Luiz de Lima Filho**

1.2 Qualificação: **Médico**

1.3 CNPJ/CPF: **21638241449**

1.4 Endereço Completo: **Av Prof. Moraes Rego, s/n**

1.5 CEP: **50670-901**

1.6 Telefone: **81 2126 8484**

1.7 Fax: **81 2126 8485**

1.8 E-mail: **joseluiz60@gmail.com**

☐ continua em folha anexa

2. Natureza: ☒ Invenção

☐ Modelo de Utilidade

☐ Certificado de Adição

3. Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):

**PAINEL GENÉTICO NO DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E PREDIÇÃO DE
NEOPLASIAS DE MAMA**

☐ continua em folha anexa

4. Pedido de Divisão: do pedido N°

Data de Depósito:

5. Prioridade: ☐ Interna (66)

☐ Unionista (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito	Número do depósito (se disponível)	Data de depósito

☐ continua em folha anexa



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA Título do Documento:	Tipo de Documento:	DIRPA	Página:
	Formulário		2/3
	Depósito de Pedido de Patente	Código:	Versão:
FQ001		2	
		Procedimento:	
		DIRPA-PQ006	

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: **José Luiz de Lima Filho**

6.2 Qualificação: **Médico**

6.3 CPF: **21638241449**

6.4 Endereço Completo: **Av. Prof. Moraes Rego s/n**

6.5 CEP: **50670-901**

6.6 Telefone: **81 2126-8484**

6.7 FAX: **81 2126-8485**

6.8 E-mail: **joseluiz60@gmail.com**

☒ continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

☐

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

☐ Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 APROAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

☐ continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver.

☐


INPI INSTITUTO
NACIONAL DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

 Título do Documento:	Tipo de Documento: Formulário	DIRPA	Página: 3/3
	Depósito de Pedido de Patente	Código: FQ001	Versão: 2
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas):

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
☒	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
☐	11.2	Procuração.	
☐	11.3	Documentos de Prioridade.	
☐	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
☒	11.5	Relatório descritivo.	6
☒	11.6	Reivindicações.	1
☒	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	1
☒	11.8	Resumo.	1
☐	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
☐	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
☐	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
☐	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
☐	11.13	Outros (especificar)	
		Lista de inventores	1

12. Total de folhas anexadas: 11 fls.
13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Local e Data

Assinatura e Carimbo

- **Inventores**

- Nome: Roberta Luciana do Nascimento Godone
 - Qualificação: Bióloga 6.3 CPF: 05002108458
 - Endereço Completo: Av Morais Rego s/n 6.5 CEP: 50670-901
 - Telefone: 81 2126 8484
 - Fax: 81 2126 8485
 - Email: rgodone@prospecmol.org
-
- Nome: Carlos Henrique Madeiros Castelletti
 - Qualificação: Biólogo 6.3 CPF: 02107117446
 - Endereço Completo: Av Morais Rego s/n 6.5 CEP: 50670-901
 - Telefone: 81 2126 8484
 - Fax: 81 2126 8485
 - Email: hcastelletti@prospecmol.org
-
- Nome: Danyelly Bruneska Gondim Martins
 - Qualificação: Biólogo 6.3 CPF: 89562453472
 - Endereço Completo: Av Morais Rego s/n 6.5 CEP: 50670-901
 - Telefone: 81 2126 8484
 - Fax: 81 2126 8485
 - Email: bruneska@prospecmol.org

PAINEL GENÉTICO NO DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E PREDIÇÃO DE NEOPLASIAS DE MAMA

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

A presente invenção refere-se ao campo métodos e dispositivos baseados em painel genético para a identificação de marcadores moleculares para o câncer de mama. A presente invenção engloba também a previsão da progressão do câncer de mama, por exemplo, se o paciente é ou não susceptível ao aparecimento de metástases.

Antecedentes da Invenção

O câncer de mama representa uma das principais causas de morte em mulheres do mundo inteiro, inclusive brasileiras. Globalmente, cerca de 1,38 milhões de mulheres são diagnosticadas com câncer de mama e 458.503 morrem da doença a cada ano, perdendo apenas para o câncer de pulmão. Um total de 70% das mortes por câncer de mama ocorrem em mulheres de países de baixa renda e média renda. Embora a idade média dos pacientes com câncer de mama é 65 anos, esta doença pode afetar mulheres de todas as idades. O câncer de mama, no entanto, não se restringe à população feminina, pois cerca de 1% de todos os casos diagnosticados são em homens. Na América Latina cerca de 115.000 novos casos da doença a cada ano, e para o ano de 2012/2013, o INCA estima mais de 52.000 novos casos de câncer de mama no Brasil.

A melhoria nos métodos de detecção, rastreamento em massa, e os avanços no tratamento ao longo da última década têm aumentado significativamente as perspectivas para as mulheres diagnosticadas com câncer de mama. Hoje, aproximadamente 80% dos casos de câncer de mama são diagnosticados nos estágios iniciais da doença, e como resultado cerca de 85% das pacientes com câncer de mama estão vivas, pelo menos cinco anos após o diagnóstico da doença.

Apesar destes avanços, aproximadamente 20% das mulheres diagnosticadas com câncer de mama em estágio inicial têm uma má evolução e consequentemente podem vir a sofrer com a recorrência da doença, metástases ou morte. Diante disso, faz-se necessária a implementação de métodos diagnósticos de qualidade e eficazes que atendam às necessidades de cada paciente individualmente.

A maioria dos tumores de mama, assim como os tumores em geral, são resultantes de alterações genéticas e epigenéticas que se acumulam nas células e que podem mudar a morfologia e a função das mesmas. Desta forma, os principais fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama relacionam-se com idade avançada, características reprodutivas, história familiar e pessoal, hábitos de vida e influências ambientais. Além destes, outros fatores influenciam no surgimento do câncer de mama tais como: desregulação dos receptores de estrógeno (que permitem o aumento da proliferação das células epiteliais mamárias), complicações na checagem do ciclo celular, danos nas moléculas envolvidas nos fatores de crescimento, amplificação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor, erros na via de apoptose e descontrole da senescência celular ocasionando nas células função de reprodução sem restrições, resultando assim na invasão de tecidos locais e, por conseguinte, invasão de tecidos vizinhos.

