

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MATO GROSSO DO SUL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM SAÚDE E DESENVOLVIMENTO NA
REGIÃO CENTRO-OESTE**

RAQUEL CRISTINA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E IMUNOLocalização DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO SOX2 NO CÂNCER DE MAMA**

CAMPO GRANDE

2020

RAQUEL CRISTINA RODRIGUES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E IMUNOLocalização DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO SOX2 NO CâNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Almir de Sousa Martins

CAMPO GRANDE

2020

FOLHA DE APROVAÇÃO

RAQUEL CRISTINA RODRIGUES

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO E IMUNOLocalização DO FATOR DE
TRANSCRIÇÃO SOX2 NO CâNCER DE MAMA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Saúde Desenvolvimento na Região Centro Oeste da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Almir de Sousa Martins

A banca examinadora, após avaliação da dissertação, atribui ao candidato o conceito _____.

Campo Grande, MS _____ de _____ 2020.

BANCA EXAMINADORA

NOTA/CONCEITO

Prof. Dr. Almir de Sousa Martins (Orientador)
Universidade Federal de Minas Gerais

Profª Drª Helen de Lima Del Puerto
Universidade Federal de Minas Gerais

Profª Drª Nadia Stella Viegas dos Reis
Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

*Dedico este trabalho àquelas
que com o nascimento me
desconstruíram e diariamente
me reconstroem uma pessoa
melhor! Obrigada Laís e
Estela
Mamãe ama vocês.*

AGRADECIMENTOS

A Nossa Senhora, mãe de todas as mães, a quem rogo todas as manhãs e assim posso ir trabalhar tranquila sabendo que minha família, quando longe de mim, está sob sua proteção.

Ao meu companheiro, amigo, colega...de longa data e amor da minha vida, Walter Peres Jr. Juntos desde a faculdade de medicina na fria Santa Maria, residência médica em Porto Alegre e agora eu no mestrado e você no doutorado. Obrigada por estar comigo em mais essa jornada de crescimento.

A minha amada mãe Leli Rodrigues, sua energia e disposição é contagiante, obrigada pelo carinho comigo e com suas netas. Aos meus irmãos Carmelucia e Prof. Dr. Marcelo (o primeiro a obter o título de doutor na família), obrigada pelo exemplo e amor incondicional.

Ao meu orientador Prof. Dr Almir de Sousa Martins, amigo que fizemos nessa caminhada e que sabe como ninguém orientar tanto para ciência quanto para vida.

Minha co-orientadora Prof. Dra Helen del Puerto, inteligente, com uma amabilidade cativante, dedicada a carreira e a família, mulher a servir de exemplo e inspiração.

A toda equipe do Laboratório de Patologia Geral da ICB/UFG, em especial Prof. Dr Enio Ferreira e dos pós-graduandos Camila Pereira de Lima, Milena de Oliveira, que me acolheram e tiveram paciência de me ensinar a rotina no laboratório. Colaboração de vocês foi fundamental para sucesso desse projeto.

A Dra Maria de Lourdes Aguiar que gentilmente abriu as portas do setor de patologia do HUMAP, proporcionando que as amostras utilizadas no projeto fossem resgatadas.

Aos residentes do programa de ginecologia-obstetrícia do HUMAP que foram minha retaguarda junto aos pacientes para que eu pudesse me dedicar a pós-graduação.

A todas as mulheres, mães, esposas, profissionais que fazem pesquisa, só nós sabemos quanto é difícil conciliar a vida pessoal com os estudos.

As queridas vitoriosas que enfrentaram o câncer de mama.

*Don't hesitate, cause the world seems cold
Stay young at heart, and you'll never, never be
Alone...*

Miles Daves

RESUMO

As pesquisas sobre as características moleculares dos carcinomas mamários têm disponibilizado informações sobre seu comportamento, permitindo estabelecer estratégias mais eficazes para seu tratamento. Fatores de transcrição tem sido alvos de estudo nas neoplasias por atuarem na modulação de genes que codificam proteínas oncogênicas ou supressores tumorais. Nós investigamos objetivamente a expressão da proteína SOX2 em tumores de mama pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ) e correlacionamos sua expressão com as outras características histopatológicas e moleculares de prognóstico e preditivas como tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, RE, RP, HER2. O Critério de avaliação da imunoeexpressão do fator de transcrição SOX2 baseou-se na porcentagem de células neoplásicas com marcação nuclear (castanho-dourada). A proteína SOX2 apresentou-se expressa em 44% dos casos de carcinoma ductal invasor e ao compararmos o estadiamento clínico do câncer de mama com a positividade do fator SOX2, apreciamos que o mesmo se encontra expresso nos tumores maiores e com maior comprometimento linfonodal, ou seja, de pior estadiamento. Quanto a classificação molecular foi possível verificar que a proteína SOX 2 encontrava-se superexpressa em tumores HER2 positivo, já com relação ao RE e RP, o SOX2 mostrou-se negativo na maioria das amostras em que os receptores hormonais estavam positivados. O fator de transcrição SOX2 tem sido visto como um potencial marcador de prognóstico e sobrevida, devendo no futuro ser incluído no rol de biomarcadores tumorais emergentes para o câncer de mama, logo mais estudos como o nosso envolvendo a proteína SOX2 e o câncer de mama podem fornecer pistas importantes para o diagnóstico e tratamento da doença.

Palavras chave: SOX2; HER-2; Câncer de Mama; IHQ; Carcinoma Ductal Invasor; Prognóstico.

ABSTRACT

Research on the molecular characteristics of breast carcinomas has provided information on their behavior, allowing them to establish more effective strategies for their treatment. Transcription factors have been the target of study in neoplasms because they act in the modulation of genes that encode oncogenic proteins or tumor suppressors. The present work aimed to investigate the expression of SOX2 in breast tumors through immunohistochemistry (IHC) and to correlate its expression with the other histopathological and molecular prognostic and predictive characteristics, such as tumor size, lymph node involvement, RE, RP, and HER2. The SOX2 immunoexpression evaluation criterion was based on the percentage of neoplastic cells with nuclear staining (golden-brown). The SOX2 protein was expressed in 44% of the samples and, when comparing the clinical stage of breast cancer with the positivity of the SOX2 factor, we note that it is expressed in larger tumors with greater lymphatic involvement, that is, those of higher stage. With respect to molecular classification, it was possible to verify that in all the samples in which HER2 was present with a score greater than 3, the SOX 2 protein was also positive; In relation to ER and PR, SOX2 was negative in most of the samples in which the hormonal receptors were positive. The transcription factor SOX2 has been seen as a possible prognostic and survival marker and should be included in the list of emerging tumor biomarkers for breast cancer in the future. Therefore, other studies, such as ours, on SOX2 proteins and breast cancer, can provide important runway for the diagnosis and treatment of the disease.