Alguns países em desenvolvimento têm apresentado um aumento na incidência do câncer de mama acompanhado da mortalidade. Estes dados têm sido atribuídos, principalmente, a modelos de diagnósticos e terapêuticos pouco eficazes. Uma questão que afeta potencialmente os resultados clínicos é o intervalo de tempo entre a suspeita inicial de câncer e o diagnóstico, e subsequentemente, o tempo de tratamento. No caso do câncer de mama, a detecção precoce é um aspecto importante para melhorar os resultados terapêuticos desta doença.

As análises de marcadores moleculares vêm sendo descritas como uma forma de classificar o câncer de mama a nível clínico, identificando assim a grande diversidade de subtipos de tumores baseados nos perfis de expressão gênica e influenciando na conduta e tomada de decisões médicas mais eficientes no combate ao câncer de mama.

A patente **WO 2009158143 A1** intitulada “**Gene expression profiles to predict breast cancer outcomes**” de 30 de dezembro de 2009, descreve um método de classificação e avaliação de prognóstico em indivíduos com câncer de mama em diferentes subtipos. O modelo de previsão é baseado no perfil de expressão gênica de

alguns genes como: ACTR3B, ANLN, BCL2, CDC20, CDC6, EDRF, ERBB2, EXO1

dentre outros citados na patente. Os métodos da invenção compreendem ainda meios de avaliar o perfil da expressão de genes incluindo ensaios com microarranjo e PCR em tempo real. Entretanto o invento em destaque utiliza genes que já são descritos em outros painéis genéticos que já são utilizados na prática clínica.

A patente **WO 2008132167 A2** intitulada “**Diagnostic, prognostic and/or predictive indicators of breast cancer**” de 06 de novembro de 2008, descreve a invenção que refere-se a um novo painel de mRNAs que possuem potencial como indicadores de câncer de mama que engloba diagnóstico, prognóstico e / ou predição, além deste painel também possuir potencial para novos alvos terapêuticos. Porém este método apresenta a utilização de mRNA na constituição de seu painel e alguns dos genes utilizados como referencia para a obtenção dos mRNA estão relacionados a outras doenças além do câncer de mama propriamente dito.

A patente **WO 2011103236 A2** intitulada “**Personalized tumor biomarkers**” de 25 de agosto de 2011, descreve um método chamado *Personalized analysis of rearranged ends (PARE)* que pode identificar translocações em tumores sólidos e analisa além de tumores de mama, os tumores colon-retais. O método utiliza a reação em cadeia da polimerase (PCR) com iniciadores que abrangem os pontos de parada e são capazes de detectar moléculas de DNA mutantes. Contudo, o método utiliza marcadores não só para câncer de mama, mas também para câncer colon-retal, sendo desta forma classificado como desenvolvimento de biomarcadores personalizado para gestão clínica em pacientes com câncer em geral.

Na patente **WO 2011109637 A1** intitulada “**Methods for classifying and treating breast cancers**” de 09 de setembro de 2011, descreve a identificação de seis subtipos moleculares de câncer da mama e terapias otimizadas que são eficazes para o tratamento de cada um destes subtipos, avaliando níveis de expressão gênica através da técnica de PCR em tempo real e microarranjo. Entretanto, o método também utiliza marcadores presentes em outros painéis genéticos já descritos.

Nenhuma das patentes citadas acima possui semelhança com o painel genético proposto para diagnóstico, prognóstico e/ou predição do câncer de mama. Os genes propostos não estão descritos em outras patentes para o diagnóstico molecular do câncer de mama.

Descrição da Invenção

A presente invenção descreve um método baseado em painel genético para a identificação de marcadores moleculares relacionados a previsão da progressão do câncer de mama. O método visa à identificação do câncer de mama enfocando risco, recorrência, progressão e/ou metástase.

O método de busca para a elaboração do painel compreendeu a seleção da expressão de genes potenciais relacionados ao risco, progressão, recorrência e/ou metástase no câncer de mama (Figura 1).

O painel consistirá em um grupo de 27 genes: AKT1, AKT2, ABCB1, AURKA, ABCD3, ARID1B, BAX, CASP8, DCD, CDH1, ESR1, FOXA1, GATA3, GRB7, GSTP1, HS3ST2, KRT19, MAD2L1, MKI67, MAP3K1, MUC1, NCOR1, PRKCDBP, RB1, SNAI1, SMYD4 e ZNF217, que serão analisados quanto ao aumento ou diminuição dos níveis de expressão gênica.

A tabela 1 descreve o painel genético da presente invenção com as características necessárias para a avaliação e obtenção dos resultados, trazendo informações e particularidades de cada gene.

Tabela 1

GENES	NOME DO GENE	PAPEL DOS BIOMARCADORES	TIPO DE TUMOR (HISTOLOG)	REGULAÇÃO
AKT	<i>v-akt murine</i>	Predição/Prognóst	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
AKT	<i>v-akt murine</i>	Predição/Prognóst	ND*	<i>Up-regulated</i>
ABCB1	<i>ATP-binding cassette</i>	Predição/Prognóst	Carcinoma	<i>Down-</i>
ARID1B	<i>AT rich interactive</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Down-</i>
AURKA	<i>Aurora Kinase k</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
ABCD3	<i>ATP-binding</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
BAX	<i>BCL2-associated X</i>	Prognóstico	ND*	<i>Up-regulated</i>
CASP8	<i>Cyclin-dependent</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
CDH1	<i>Cadherin 1, type 1, E-</i>	Prognóstico	Carcinoma Ductal/Carcino	<i>Up-regulated</i>
DCD	<i>dermcidin</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
ESR	<i>Estrogen receptor 1</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Down-</i>
FOXA1	<i>Forkhead box A1</i>	Diagnóstico/Prognó	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
GATA3	<i>GATA binding protein 3</i>	Prognóstico	Carcinoma Ductal/Carcino	<i>Up-regulated</i>
GRB	<i>Growth factor</i>	Predição/Prognóst	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
GSTP1	<i>Glutathione S-</i>	Prognóstico	ND*	<i>Down-</i>
HS3ST	<i>Heparan sulfate</i>	Prognóstico	ND*	<i>Down-</i>

	<i>(glucosamine)</i>			
KRT1	<i>Keratin 19</i>	Diagnóstico/Predi	ND*	<i>Up-regulated</i>
MAD2	<i>MAD2 mitotic</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
L 1	<i>arrest</i>		Ductal/	
MKI6	<i>Antigen identified by</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
7	<i>monoclonal</i>		Ductal/	
MAP3	<i>Mitogen-activated</i>	Predição	ND*	<i>Up-regulated</i>
MUC1	<i>Mucin 1</i>	Diagnóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
NCOR	<i>Nuclear</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Down-</i>
1	<i>receptor</i>		Lobular/Carcino	<i>regulated</i>
	<i>corepressor</i>		ma Basal	
PRKC	<i>Protein kinase C</i>	Prognóstico	ND*	<i>Down-</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>	Predição	Carcinoma	<i>Down-</i>
			Ductal,	<i>regulated</i>
			Carcinoma	
SNAI1	<i>Snail family zinc</i>	Prognóstico	ND*	<i>Up-regulated</i>
SMYD	<i>SET and MYND</i>	Diagnóstico	Carcinoma	<i>Down-</i>
ZNF21	<i>Zinc finger protein</i>	Prognóstico	Carcinoma	<i>Up-regulated</i>
7	<i>217</i>		ER/PR	

ND= Não Demonstrado; PR= Receptor de Progesterona; ER= Receptor de Estrogênio.

REIVINDICAÇÕES

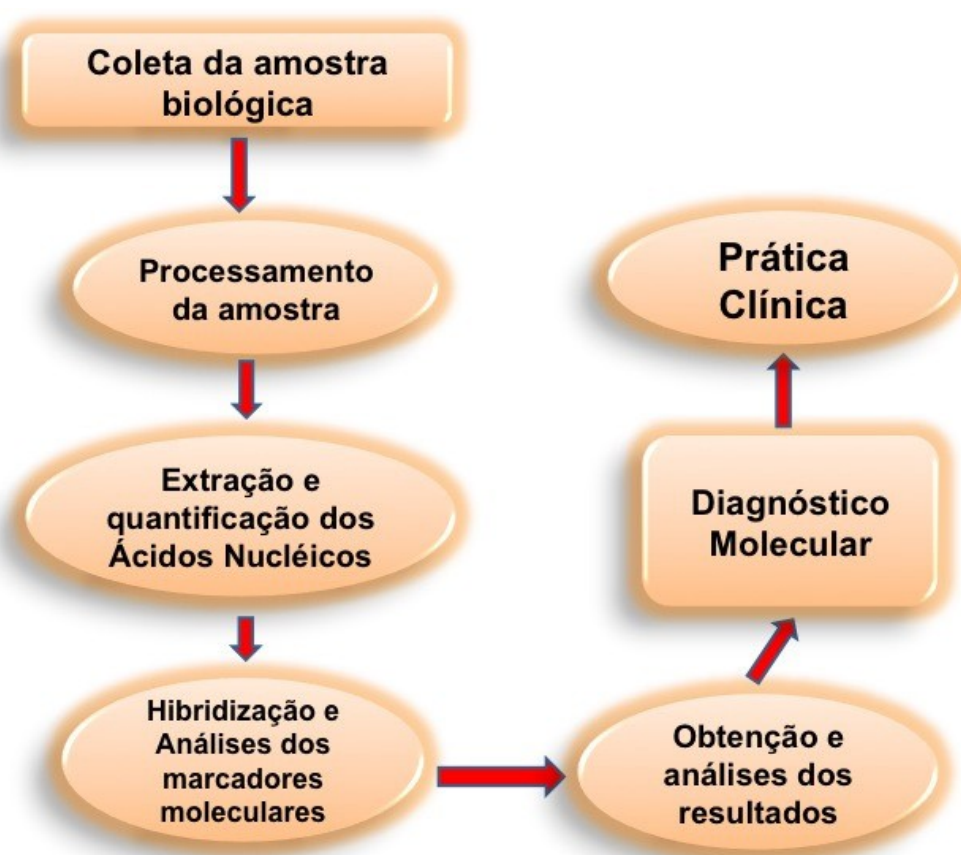
1. Processo que prevê o diagnóstico, prognóstico e predição de neoplasias de mama, a partir da detecção da expressão de um ou mais biomarcadores selecionados em um grupo consistindo dos genes AKT1, AKT2, ABCB1, AURKA, ABCD3, ARID1B, BAX, CASP8, CDH1, DCD, ESR1, FOXA1, GATA3, GRB7, GSTP1, HS3ST2, KRT19, MAD2L1, MKI67, MAP3K1, MUC1, NCOR1, PRKCDBP, RB1, SNAI1, SMYD4 e ZNF217 em que um aumento ou diminuição da expressão gênica de um ou mais dos biomarcadores, em comparação com um padrão, indicará uma recorrência, progressão ou metástase da doença.
2. A análise de amostras biológicas a partir do método da reivindicação 1.
3. Processo na forma de detecção dos padrões dos níveis de expressão dos potenciais biomarcadores descritos no método de reivindicação 1.
4. Processo na forma de detecção em pacientes com câncer de mama no que diz respeito ao diagnóstico consistindo pela seleção dos biomarcadores FOXA1, GBB7, KRT19, SMYD4 e MUC1 através do método da reivindicação 1.
5. Processo na forma de detecção em pacientes com câncer de mama no que diz respeito a prognóstico utilizando os biomarcadores selecionados a partir do grupo que consiste AKT1, AKT2, ABCB1, ARID1B, CASP8, CDH1, DCD, ESR1, FOXA1, GATA3, GRB7, GSTP1, HS3ST2, MAD2L1, MKI67, NCOR1, PRKCDBP, SNAI1, ZNF217, AURKA, ABCD3 e BAX através do método da reivindicação 1.
6. Processo na forma de detecção em pacientes com câncer de mama no que diz respeito a predição do câncer de mama utilizando os biomarcadores selecionados a partir do grupo que consiste AKT2, ABCB1, MAP3K1 e RB1 através do método da reivindicação 1.