Keywords: SOX2; HER-2; Breast Cancer; IHC; Invasive Ductal Carcinoma; Prognosis

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Correlação entre a expressão de SOX2 e as características clínicopatológicas no câncer de mama.	40
Tabela 2	Classificação Molecular para câncer de mama, na população estudada, Campo Grande - MS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma	18
Figura 2	Unidade ducto-lobular terminal de tecido mamário normal	19
Figura 3	Classificação Patológica do sistema TNM	21
Figura 4	Estrutura Cristalina de SOX2 modulada em RasMaol	27
Figura 5	Papel do SOX2 no Câncer de Mama	28
Figura 6	Estadiamento Clínico TNM	32
Figura 7	Graduação Histológica de Nottingham	33
Figura 8	Subtipos Moleculares	33
Figura 9	Características dos Anticorpos e SOX2	34
Figura 10	Score de Graduação da Expressão da Proteína SOX2	35
Figura 11	Resultado de IHQ para SOX2 em amostra de carcinoma ductal invasor de mama	36
Figura 12	Resultado de IHQ para SOX2 em amostra de carcinoma ductal invasor de mama	37
Figura 13	Resultado de IHQ para SOX2 em amostra de carcinoma ductal invasor de mama – Núcleo	37
Figura 14	Análise Imunohistoquímica da expressão de SOX2 em Carcinoma Ductal Invasor	38
Figura 15	Comparação entre idade das pacientes no momento do diagnóstico do câncer de mama e a expressão do fator de transcrição SOX2 nas amostras cancerígenas estudadas	39
Figura 16	Comprometimento Linfonodal, Invasão Vascular e Embolização Linfática no Câncer de Mama e sua Correlação com a Proteína SOX2	41
Figura 17	Correlação entre o Fator de Transcrição SOX2 e Linfonodos Axilares Metastáticos em amostras de tecido cancerígeno mamário feminino	42

- Figura 18 Correlação entre o Fator de Crescimento Epidermal Humano (HER2) e o fator de transcrição SOX2 em amostras de tecido cancerígeno mamário feminino 43
- Figura 19 Correlação entre expressão de SOX2 e HER2. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk's demonstrando a correlação da Proteína SOX2 em pacientes com câncer de mama com a expressão de HER2 superexpressão de SOX2 em tumores subtipos Luminal B com HER2 positivo e nos canceres HER2 positivo 44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC: American Joint Comite Cancer

ASCO: American Society of Clinical Oncology

BRCA1: Breast cancer type 1 susceptibility protein

BRCA2: Breast cancer type 2 susceptibility protein

CAP: Proteína ativadora de Catabólito

CCND1: Cyclin D1

CDI: Carcinoma Ductal Invasor

CDI – SOE: Carcinoma Ductal Invasor – Sem Outras Especificações

CK: Citoqueratina

CLI: Carcinoma Lobular Invasor

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGFR: Receptor do Fator Crescimento Epitelial

GATA3: GATA binding protein 3

HER-2: Human Epidermal growth factor Receptor-type 2

HMG: Domínio de Alta Mobilidade

HUMAP/UFMS: Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian/ Universidade Federal do Mato Grosso do Sul

Ki 67/ MKI 67: Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67

IHQ: Imunohistoquímica

INCA: Instituto Nacional do Câncer

LN: Linfonodo

MMP2/ MMP3: Matrix Metalloproteinase-2 and 3

OMS/WHO: Organização Mundial da Saúde

PI3K/AKT/mTOR: phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin

P21Cip: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1

P27 Kip: Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B

P53: Tumor protein P53

RE: Receptor de Estrogênio

RP: Receptor de Progesterona

SISCAN: Sistema de Informação do Câncer

SOX/ SRY: Sex Determining Region Y

SOX2: Sex Determining Region Y-box 2

TDLU: Unidade Ducto-Lobular Terminal

TNM: Tumor Nódulo Metástase

UICC: International Union Against Cancer

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	13
2. REVISÃO DA LITERATURA	17
2.1 O Câncer de Mama no Brasil e no Mundo	17
2.2 A Heterogeneidade do Câncer de Mama	18
2.3 A Classificação Molecular no Câncer de Mama e sua Relevância	22
2.4 Proteína SOX e sua relação com as Neoplasias	26
2.5 Proteína SOX2 e sua Interação com o Câncer de Mama	27
3. OBJETIVOS	30
3.1 Objetivo geral	30
3.2 Objetivos secundários	30
4. METODOLOGIA	31
4.1 Aspectos éticos	31
4.2 Delineamento do estudo	31
4.3 Seleção das amostras	31
4.4 Estadiamento Clínico do Tumor	32
4.5 Características Histopatológicas do Tumor	32
4.6 Perfil Imunohistoquímico e Subtipos Moleculares do Tumor	33
4.7 Avaliação Imunohistoquímica da Expressão e Imunolocalização de SOX2	34
4.8. Processamento e Análise de Dados	35
5. RESULTADOS	36
6. DISCUSSÃO	45
7. CONCLUSÃO	48

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49
ANEXO A	56
ANEXO B	58

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama trata-se de uma enfermidade de caráter multifatorial, desencadeada, fundamentalmente, pela perda do equilíbrio entre a atividade de oncogenes e genes supressores tumorais, o que resulta na alteração do controle da proliferação celular (VAN'T VEER, 2002; VIALE, 2012). Também é cada vez mais entendida como uma doença heterogênea, isso porque neoplasias de morfologia semelhante podem apresentar perfis moleculares diferentes, não detectáveis pelo exame histopatológico convencional. Especula-se que cada tumor seja único e que seus conteúdos de DNA sejam individualmente distintos (BARROS; LEITE, 2015; PEROU et al., 2000). Características como idade, etnia, estilo de vida, hábitos alimentares, mudança nos fatores reprodutivos, história familiar, presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e utilização de reposição hormonal são fatores que interferem no diagnóstico e desenvolvimento do câncer de mama (VOGUEL, 2008).

Apesar dos avanços nas pesquisas, o câncer de mama é ainda a neoplasia maligna que mais acomete as mulheres, excetuando-se o câncer de pele não melanoma. Por outro lado, a taxa de mortalidade pelo câncer de mama é bastante diferente entre os países desenvolvidos e os em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos houve importante redução da mortalidade nos últimos anos, contudo permanece sendo a segunda maior causa de morte em mulheres com idade entre 45 e 55 anos nos Estados Unidos (APURI, 2017). Já nos países em desenvolvimento observou-se estabilidade ou mesmo contínuo aumento da mortalidade por esse câncer (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Esta discrepância pode ser atribuída às diferenças nas políticas de detecção precoce da doença, visto que o câncer de mama é o tumor que mais apresenta evidências científicas sobre o impacto do rastreamento na redução da mortalidade (HARRIS, 2013).

A neoplasia, se diagnosticada precocemente e tratada de forma adequada, possui bom prognóstico, com sobrevida média em cinco anos de 83% a 92%, podendo chegar a 98% nos casos de doença localizada. Assim, faz-se necessário o desenvolvimento de novos estudos que visem não só o diagnóstico do câncer de mama em fases iniciais e o tratamento efetivo, mas também a qualidade de vida e a redução da morbidade pós-tratamento (ASSI et al. 2013; IARC 2015; TAO et al., 2015).

O câncer de mama é menos frequente em mulheres com idade inferior aos 40 anos, no entanto a taxa de mortalidade é mais elevada nesse grupo de pacientes, quando em

comparação as mulheres na pós menopausa. Não é infrequente que a doença se apresente nas mulheres com menos de 40 anos com um maior grau histológico, maior invasão linfovascular, receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) negativos e aumento da expressão de receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2 ou CERBB2), nessas mulheres é maior as chances de recidiva local e sistêmica, e menor taxa de sobrevida global. (CANCELLO et al., 2010). Foi demonstrado, através de análises genômicas, que os tumores nas pacientes jovens representam uma entidade biológica distinta, caracterizada por padrões moleculares únicos e um pior prognóstico (ANDERS et al., 2008).

Desta maneira, o tratamento para o câncer de mama tem requerido uma abordagem multidisciplinar (com cirurgia, quimioterapia, radioterapia, terapia direcionada e hormonioterapia), e vem experimentando um período de rápida evolução em virtude dos avanços no campo genômico, da biologia tumoral e da imunologia. Estas áreas têm fornecido informações valiosas sobre a heterogeneidade entre os tumores mamários, chave para o caminho oncogênico e o papel do sistema imunológico na história natural da doença.

Embora o diagnóstico da neoplasia seja principalmente histológico, testes auxiliares apoiam o seu diagnóstico, classificação, prognóstico e previsão de resposta à terapia. A classificação morfológica elementar amplamente empregada na classificação do câncer de mama se tornou insuficiente para descrever esses tumores.

A identificação e diferenciação dos fenótipos moleculares no câncer de mama através da análise do perfil imunohistoquímico possui importância em relação ao prognóstico da doença. A expressão desses marcadores está diretamente relacionada ao tratamento adequado para cada tipo de câncer (CHEN et al., 2014; CHENG et al, 2013).

Os marcadores tumorais são componentes teciduais, plasmáticos e genéticos capazes de definir diferentes características a uma patologia (SATO et al. 2014). Através do estudo dos marcadores tumorais consegue-se ter uma melhor compreensão a respeito das bases moleculares e celulares de iniciação e progressão do câncer (GOBBI, 2012). Estudos mostram que a positividade dos marcadores RE, RP, HER-2, citoqueratina 5/6 (Ck 5/6), anticorpo monoclonal Ki-67 (Ki67) e receptor do fator de crescimento epitelial (EGFR) possuem fator prognóstico e preditivo relativos à doença. Em contrapartida, cânceres negativos para tais marcadores tumorais conferem às pacientes um pior prognóstico, por apresentarem características clínicas ligadas ao maior tamanho tumoral, estadiamento de grau elevado e alto risco de desenvolvimento de metástases a distância (BRUFISKY et al., 2014; O-CHAROENRAT, 2015).

Os genes de determinação do sexo-região y (SOX) codificam proteínas que atuam como fatores de transcrição com papel importante no desenvolvimento embrionário e na carcinogênese. A família SOX representa 20 genes responsáveis por regular os padrões de expressão genética de linhagens celulares e tecido, controlando vários processos do desenvolvimento, incluindo diferenciação celular, diferenciação sexual e organogênese. Como é o caso de muitos genes envolvidos na regulação do desenvolvimento, os genes SOX são frequentemente desregulados no câncer (THU et al., 2014).

Os membros da família SOX podem atuar como oncogenes, genes supressores de tumor ou ambos, dependendo do contexto celular, e podem ser ativados ou inativados através de uma variedade de mecanismos genéticos e epigenéticos, incluindo alterações no número de cópias de DNA, alterações de metilação do DNA e expressão aberrante de miRNA (CASTILLO; SANCHEZ-CESPEDES, 2012; DONG et al., 2004).

Diversos estudos têm demonstrado as funções exercidas pelos membros da família SOX inclusive em estágios embrionários muito precoces, desempenhando um papel crítico na biologia das células-tronco, na organogênese e no desenvolvimento animal (GUTH; WEGNER, 2008; LEFEBVRE et al., 2007; LOVELL-BADGE, 2010). Como exemplos dos papéis oncogênicos das proteínas da família SOX, foi possível observar a expressão do SOX2 em 43% dos carcinomas mamários do tipo Basal-like e fortemente correlacionado com CK5 / 6, EGFR e imunorreatividade de vimentina, sugerindo que SOX2 deve desempenhar um papel no desenvolvimento de um fenótipo menos diferenciado desses tumores (RODRIGUEZ - PINILLA et al., 2007).

Portanto, pode-se inferir que o câncer de mama é uma doença de característica heterogênea, que se reflete na sua classificação molecular, na sua morfologia, curso clínico e resposta ao tratamento (SEONG et al., 2015; VAN SCHOONEVELD et al., 2015). Não obstante, apesar da gama de descobertas em torno do carcinoma mamário, o resultado clínico dos pacientes acometidos permanece insatisfatório. Isto se deve principalmente em virtude da incompleta compreensão em relação aos mecanismos moleculares envolvidos no desenvolvimento e comportamento desse carcinoma, tornando urgente a necessidade de explorá-los mais profundamente. As pesquisas sobre as características moleculares dos carcinomas mamários têm disponibilizado muitas informações sobre o comportamento destes tumores e, com isso, tem permitido estabelecer estratégias de tratamento mais eficazes (GRALOW et al., 2008).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo investigar o fator de transcrição SOX2 em tumores de mama, e correlacionar sua expressão com outras

características tumorais de prognóstico e preditivas de resposta ao tratamento já validadas na literatura, e assim fomentar a elaboração de novas estratégias terapêuticas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 O Câncer de Mama no Brasil e no Mundo

A Organização Mundial de Saúde (OMS) classifica o câncer no grupo de doenças não transmissíveis, juntamente com doenças cardíacas, infarto, doenças respiratórias crônicas e diabetes, sendo que esse grupo é a principal causador de mortes no mundo (WHO, 2019).