PAINEL GENÉTICO NO DIAGNÓSTICO, PROGNÓSTICO E PREDIÇÃO DE NEOPLASIAS DE MAMA

RESUMO

A presente invenção refere-se a um painel de marcadores genéticos que possuem potencial de diagnóstico, prognóstico e/ou preditor de neoplasias de mama. A invenção consiste na identificação da variação da expressão de genes relacionados com o câncer de mama.

Figura 1.



**APÊNDICE B – SEGUNDA PATENTE DEPOSITADA: PAINEL GENÉTICO
PARA ANÁLISE, IDENTIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE MUTAÇÕES EM
CÂNCER DE MAMA**



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

DIRPA	Tipo de Documento:	Formulário	DIRPA	Página:	2/3
	Título do Documento:		Código:	Versão:	
Depósito de Pedido de Patente		FQ001		2	
		Procedimento:			
		DIRPA-PQ006			

6. Inventor (72):

☐ Assinale aqui se o(s) mesmo(s) requer(em) a não divulgação de seus nome(s), neste caso não preencher os campos abaixo.

6.1 Nome: José Luiz de Lima Filho

6.2 Qualificação: Médico

6.3 CPF: 21638241449

6.4 Endereço Completo: Av. Prof. Moraes Rego, s/n

6.5 CEP: 50670-901

6.6 Telefone: 81 2126 8484

6.7 FAX: 81 2126 8485

6.8 E-mail: joseluiz60@gmail.com

☒ continua em folha anexa

7. Declaração de divulgação anterior não prejudicial.

☐

Artigo 12 da LPI – período de graça.

Informe no item 11.13 os documentos anexados, se houver.

8. Declaração na forma do item 3.2 da Instrução Normativa PR nº 17/2013:

☐ Declaro que os dados fornecidos no presente formulário são idênticos ao da certidão de depósito ou documento equivalente do pedido cuja prioridade está sendo reivindicada.

9. Procurador (74):

9.1 Nome:

9.2 CNPJ/CPF:

9.3 API/OAB:

9.4 Endereço Completo:

9.5 CEP:

9.6 Telefone:

9.7 FAX:

9.8 E-mail:

☐ continua em folha anexa

10. Listagem de sequências biológicas.

Informe nos itens 11.9 ao 11.12 os documentos anexados, se houver. ☐



INPI INSTITUTO
NACIONAL
DA PROPRIEDADE
INDUSTRIAL

INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL
Sistema de Gestão da Qualidade
Diretoria de Patentes

 Título do Documento:	Tipo de Documento:	DIRPA	Página:
	Formulário		3/3
	Depósito de Pedido de Patente		Código: FQ001
		Procedimento: DIRPA-PQ006	

11. Documentos Anexados:

(Assinale e indique também o número de folhas);

(Deverá ser indicado o número total de somente uma das vias de cada documento).

	Documentos Anexados		folhas
☒	11.1	Guia de Recolhimento da União (GRU).	1
☐	11.2	Procuração.	
☐	11.3	Documentos de Prioridade.	
☐	11.4	Documento de contrato de trabalho.	
☒	11.5	Relatório descritivo.	8
☒	11.6	Reivindicações.	2
☒	11.7	Desenho(s) (se houver). Sugestão de figura a ser publicada com o resumo: nº, _____ por melhor representar a invenção (sujeito à avaliação do INPI).	1
☒	11.8	Resumo.	1
☐	11.9	Listagem de sequências em arquivo eletrônico: _____ nº de CDs ou DVDs (original e cópia).	
☐	11.10	Código de controle alfanumérico no formato de código de barras referente às listagem de sequências.	
☐	11.11	Listagem de sequências em formato impresso.	
☐	11.12	Declaração relativa à Listagem de sequências.	
☐	11.13	Outros (especificar) Lista de inventores	1

12. Total de folhas anexadas: 14 fls.

13. Declaro, sob as penas da Lei que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

Recife, 27 de outubro de 2015

Local e Data

Assinatura e Carimbo

Prof. José Luiz de Lima Filho
Diretor
LIKA / UFPE
SIAPE-1133637

- **Inventores**

- Nome: Roberta Luciana do Nascimento Godone
- Qualificação: Bióloga 6.3 CPF: 05002108458
- Endereço Completo: Av Morais Rego s/n 6.5 CEP: 50670-901
- Telefone: 81 2126 8484
- Fax: 81 2126 8485
- Email: rgodone@prospecmol.org

- Nome: Carlos Henrique Madeiros Castelletti
- Qualificação: Biólogo 6.3 CPF: 02107117446
- Endereço Completo: Av Morais Rego s/n 6.5 CEP: 50670-901
- Telefone: 81 2126 8484
- Fax: 81 2126 8485
- Email: hcastelletti@prospecmol.org

- Nome: Danyelly Bruneska Gondim Martins
- Qualificação: Biólogo 6.3 CPF: 89562453472
- Endereço Completo: Av Morais Rego s/n 6.5 CEP: 50670-901
- Telefone: 81 2126 8484
- Fax: 81 2126 8485
- Email: bruneska@prospecmol.org

PAINEL GENÉTICO PARA ANÁLISE, IDENTIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE MUTAÇÕES EM CÂNCER DE MAMA

RELATÓRIO DESCRITIVO

Campo da Invenção

[01] A presente invenção refere-se ao campo de métodos e dispositivos baseados na análise de um painel genético proveniente da combinação de mutações gênicas consistentemente observadas em pacientes com câncer de mama. A presente invenção está caracterizada pelo uso de técnicas de biologia molecular, como sequenciamento de nova geração (NGS), microarranjo de DNA e a utilização de sondas de hibridização alelo-específicas no sistema de PCR em tempo real, para a detecção dos *hotspots* do referido painel.