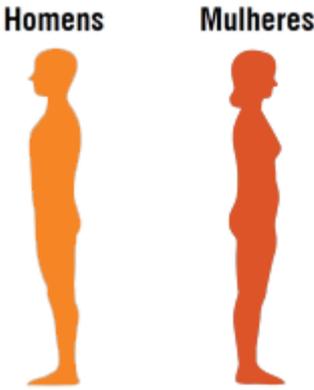
Conforme a International Agency for Research on Cancer, em 2018 foram diagnosticados 2,1 milhões de novos casos de câncer de mama no mundo, representando quase um em cada quatro casos de câncer entre mulheres. Com um índice de 630.000 óbitos pela mesma doença, correspondendo, ainda a principal causa de mortes relacionadas ao câncer em mulheres na Europa e no mundo (BRAY et al., 2018).

Para o Brasil, estimam-se 59.700 casos novos de câncer de mama, para cada ano do biênio 2018-2019, 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). Em 2018 16.724 mulheres foram a óbito no Brasil devido ao câncer de mama, correspondendo 16,1% de todos os casos de óbito em mulheres acometidas por neoplasias, quase 5% a mais de casos de óbito com relação ao segundo colocado (INCA, 2018). A detecção do câncer de mama teve um acréscimo considerável desde a introdução da triagem mamográfica e continua a crescer com o envelhecimento da população. Os fatores de risco mais importantes incluem: predisposição genética, exposição a estrogênios (endógenos e exógenos, incluindo terapia de reposição hormonal a longo prazo), radiação ionizante, baixa paridade, alta densidade mamária e histórico de hiperplasia atípica.

A dieta ao estilo ocidental, a obesidade e o consumo de álcool também contribuem para a crescente incidência de câncer de mama. Assim como em todas as neoplasias epiteliais, a incidência do câncer de mama aumenta rapidamente de acordo com a idade, elevando-se gradativamente até a menopausa e diminuindo após a mesma (ARAGÓN et al., 2014; CAPLAN, 2014). Em função da crescente incidência mundial, das altas taxas de mortalidade

e do elevado custo com o tratamento, o câncer de mama tem sido considerado um problema de saúde pública em diversos países.

Figura 1 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2018 por sexo, exceto pele não melanoma.

Localização primária	Casos	%		Localização primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%		Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio Pulmão	18.740	8,7%		Cólon/ Reto	18.980	9,4%
Cólon/Reto	17.380	8,1%		Colo Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%		Traqueia, Brônquio Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%		Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%		Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%		Corpo Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%		Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%		Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%		Leucemias	4.860	2,4%

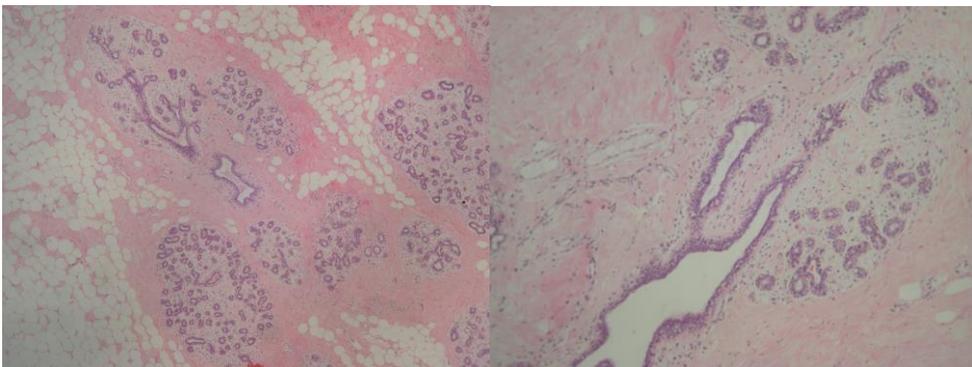
Fonte: INCA (2018)

2.2 A Heterogeneidade do Câncer de Mama

A mama humana é composta por uma ramificação de redes de ductos contendo células epiteliais luminiais e mioepiteliais (Figura 2) que se encerram em pequenas estruturas ductais denominadas unidades ductal lobular terminal (TDLU).

As células epiteliais ductais formam os ductos, as células epiteliais alveolares são as células produtoras de leite e as células mioepiteliais, são células contrateis que revestem os ductos e os alvéolos (KAKARALA; WICHA, 2008). O estroma mamário é formado por tecido adiposo e conjuntivo envolvendo a TDLU, os vasos sanguíneos e os vasos linfáticos (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2012).

Figura 2 – Unidade ducto-lobular terminal de tecido mamário normal.



Fonte: Próprio autor

Portanto, a glândula mamária derivada da epiderme tem o seu desenvolvimento depende das interações estroma-epitélio que modulam o desenvolvimento normal da mama e participam da transformação maligna do tecido, regulando o crescimento, sobrevivência, migração e diferenciação do epitélio da mama (KASS et al., 2007).

O processo de formação do tumor é complexo e envolve múltiplos fatores que facilitam as mutações nas células, o que determina a expressão de oncogenes e a supressão de genes que previnem o desenvolvimento dele. As diferentes mutações conferem diversas vantagens seletivas para as células tumorais, permitindo seu crescimento (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A história natural do câncer de mama ainda não é bem compreendida, já que seu comportamento evolutivo não se reproduz de maneira uniforme em todas as mulheres. Busca-se explicar esta divergência comportamental de alguns tumores que possuem as mesmas características clínicas, com os conhecimentos adquiridos através dos fatores prognósticos que envolvem o contexto geral do câncer de mama. Assim, têm-se além do diagnóstico da doença

em si, aspectos de achados clínicos e biológicos que se associam às diferenças de tempo livre de doença e a sobrevida global.

Fatores prognósticos em câncer de mama compreendem características clínicas dos pacientes e aspectos patológicos e biológicos dos tumores que determinam a evolução clínica da doença, isto é, a probabilidade, à época do diagnóstico ou tratamento cirúrgico, de recorrência da neoplasia e a sobrevida global do paciente sem tratamento adjuvante. Fatores preditivos, em contraste, são características clínicas, patológicas e biológicas utilizadas para estimar a probabilidade de resposta a um tipo específico de terapia adjuvante. Marcadores prognósticos e preditivos devem ser validados tecnicamente, ter significado estatístico comprovado por testes clínicos e influenciar na decisão clínica (GOLDHIRSCH et al., 2009; SOERJOMATARAM et al., 2008).

As variáveis clínico-patológicas têm um profundo impacto na sobrevivência e são responsáveis pela maior parte das diferenças no resultado clínico entre pacientes com câncer de mama e são mais bem ilustradas pelo estadiamento clínico da doença com base em exame físico e achados de imagem. O sistema de estadiamento TNM da American Joint Comitee de Cancer (AJCC) / União Internacional de Controle do Câncer (UICC) incorpora tamanho do tumor, status linfonodal regional e metástases à distância (Figura 3) (HORTOBAGYI, 2017).