Antecedentes da Invenção

[02] O câncer de mama é o tipo de câncer mais incidente entre a população feminina mundial, tanto em países em desenvolvimento quanto nos desenvolvidos. A maioria das mortes por esta doença ocorre em países de baixa e média renda, fato caracterizado pelo diagnóstico em estágios avançados da patologia. Uma das causas no retardo do diagnóstico pode ser o reflexo da inexistência de uma política consistente de controle da doença através do diagnóstico precoce.

[03] A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença e a sobrevida variam de paciente para paciente. Esta variação é determinada por uma série complexa de fatores, tais como a diferença na velocidade de duplicação tumoral, o potencial de metastatização do tumor e outros mecanismos, ainda não completamente compreendidos, relacionados com a condição imunológica, hormonal e nutricional do paciente. Apesar de certos aspectos anatômicos, como o tamanho do tumor primário e as condições dos linfonodos continuarem sendo fatores importantes na avaliação prognóstica, uma série de características histológicas e biológicas como grau nuclear, grau histológico e dosagem de receptores hormonais são determinantes para o prognóstico da evolução da doença.

[04] O conhecimento dos fatores prognósticos é de fundamental importância na determinação dos programas terapêuticos. Uma terapia baseada em uma avaliação prognóstica possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequada e individualizada para aquele paciente específico. Apesar da riqueza de caracterização dos subtipos moleculares e histológica dos tumores ser bem estabelecida, a compreensão dos aspectos genéticos em diversos cânceres permanece sem resposta.

[05] Diante disso existe uma necessidade de prospecção de moléculas indicativas do estado fisiológico que possam vir a fornecer maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico e classificação da doença durante a iniciação e progressão do câncer.

[06] O processo da carcinogênese é caracterizado pela aquisição de múltiplas alterações genéticas e epigenéticas que ocorrem em diversos processos relacionados, envolvendo o controle do ciclo celular, a apoptose, a diferenciação, a senescência e a angiogênese, além da motilidade celular e capacidade migratória. Os mecanismos moleculares relacionados a carcinogênese são extremamente diversos e complexos, onde um conjunto conhecido de genes (entre os principais estão o *TP53*, *PTEN*, *BRCA1*, *BRCA2* e *BAX*), controlam a maior parte das vias ligadas a carcinogênese. Estes genes são partes centrais dos mecanismos envolvidos no câncer ou vias da carcinogênese e frequentemente são encontrados alterados quando do diagnóstico do câncer.

[07] Vias ligadas a carcinogênese como mTOR, MAPK, WNT e PI3K- AKT estão frequentemente alteradas em vários tipos de câncer, incluindo o câncer de mama. Essas vias desempenham importante papel, não somente no desenvolvimento de tumores malignos, como também por se constituírem alvos de resposta de determinados tumores à terapêutica empregada. O conhecimento de diversos genes e suas respectivas vias de sinalização no câncer de mama, assim como as alterações genéticas ocorridas nelas podem adicionar informações importantes para fins prognósticos e terapêuticos.

[08] A descoberta de preditores de respostas terapêuticas mais sensíveis é especialmente relevante em neoplasias de comportamento clínico muito heterogêneo, não só pelo aspecto de poupar o paciente da toxicidade de um tratamento ineficiente, mas também, pelo aspecto econômico, podendo o medicamento de maior valor agregado ser reservado exclusivamente para casos com alta probabilidade de resposta.

[09] As mutações gênicas são as principais alterações verificadas no processo de carcinogênese, onde mecanismos de inativação gênica como a perda de um alelo, repressão transcricional, modificação da conformação da proteína, inativação da proteína e alteração da distribuição celular da proteína podem ocorrer nas células cancerosas. A detecção destas mutações tipicamente depende da reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida por uma variedade de análises pós-amplificação. Uma limitação importante desse método é o seu baixo grau de sensibilidade nas amplificações, sendo difícil a detecção do gene mutado quando o total de alelos presentes está abaixo de 10%, o que significa que a detecção precoce de um baixo número de células cancerosas é limitada.

[10] Diante disso, faz-se necessária à implementação de métodos diagnósticos eficazes no atendimento as necessidades de cada paciente individualmente. Desta forma, enquanto os estudos clínicos procuram definir a janela terapêutica, e a dose do medicamento, que normalmente é baseada na dose máxima tolerada, a farmacogenética procura adaptar o tratamento com a dose mínima eficaz segundo as características do indivíduo.

[11] Neste contexto, a análise do perfil genético no câncer de mama tem recebido crescente atenção nos últimos anos como uma forma de fornecer informação prognóstica e preditiva da doença. As análises de marcadores moleculares vêm sendo descritas como uma forma de classificar o câncer de mama a nível clínico, identificando a grande diversidade de subtipos de tumores, baseados nos perfis de mutações, e influenciando na conduta e tomada de decisões médicas mais eficientes.

[12] A biologia molecular tornou-se ferramenta fundamental no diagnóstico de doenças como o câncer, permitindo não só a identificação do gene afetado, mas também da mutação responsável pela doença. Este fato se deve em função da montagem das leituras produzidas pelas tecnologias de biologia molecular, onde seu uso na genômica do câncer tem sido direcionado para o sequenciamento e identificação de alguns genes candidatos a biomarcadores com fins diagnósticos no câncer de mama.

[13] Diversas patentes estão relacionadas com a detecção de variações e a correlação com a suscetibilidade para o câncer de mama. Em sua maioria os métodos descritos são para o uso da técnica de PCR como na patente **WO 2013074977 A1** intitulada “**Selective amplification and detection of mutant gene alleles**” de 16 de novembro de 2012, que descreve um método de confecção de *primers* que proporciona a amplificação seletiva de um alelo mutante para detecção de mutações.

[14] A patente **WO 2011054030 A1** intitulada “**Treatment of cancer involving mutated KRAS or BRAF genes**” de 29 de outubro de 2010, descreve a invenção que se refere a um método de tratamento de câncer em pacientes, que possuem mutação nos genes KRAS ou BRAF os quais são indicadores de câncer de mama. O método envolve o uso de anticorpos ou fragmentos de ligação ao antígeno, que competem pela ligação ao SCI 04 que é uma glicoproteína. Esse método não se baseia em detecções de mutações por técnicas moleculares.