A heterogeneidade morfológica é uma das características da malignidade e constitui a base para a classificação histopatológica do câncer de mama. Sendo que, os carcinomas infiltrativos ductais e lobulares, tanto em sua forma pura ou combinada a outros tipos de tumor, são as formas mais comuns de câncer de mama. Carcinoma ductal invasivo (CDI) de tipo não especial ou não especificado de outra forma (SOE) é o tipo histológico mais comum (40-75%) de câncer de mama invasivo. Embora comum, a classificação da OMS defina CDI SOE por exclusão, como “o grupo heterogêneo de tumores que não apresentam características suficientes para alcançar classificação como tipo histológico específico”. Além do CDI SOE, a classificação da OMS inclui 21 subtipos com características morfológicas distintas, das quais carcinoma lobular invasivo (CLI) é o mais frequente (5–15%) (LAKHANI et al., 2012). Os outros subtipos especiais de carcinoma de mama são raros e diferem significativamente em relação ao prognóstico e resposta ao tratamento adjuvante. Carcinomas tubulares, mucinosos e papilares geralmente apresentam excelente resultado clínico em comparação ao CDI e CLI e nem sempre são tratados com quimioterapia. Já os carcinomas metaplásicos e CDI SOE pouco diferenciados têm um resultado significativamente pior e são rotineiramente tratados com quimioterapia sistêmica (COLLEONI, 2011).

Pacientes com tumores ductais infiltrativos geralmente apresentam maior incidência de linfonodos axilares positivos e piores prognósticos clínicos que as pacientes com tipos de tumor infiltrativo menos comum (ALBAIN; ALLRED et al., 1994).

Figura 3 – Classificação Patológica do sistema *tumor-node-metastasis* (TNM – AJCC).

MAMA			
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>		
T1	≤ 2cm		
T1mic	≤ 0,1cm		
T1a	> 0,1cm até 0,5cm		
T1b	> 0,5cm até 1cm		
T1c	> 1cm até 2cm		
T2	> 2cm até 5cm		
T3	> 5cm		
T4	Parede torácica/pele		
T4a	Parede torácica		
T4b	Edema/ulcera, nódulos cutâneos satélites		
T4c	T4a + T4b		
T4d	Carcinoma Inflamatório		
N1	Linfonodos axilares(LNA) móveis	pN1mi	Micrometástase, >0,2mm ≤2mm
		pN1a	1-3 LNA
		pN1b	Metástase microscópica em LN da mama interna
		pN1c	1-3 linfonodos axilares + LN mama interna com metástase micro
N2a	LNA fixos	pN2a	4-9 LNA+
N2b	LN mama Interna clinicamente aparente(MI)	pN2b	LNMI + LNA -
N3a	LN infra-clavicular	pN3a	≥ 10 LNA + ou infra-clavicular +
N3b	LNA + e LNMI +	pN3b	
N3c	LN supraclaviculares	pN3c	LN supra-claviculares
M	Metástase à distância		Sítios mais comuns: ossos, fígado, pulmão

Fonte: <https://cancerstaging.org/>

O grau histológico também destaca a heterogeneidade tumoral no câncer de mama. O grau é avaliado de acordo com um sistema de três renques (baixo grau, grau intermediário, alto grau), com base na avaliação de três parâmetros: porcentagem de tumor disposto nas estruturas tubulares da glândula, o grau de pleomorfismo nuclear e a taxa mitótica (ELSTON; ELLIS, 1991). O grau de carcinoma da mama é um forte fator prognóstico e é uma das ferramentas incorporadas na tomada de decisão, assim como o Índice Prognóstico de Nottingham e o Adjuvant! Online. Os cânceres de mama de diferentes graus também mostram perfis diferentes por análise proteômica, genômica e transcriptômica (SOTIRIOU et al., 2011). Em modelos multivariados que incluem assinaturas de genes, o grau continua a ser um fator prognóstico independente para tumores RE positivo. Os carcinomas de mama de grau 1 e 3 provavelmente representam duas doenças muito diferentes, e dados moleculares indicam que a progressão do carcinoma de baixo para o de alto grau é muito raro (NATRAJAN et al., 2009).

Assim, o tratamento padrão do câncer de mama tem sido baseado nas características do tumor, incluindo estágio tumoral, características histopatológicas e perfil dos biomarcadores, e é afetado pela idade do paciente, status da menopausa e saúde geral da paciente (HARRIS, 2013).

2.3 Classificação Molecular no Câncer de Mama e sua Relevância

O câncer de mama é uma doença genética complexa, caracterizada pelo acúmulo de alterações moleculares múltiplas. Ele constitui um grupo heterogêneo de neoplasias, constituído por vários tipos histológicos, que diferem nas manifestações clínicas, evolução e resposta terapêutica. Até recentemente, a classificação dos carcinomas mamários baseava-se essencialmente em seus aspectos morfológicos (ELSTON; ELLIS, 1991). No entanto, tumores classificados sob um mesmo termo descritivo podem ter aspectos moleculares e evolução biológica variados. A heterogeneidade molecular do câncer de mama, não avaliável morfológicamente, representa grande desafio ao estudo e tratamento desta doença (GOLDHIRSCH et al., 2011). Apesar da heterogeneidade ao nível celular já ser reconhecida

no câncer de mama desde o século XIX, sua relevância clínica foi estabelecida pela primeira vez há cerca de 30 anos, com a introdução teste de receptores de estrogênio.

Estudos de perfil de expressão genica têm sugerido que os testes moleculares poderiam ter um desempenho melhor do que a histopatologia tradicional, sendo assim usado como "padrão ouro" no que tange prognóstico e previsão de resposta ao tratamento (PEPPERCORN; PEROU; CAREY, 2008).

Devido aos custos, tempo e conhecimento técnico necessários para ensaios moleculares, foram desenvolvidos métodos alternativos para avaliação indireta dos subtipos moleculares que podem ser usados na maioria dos laboratórios. O painel de coloração por imunohistoquímica compreendendo RE, RP, HER2, Ki-67, EGFR e CK5/6 podem identificar os subtipos moleculares de câncer de mama com precisão satisfatória e reproduzível.

Atualmente existem três fatores moleculares prognósticos/preditivos validados para uso clínico rotineiro no tratamento das pacientes com câncer de mama, São eles, os receptores hormonais para estrógeno (RE) e progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER-2).A expressão de RE, RP e HER2 são avaliados rotineiramente em todos os carcinomas invasivos da mama por imunohistoquímica (IHC), de acordo com as recomendações da American Society of Clíical Oncology / College of American Pathologist (ASCO /CAP). Tais biomarcadores são fatores prognósticos e preditivos já bem estabelecidos e sua expressão nos carcinomas mamários é fundamental para orientar o tratamento. Além destes, outros marcadores têm sido utilizados somando informações ao perfil molecular do câncer de mama, como Ki-67, p53, marcadores vasculares, p63, CK5 e P-caderina (FASCHING et al., 2011)

Os RE e RP são expressos em aproximadamente 80% e 60-70% dos carcinomas de mama, respectivamente. Apesar dos tumores RE positivos co-expressarem RP (RE + / RP +) em 70-80% dos casos, alguns carcinomas de mama são RE + / RP- ou, raramente, RE- /RP +. A resposta ao tratamento hormonal também varia, apresentando melhor resposta (taxa aproximada de 60%) nos tumores RE + / RP + e taxas mais baixas nos tumores RE + / RP- e RE- / RP +.