[15] Já a patente **WO 2010123818 A1** intitulada “**Breast Cancer susceptibility gene gt198 and uses thereof**” de 19 de abril de 2010, descreve um método para a detecção do câncer de mama relacionado a mutação do gene gt198. Ainda proporciona a realização de métodos para a identificação de compostos, anticorpos e moléculas de produtos naturais que são úteis para o tratamento do câncer de mama correlacionados com a mutação do gene supracitado. As mutações no gene gt198 podem ser detectadas usando PCR convencional, eletroforese em gel, PCR em tempo real ou por métodos de hibridização in situ.

[16] Na patente **WO 2009113888 A2** intitulada “**Method for determining reduced predisposition to cancer based on genetic profile**” de 13 de março de 2009, descreve a invenção de métodos para a detecção precoce de desenvolvimento de câncer, que compreende a detecção da ausência de uma série de polimorfismos genéticos associados a uma predisposição de desenvolver câncer,

incluindo os polimorfismos dos genes *BRCA1*, *BRCA2*, *NOD2*, *CHEK2*, *CDKN2A*, *CYP1B1*, *FGFR2 5*, *MAP3K1*, *TP53*, *TNRC9*, *XPD* e o marcador genético rs6983267, em amostras biológicas de pacientes, em que a ausência dos polimorfismos genéticos é indicativa de redução significativa do risco de desenvolver, pelo menos, o câncer da mama. Para detecção das mutações nos genes descritos neste método pode-se utilizar quaisquer técnicas de detecção de mutação direta ou indireta como, RFPL-PCR, RT-PCR, espectrometria de massas (Maldi-TOF) ou microarray.

[17] Na patente **WO 2001068668 A1** intitulada “**ATM mutations in breast cancer**” de 16 de março de 2001, descreve-se um método de teste para determinar se o indivíduo tem uma predisposição para o desenvolvimento de câncer de mama primário ou bilateral, que inclui a detecção de uma mutação na estrutura de leitura do gene ATM. Os métodos para detecção dessa mutação não se limitam apenas a PCR convencional, mas outras técnicas também podem ser utilizadas como, cromatografia líquida de alta eficiência (dHPLC), PCR LightCycler e uso de endonucleases de restrição (REF-SSCP).

[18] Já na patente **WO 2008151031 A1** intitulada “**Detecting mutated gene sequences by mutant-enriched sequencing**” de 30 de maio de 2008, descreve a invenção que se refere ao sequenciamento de três mutações específicas da proteína PIK3CA nos *hotspots* (1047R, E545K e E452K) os quais podem ser usados para detecção e terapias-alvos em diversos tipos de câncer, como câncer de mama e câncer colon-retal.

[19] Nenhuma das patentes citadas acima possui semelhança com o painel genético proposto que inclui diagnóstico, prognóstico, predição de susceptibilidade, efeitos e benefícios ao tratamento do câncer de mama. A metodologia que será empregada para as análises das mutações nos genes propostos são tecnologias de biologia molecular como sequenciamento de nova geração (NGS), microarranjo de DNA e PCR em tempo real onde estes tipos de técnicas são altamente representativos no estudo de genomas e/ou transcriptomas em um único passo, o que é extremamente relevante, em razão da grande redução de custo alcançada com essas metodologias.

[20] A utilização de um painel que propõe o estudo de genes correlacionados com suas respectivas vias de atuação se faz necessário, pois a desregulação destas desempenham um papel importante em diversos mecanismos relacionados ao câncer de mama, podendo assim ser úteis para a categorização de risco, rastreio, diagnóstico diferencial, prognóstico, predição terapêutica ou monitorização do estado da doença.

Descrição da Invenção

[21] A presente invenção descreve um método para detecção da presença de variações em genes associados ao câncer de mama através das técnicas de sequenciamento de nova geração (NGS), microarranjo de DNA e PCR em tempo real, não excluindo outras técnicas de detecção de mutações.

[22] Especificamente a presente invenção incluiu composições e métodos para detecção de mutações relacionadas a genes presentes em vias de sinalização específicas do câncer de mama, levando em consideração a eficiência de cada gene, observando o perfil diagnóstico, prognóstico ou preditivo para a doença.

[23] Os genes encontrados foram agrupados e selecionados por estarem relacionados ao câncer de mama e possuírem mutações somáticas e/ou germinativas. Para composição do painel foram escolhidos 23 genes, os quais possuíam uma relação forte com os critérios de avaliação estabelecidos, evitando-se a análise de genes com baixa ou nenhuma relação com o estudo da neoplasia proposta nessa invenção.

[24] O painel consiste em um grupo de 23 genes que podem ser utilizados como marcadores moleculares: *AKT1*, *BAP1*, *BRAF*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CCND1*, *CASP8*, *CDH1*, *CDK4*, *CHEK2*, *EGFR*, *ERBB2*, *GATA3*, *KRAS*, *MAP2K4*, *NTRK3*, *PBRM1*, *PIK3CA*, *RBI*, *TP53*, *MDM4* e *SMAD4*, bem como suas respectivas vias de sinalização.

[25] A tabela 1 descreve o painel genético da presente invenção com as características necessárias para a avaliação e obtenção dos resultados, trazendo informações e particularidades de cada gene.