HER2 é um proto-oncogene que codifica uma proteína receptora transmembrana com atividade tirosina-quinase envolvida no crescimento celular, diferenciação, apoptose e metástase (YARDEN, SLIWKOWSKI, 2001). A superexpressão da proteína HER-2 é encontrada em aproximadamente 18-20% dos cânceres de mama, sendo amplificação do gene o principal mecanismo de superexpressão gênica. Essa superexpressão está associada a tumores de alto grau, com comprometimento da cadeia linfática (BURSTEIN et al., 2011), e

alta taxa de recidiva e mortalidade (WOLFF et al., 2013). Apesar dos carcinomas mamários HER2-positivos apresentarem um prognóstico mais desfavorável eles têm demonstrado alta taxa de resposta à terapia direcionada anti-HER2, os chamados anticorpos monoclonais, conforme documentado pelo resposta completa ao tratamento pós-neoadjuvante em cerca de 50 a 60% de pacientes com tumores positivos para HER2 (COTAZAR et al., 2014).

Com relação aos receptores hormonais, sabemos que esses atuam no crescimento e diferenciação do epitélio mamário normal. O gene receptor de estrógeno codifica um fator de transcrição nuclear ativado pelo estrógeno e o receptor de progesterona é um gene regulado pelo estrógeno. Eles são usados como indicador de terapia hormonal, melhorando a sobrevida das pacientes. A proteína nuclear Ki-67, codificada pelo gene MKI67 (antígeno identificado por anticorpo monoclonal), está associada à proliferação celular, sendo expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto G0.

Os carcinomas de mama que não expressam RE, RP e HER2, são chamados "triplo-negativos" e constituem um grupo extremamente heterogêneo de tumor tanto histológica e geneticamente quanto em relação ao prognóstico à resposta ao tratamento.

Perou et al. (2000) demonstraram que a diversidade fenotípica dos tumores de mama estava associada à correspondente diversidade de expressão gênica. Para chegar a essa conclusão os autores analisaram 65 amostras de tecidos e selecionado um subconjunto de 456 genes, denominados subconjunto de gene "intrínseco" e consistiam em genes com significativa maior variação de expressão entre diferentes tumores do que entre as amostras emparelhadas do mesmo tumor. Usando esse subconjunto, os autores foram capazes de identificar 4 subtipos moleculares diferentes de câncer de mama: positivo para receptores de estrogênio (RE) / tipo luminal A, mama basal, HER2 positiva e normal. Os dados subsequentes expandiram a classificação para distinguir entre o luminal A e o luminal B. Estes 5 subtipos moleculares foram confirmados em conjuntos de dados independentes e, principalmente, o subtipo de expressão gênica parece consistente entre os tumores primários e lesões metastáticas que ocorrem anos depois. Além disso, os subtipos estão associados a diferenças no resultado clínico. Em estudo subsequente o mesmo grupo de autores, examinaram um subconjunto de 49 pacientes com câncer de mama localmente avançado que foram tratados com doxorrubicina e tiveram um acompanhamento médio de 66 meses, constataram que a sobrevida livre de doença e sobrevida global diferia significativamente entre os subtipos de câncer de mama, tumores luminais A apresentaram maiores tempos de sobrevivência em comparação aos subtipos basal e HER2 tendo esses menores tempos de sobrevida, já os tumores luminais B apresentaram tempo de sobrevida intermediário (SORLIE et al., 2001).

Portanto a análise da expressão gênica classifica o câncer de mama em quatro grandes subtipos moleculares intrínsecos com implicações prognósticas e terapêuticas: luminal A, luminal B, enriquecido com HER2 e basal. Os subtipos A e B luminal exemplificam heterogeneidade tumoral dos carcinomas de mama RE-positivos e têm melhor sobrevida que os subtipos enriquecidos com HER2 ou os basais. Ambos os subtipos luminais expressam RE, mas os tumores luminais B são caracterizados pelo aumento da expressão associada a proliferação de genes e têm pior prognóstico que os tumores A luminais (WIRAPATI et al., 2008).

O subtipo basal é enriquecido para genes expressos em células epiteliais basais e é triplo negativo em 70% dos casos. Subtipos adicionais incluem tumores com baixo nível de claudina com assinatura do tipo células tronco e tumores apócrinos moleculares RA-positivos (PRAT; PEROU, 2011). O estudo de expressão gênica sugere que o impacto prognóstico das diferentes assinaturas está relacionado aos genes associados à proliferação. Embora os perfis de expressão gênica possam prever a resposta a quimioterapia e risco de recorrência, classificação carcinoma mamário baseado na expressão gênica é dificultado por fatores clínicos e heterogeneidade molecular.

Pacientes com carcinoma de mama do mesmo subtipo molecular e que receberam tratamentos idênticos apresentam desfechos clínicos diferentes e ou adquirem resistência à terapia (EBCTCG, 2011). Estudos mais recentes produziram outros subgrupos moleculares, incluindo uma classificação molecular baseada em genômica integrada transcriptômico de 2.000 tumores de mama, produzindo 10 novos subtipos de câncer de mama com resultados clínicos distintos (ALI et al., 2014).

Contudo, é importante entender as limitações e acima de tudo avaliar criticamente o papel da classificação molecular na melhoria do prognóstico do câncer de mama acima e além do variáveis tradicionais de maneira prática e econômica. Atentando-se que existem inúmeras linhas de evidências que sugerirem que esses testes moleculares complementam e não substituem as variáveis patológicas tradicionais, como o Sistema de Gradação de Nottingham e assim definir a terapia ideal para pacientes com câncer de mama (WEIGELT; GEYER; REIS-FILHO, 2010).

2.4 Proteína SOX e sua Relação com as Neoplasias

O primeiro gene SOX a ser clonado com sucesso foi gene SRY, e ele continua a ser o membro definidor da família (GUBBAY et al., 1990). Contudo, à medida que os genes SOX humanos foram clonados, eles tornaram-se candidatos potenciais na gênese das mais variadas doenças e análises de mutação tem ajudado a correlacionar domínios estruturais com suas funções biológicas (PRIOR; WALTER, 1996).