REIVINDICAÇÕES

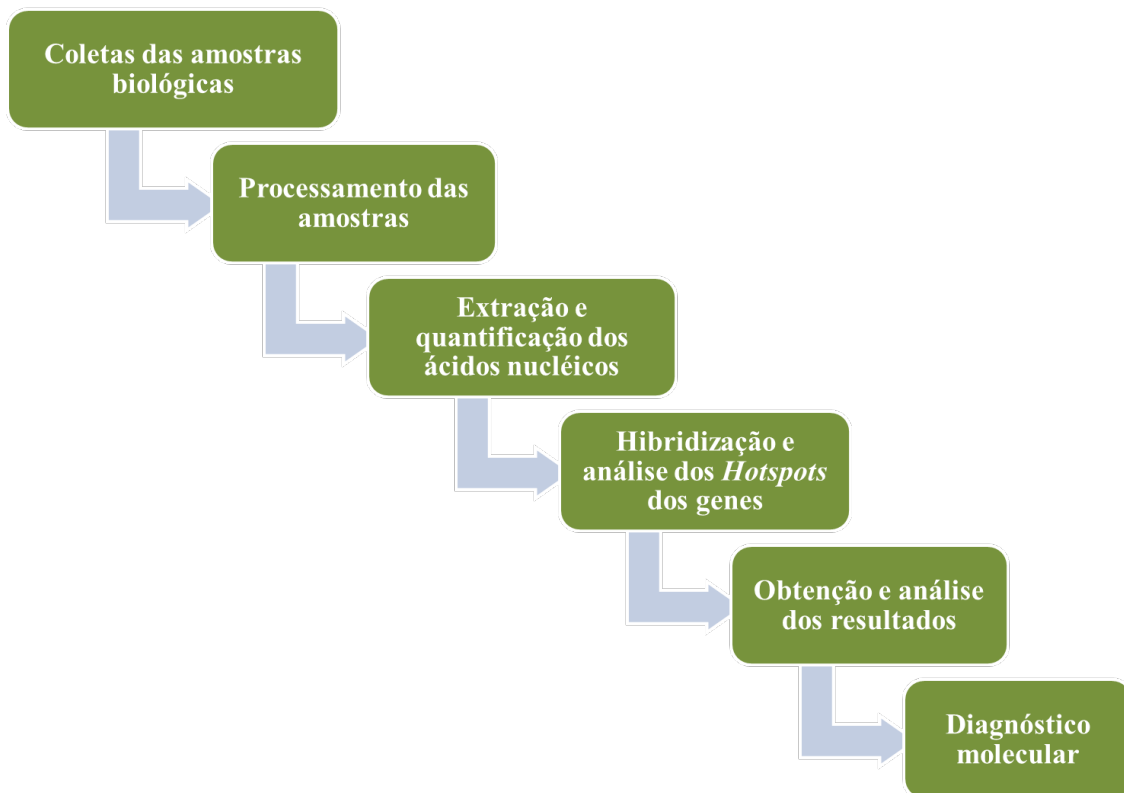
1. Painel genético caracterizado pela análise, identificação e diagnóstico de mutações em câncer de mama feminino.
2. Painel genético na predição de câncer de mama feminino, caracterizado pela detecção de mutações nas sequências dos genes *AKT1*, *BAP1*, *BRAF*, *BRCA1*, *BRCA2*, *CCND1*, *CASP8*, *CDH1*, *CDK4*, *CHEK2*, *EGFR*, *ERBB2*, *GATA3*, *KRAS*, *MAP2K4*, *NTRK3*, *PBRM1*, *PIK3CA*, *RBI*, *TP53*, *MDM4* e *SMAD4*.
3. Painel genético caracterizado por prever alterações nas respectivas vias de sinalização dos genes da reivindicação 2, utilizando inicialmente as técnicas de sequenciamento de nova geração (*NGS*), microarranjo de DNA e PCR em tempo real, não excluindo outras.
4. Painel genético caracterizado pelo método da reivindicação 3, em que a amostra será constituída por tecido de tumor de mama fresco ou parafinado e amostras de sangue de pacientes com câncer de mama, não excluindo outros tipos de amostras.
5. Painel genético caracterizado pelo método da reivindicação 3, em que o passo de detecção compreende a análise de mutações nos biomarcadores correlacionando suas respectivas vias de sinalização, não excluindo outros tipos de amostras.
6. Painel genético caracterizado pelo processo na forma de identificação, predição e/ou prognóstico do câncer de mama caracterizado pela avaliação do painel genético proposto pelos genes contidos nos métodos da reivindicação 1.
7. Painel genético caracterizado pelo processo na forma de identificação de mutações somáticas e/ou germinativas contidos na reivindicação 2 em amostras de sangue ou tecido mamário em pacientes com câncer de mama.
8. Painel genético caracterizado pelo processo na forma de análise das mutações especificadas na tabela 1 em amostras de sangue e tecido neoplásicos da mama contidos na reivindicação 2.

PAINEL GENÉTICO PARA ANÁLISE, IDENTIFICAÇÃO E DIAGNÓSTICO DE MUTAÇÕES EM CÂNCER DE MAMA

Resumo

A presente invenção é direcionada no que diz respeito a mutações específicas somáticas e/ou germinativas em genes que possuem relação com o câncer de mama e que podem vir a ser utilizados como marcadores de diagnóstico tais como preditores de lesão pré-maligna e desenvolvimento dessa neoplasia. Os genes mutantes identificados foram analisados e processados por análises de bioinformática, que posteriormente será analisada a integridade destes genes por técnicas de biologia molecular, como por exemplo, a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS), microarranjo de DNA e PCR em tempo real.

FIGURA 01: Esquema de procedimentos de coleta, tratamento e análise das amostras de câncer de mama.



ANEXO A – FICHA DE COLETA DE DADOS CLÍNICOS

Questionário aplicado as pacientes

Número do questionário:	Número de prontuário:
Tipo de material de coleta:	
Hospital:	
Médico Responsável:	
Data do Prontuário: ____/____/____ Data da coleta dos dados: ____/____/____	
I. DADOS PESSOAIS:	
1.1. Idade: Sexo: # F # M Etnia:	
Município que reside:	Telefones:
1.2. Casada # sim # não Profissão:	
1.3 Escolaridade: # sem instrução # 1º grau incompleto # 1º grau completo # 2º grau incompleto # 2º grau completo # superior incompleto	
II. QUESTIONÁRIO	
Tabagismo # sim # não Obesidade # sim # não Etilismo # sim # não	
Nuliparidade # sim # não Histórico de aborto #	
Idade da Menarca:	Usa Contraceptivos orais # sim # não
Idade da Primeira gestação: Quantos filhos: Amamentação # sim # não	
Tempo de amamentação: Quantos amamentados:	
Está na Menopausa # sim # não Idade da Menopausa:	
Faz terapia de reposição hormonal # sim # não Quanto tempo:	
III. QUESTIONÁRIO (Antecedentes familiares de câncer de mama):	
1. Há algum histórico de câncer de mama na família? # sim # não #	
IV. QUESTIONÁRIO (Antecedentes pessoais de câncer de mama):	
1. Há antecedentes pessoais de câncer de mama? # sim # não # não sabe	
2. Qual foi o sinal de alerta/alteração encontrada na sua mama que a fez procurar o médico?	
# nódulo # secreção # inflamação # alteração na	

3. Como você ficou sabendo que tinha alteração na mama? # auto-exame # exame clínico #
4. Qual a sua idade quando foi detectada alteração na sua mama?
5. Qual o tempo decorrido entre a suspeita e a confirmação da doença?.
6. Fez algum tipo de tratamento? # sim # não
7. Qual tipo de tratamento? # Cirurgia # Quimioterapia # Radioterapia Outros:
8. Tempo de tratamento: # < 6 meses # 6 meses # 1 ano # > 1 ano Outros:
9. A paciente teve metástases? # sim # não
10. Houve recidiva do tumor? # sim # não
11. Os exames confirmatórios foram realizados no município de origem? # sim # não. Em qual?
V. QUESTIONÁRIO (características do tumor) 1. Tipo Histológico: # Ductal # Lobular Outros: 2. Estadiamento Patológico: # E0 # EI # EII # EIII 3. Imunoistoquímica: # RE/RP/HER-2 + # RE/RP-HER+ # RE/RP/HER-2 - # RE + RP-HER+ # RE/RP+HER-2- # RE+RP-HER-
VI. TIPO DE PROCEDIMENTO CIRÚRGICO # Mastectomia # Quadrentectomia # Oncoplastia # Mastect. + Reconst Linfonodo Sentinela

**ANEXO B – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
(TCLE)**

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, na pesquisa “IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES PARA CÂNCER DE MAMA UTILIZANDO ION TORRENT (LIFE TECHNOLOGY) E REAL TIME PCR

(qPCR)”. Após ser esclarecida sobre os objetivos do projeto, e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa, você não será penalizada de forma alguma.

O presente projeto enquadra-se como pesquisa científica destinada ao suporte na área de oncologia no estado de Pernambuco, pelo uso de tecnologias de última geração para diagnóstico molecular de neoplasias de mama.

A) Sua contribuição consiste na doação de sangue e tecido mamário para diagnósticos laboratoriais.

B) Neste projeto, sua identidade será totalmente preservada. Fica claro que você como participante não terá ganho ou perda financeira relacionada com a participação no projeto, e a qualquer momento pode desistir de colaborar da pesquisa.

C) Caso aceite participar, uma cópia deste termo onde consta o nome, telefone e endereço do principal pesquisador, será disponibilizada para o esclarecimento de dúvidas sobre o desenvolvimento do projeto a qualquer momento.

Eu, _____ (nome da paciente), portadora do RG
_____, residente a _____

Fone:: _____ aceito participar desta pesquisa.

Nome da mãe: _____

Declaro ter recebido as devidas explicações sobre a referida pesquisa, que a participação é voluntária e que minha desistência poderá ocorrer em qualquer momento sem que ocorra quaisquer prejuízos físicos, mentais ou no acompanhamento deste serviço.

Recife: / / _____

Assinatura da paciente

Assinatura do pesquisador

Assinatura da testemunha 1

Assinatura da testemunha 2

Certos de poder contar com sua autorização, colocamo-nos à disposição para esclarecimentos, através do telefone (81) 3184-6400, falar com Dr. Darley de Lima Ferreira Filho, Serviço de Mastologia do Hospital Barão de Lucena, pesquisador responsável pela pesquisa.

ANEXO C – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

CENTRO INTEGRADO DE
SAÚDE AMAURY DE
MEDEIROS - CISAM/UPE.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: CARCINOMA INVASIVO DA MAMA TRIPLO NEGATIVO DO TIPO BASAL-LIKE E NÃO BASAL:IMPLICAÇÕES PROGNÓSTICAS

Pesquisador: Darley de Lima Ferreira Filho

Área Temática: Área 9. A critério do CEP.

Versão: 2

CAAE: 05038212.7.0000.5191

Instituição Proponente: FUNDACAO DE SAUDE AMAURY DE MEDEIROS (FUSAM HOSPITAL BARÃO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 164.037

Data da Relatório: 23/10/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo prospectivo (iniciando em 2012 até 2014) tipo coorte a ser realizado no Hospital Barão de Lucena.

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar os exames histopatológicos das pacientes com carcinoma invasivo da mama triplo negativo do tipo basal e não basal em relação ao tipo e grau histológico, invasão vascular, etc.; caracterizar o imunofenótipo basal e não basal dos casos triplo negativos; correlacionar os casos triplo negativos, basais e não basais, com o estadiamento patológico e evolução clínica durante o primeiro ano após cirurgia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não há riscos. Não é um estudo de intervenção, mas sim observacional com avaliação dos resultados nos prontuários.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Tema importante, no entanto o protocolo precisa de vários ajustes.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos foram atendidos

Endereço: Rua Visconde de Manguape, s/nº 1º andar

Bairro: Encruzilhada CEP: 52.090-010

UF: PE Município: RECIFE

Telefone: (81)3182-7729

Fax: (81)3182-7729

E-mail: cgcisam@yahoo.com.br; cisam@cisamupe.com.br

**CENTRO INTEGRADO DE
SAÚDE AMAURY DE
MEDEIROS - CISAM/UPE.**



Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Em relação a não necessidade da TCLE, concordo que não há necessidade, sendo substituído pelo termo confidencialidade.

Em relação as outras pendências, todas foram atendidas: carta de anuência da Diretoria do Hospital Barão Lucena, informação de quem irá patrocinar o estudo, cronograma, curriculum do autor e instrumento de coleta de dados.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Aprovado

RECIFE, 06 de Dezembro de 2012

Assinador por:

CLAUDIO HELIONAR VICENTE DA SILVA
(Coordenador)

Endereço: Rua Visconde de Mamanguape, s/nº 1º andar

Bairro: Encruzilhada

CEP: 52.000-010

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (813)182-7739

Fax: (813)182-7739

E-mail: cgsclam@yahoo.com.br; clam@clamupe.com.br