Até pouco tempo, as investigações das funções das proteínas SOX se concentravam no desenvolvimento embrionário e nas informações sobre as suas funções fisiológicas em tecidos adultos. Contudo, desde o início da última década várias correlações foram encontradas entre os fatores de transcrição da família SOX e o câncer, ainda que com bastante incerteza de como tais proteínas exercem seu potencial oncogênico ou supressor tumoral (DONG et al., 2004).

O papel da família de genes SOX na carcinogênese tem sido atribuído às suas propriedades envolvidas na regulação da diferenciação celular, proliferação e sobrevivência em múltiplos processos essenciais (CHOU et al., 2013). Diferentes membros da família de SOX podem desempenhar os mais variados papéis em um grande número de tumores malignos. Alguns deles demonstram potencial oncogênico para promover o desenvolvimento de cânceres enquanto outros comportam-se como genes supressores tumorais, agindo no bloqueio do crescimento dos carcinomas (SONG et al., 2016).

Os genes SOX são potentes moduladores envolvidos no desenvolvimento embrionário e no destino das células, organogênese, manutenção de células-tronco e carcinogênese em múltiplos processos. O papel dos genes SOX na carcinogênese tem sido atribuído às suas propriedades envolvidas na regulação da difusão, proliferação e sobrevivência celular (KAMACHI, 2000).

Evidências crescentes demonstram que as proteínas SOX desempenham papéis essenciais em vários processos celulares que mediam ou contribuem para a transformação oncogênica e a progressão tumoral. No contexto do câncer de mama, as proteínas SOX funcionam como oncogenes e genes supressores tumorais, demonstrando estar associadas grau e estadio do tumor bem como a um prognóstico mais reservado. Tem-se percebido que um subconjunto de proteínas SOX regula aspectos críticos da biologia do câncer de mama, incluindo a estenose do câncer e outras várias vias de sinalização, levando à proliferação

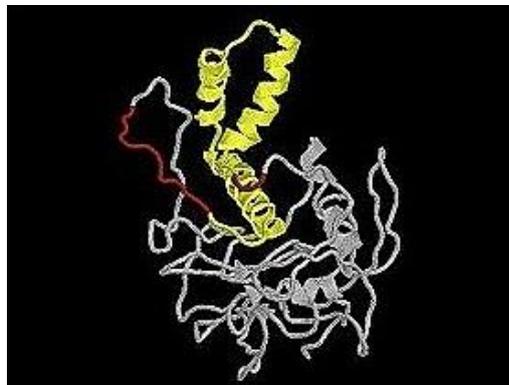
celular alterada, transição epitélio-mesenquimal, migração celular com consequente desenvolvimento tumoral e metástase.

2.5 Proteína SOX 2 e sua Interação com o Câncer de Mama

Sex-determining region Y-box protein 2 (SOX2) é um fator de transcrição embrionário localizado no cromossomo 3q26.3-q27, esse pertence à família de fatores de transcrição SRY-SOX, cujos membros são essenciais para o desenvolvimento e manutenção das células tronco, assim como na proliferação e diferenciação celular. O SOX2 codifica um grupo de fatores de transcrição que são caracterizados por um grupo de domínio de alta mobilidade (HMG) e vai desempenhar um papel importante na manutenção do potencial de diferenciação e da capacidade de auto-renovação de células-tronco embrionárias (LENGERKE et al., 2011).

O SOX2 possui 3 domínios principais: o domínio N-terminal, o domínio do grupo de alta mobilidade e o domínio de transativação (Figura 4) Um número crescente de estudos tem demonstrado que o SOX2 está relacionado a uma variedade de tumores. O silenciamento do SOX2 pode induzir a transcrição de p21Cip1 e p27Kip1, levando à parada do ciclo celular e à inibição do crescimento celular (KELBERMAN et al., 2006).

Figura 4 – Estrutura Cristalina de SOX2 modulada com RasMAol.

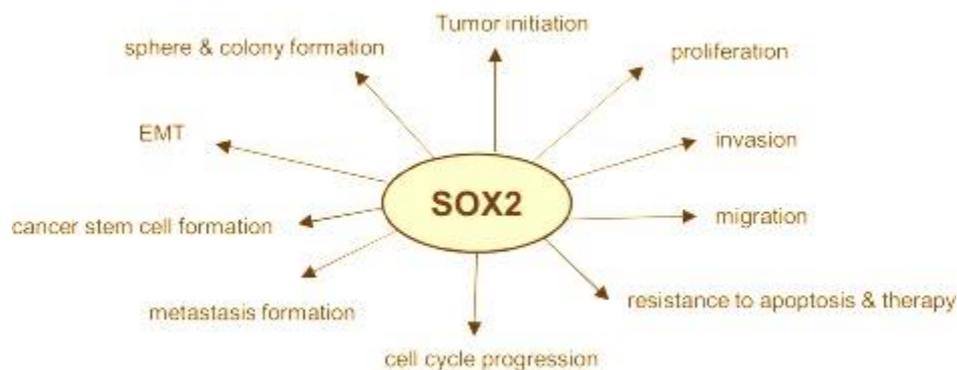


Fonte: Adaptação de Novak et al. (2019)

Estudos realizados nos últimos anos têm apontado que a proteína SOX2 desempenha um papel importante na inibição da apoptose celular e promover a proliferação celular,

medeia a agressividade e a migração de fenótipos ativando MMP3, MMP2 e PI3K /AKT / mTOR, indicando que SOX2 também desempenha um papel na invasão tumoral e na metástase. Com isso, promove a proliferação celular no câncer de mama, próstata e cervical e envolve a fuga de sinais apoptóticos em câncer de próstata, gástrico e pulmão de não pequenas células (Figura 5). Dessa forma, parece a proteína SOX2 estar superexpressa em uma variedade de diferentes fenótipos de câncer de mama e já foi encontrado esporadicamente em carcinomas do tipo molecular basal e com maior frequência nos tipos moleculares mais comuns em mulheres na pós-menopausa recente (FENG, LU, 2017).

Figura 5 – Papel do SOX 2 no câncer.



Fonte: Adaptado de Novak et al (2019)

Lengerke et al. (2011), avaliaram a expressão de SOX2 em 95 pacientes com carcinomas primários da mama na pós-menopausa e relataram sua associação com vários tipos de câncer de mama pós-menopausa precoce e metástases linfonodais. Assim como Rodriguez-Pinilla (2007), com base em estatísticas demonstrou alta expressão de SOX2 em cânceres de mama basal. Quando esses pesquisadores investigaram a associação de SOX2 com tipo basal 43,3% apresentaram imunoreatividade ao SOX2, enquanto a expressão SOX2 foi encontrada apenas em 13,3% dos tipos HER2-positivos e 10,6% dos tumores luminais por análise imuno-histoquímica de 226 cânceres de mama invasivo esporádico com linfonodos negativos. Eles relataram que a expressão SOX2 está diretamente relacionada ao tamanho do tumor, CK5 / 6, receptor do fator de crescimento epidérmico e expressão de vimentina e que

quando a expressão do SOX2 se encontra aumentada tem-se uma diminuição na expressão dos RE e RP.

Parece que a expressão de SOX2 está intimamente relacionada ao tamanho do tumor, grau histológico, metástase linfonodal e fenótipo invasivo triplo negativo, quando se analisa a relação entre SOX2, patologia tumoral e parâmetros clínicos de pacientes com câncer de mama (ZHANG et al., 2012). Eles acreditaram que a detecção da expressão SOX2 possa ter grande valor na determinação do diagnóstico e prognóstico de pacientes com câncer de mama. A proteína SOX2 tem diferente importância no prognóstico dos 5 subtipos moleculares do câncer de mama: basal, luminal A, luminal B, HER2 + e mama normal, no entanto, os mecanismos pelos quais níveis altos SOX2 regulam a progressão e metástase dos cânceres de mama permanece praticamente inexplorado. Assim, a determinação da presença e quantificação da proteína SOX2 no câncer de mama com seu provável potencial oncogênico supressor ou ativador poderá criar vias de diagnóstico precoce, melhorar a resposta ao tratamento, levando a um aumento da sobrevida, tempo livre de doença e com impacto positivo sobre todas as suas comorbidades.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a expressão e imunolocalização do fator de transcrição SOX2 em mulheres com neoplasia maligna da mama.

3.2 Objetivos Específicos

3.2.1 Avaliar a expressão proteica e imunolocalização da proteína SOX2 por imunohistoquímica.

3.2.2 Correlacionar a expressão da proteína SOX2 com as características clinicopatológicas do tumor.

3.2.3 Correlacionar a expressão da proteína SOX2 com a classificação molecular do câncer de mama.

4 METODOLOGIA

4.1 Aspectos Éticos

Este projeto foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal do Mato Grosso do Sul e aprovado sob o parecer 3.723.300, CAAE 20636419.2.0000.0021.

4.2 Delineamento do Estudo

A população do estudo foi composta por mulheres cadastradas no Ambulatório de Mastologia do Hospital Universitário Maria Aparecida Pedrossian (HUMAP), na cidade de Campo Grande, Mato Grosso do Sul, diagnosticadas com Neoplasia Maligna da Mama e submetidas a tratamento cirúrgico conforme protocolo já instituído pelo Serviço de Mastologia da referida instituição hospitalar, no período de janeiro de 2014 a março de 2019. Consistindo assim de um Estudo de Coorte Retrospectivo.

4.3 Seleção das Amostras

A população do estudo foi composta por amostras teciduais já parafinadas de carcinoma mamário invasivo – carcinoma ductal invasivo sem outra especificação, baseada na nova classificação da OMS (LAKHANI et al., 2012), obtidos pelo exame histopatológico da peça cirúrgica e confirmado pela imuno-histoquímica, as amostras foram obtidas do arquivo do Serviço de Patologia do HUMAP.

Foram excluídos do estudo amostras de carcinoma mamário invasivo dos subtipos especiais, as amostras obtidas por punção com agulha grossa, amostras teciduais de mulheres com idade inferior a 30 anos e amostras teciduais masculinas. Também foram excluídos do estudo aqueles em que o consentimento informado não pode ser obtido.

4.4 Estadiamento Clínico

Foi utilizado o estadiamento clínico TNM 7º edição (AJCC, 2010) conforme observado na figura 6.

Figura 6 – Estadiamento clínico conforme TNM - 7ª edição.

	Tis	T0	T1	T2	T3	T4
N0	EC0		EC IA	EC IIA	EC IIB	EC IIIB
N1mic		EC IB		EC IIB	EC IIIA	
N1		EC IIA				
N2	EC IIIA					
N3	EC IIIC					
M1	EC IV					

Fonte: AJCC (2019)

4.5 Características Histopatológicas do Tumor

As características histopatológicas do tumor relacionadas a Tamanho Tumoral, Grau Histológico (Figura 4), Invasão Vascular, Infiltração Perineural, Embolização Linfática e Comprometimento Linfonodal foram obtidas através do Sistema de informações do Câncer (SISCAN) que padroniza o laudo de exame histopatológico de mama de todas as pacientes usuárias do Sistema único de Saúde (SUS).

Nós baseamos na classificação de Nottingham na determinação do grau histológico (Elston-Ellis, 1991), (Figura 7).

Figura 7 – Graduação Histológica de Nottingham (“The Elston-Ellis Modification of Scarff-Bloom-Richardson Grading System”).

GRADUAÇÃO		CÂNCER DE MAMA	
GRADUAÇÃO	NOTTINGHAM	GRADUAÇÃO	BLOOM-RICHARDSON
Variáveis	Pleomorfismo Nuclear	Variáveis	Grau Nuclear
	Contagem Mitótica		Contagem Mitótica
	Formação Tubular		Formação Tubular
Score das Variáveis	1 -3	Score das Variáveis	1 - 3
Grau Histológico	Combinação dos Scores	Grau Histológico	Combinação dos Scores
Baixo Grau	3-5	Baixo Grau	3-5
Grau Intermediário	6-7	Grau intermediário	6-7
Alto Grau	8-9	Alto Grau	8-9

Fonte: Adaptado de Elston, Ellis (1991)

4.6 Perfil Imunohistoquímico e Subtipos Moleculares do Tumor

A Imunohistoquímica é um dos principais métodos para determinar o perfil de expressão proteica no câncer de mama. O painel de coloração por imunohistoquímica compreendendo RE, RP, HER2, Ki-67, podem identificar os subtipos moleculares de câncer de mama com precisão satisfatória e reproduzível para isso adotamos a classificação molecular instituída pela Conferência de St Gallen de 2013 (Figura 8) (UNTCH et al., 2013).

Figura 8 – Subtipos Moleculares Segundo Conferência de St. Gallen de 2013.

Luminal A	ER > 0 ou PR > 0	Ki-67 < 14%	HER2 0/+ /++
Luminal B/ HER 2 -	ER > 0 ou PR > 0	Ki-67 > 14%	HER2 0/+ /++ (Fish -)
Luminal B/ HER2 +	ER > 0 ou PR > 0	Ki-67 > 14%	HER2 +++ ou Fish +
HER2 positivo	ER = 0 e PR = 0		HER2 +++ ou Fish +
Triplo Negativo	ER = 0 e PR = 0		HER2 0/+ /++ (Fish -)

Fonte: Adaptado de 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference.

4.7 Avaliação Imunohistoquímica da Expressão e Imunolocalização de SOX2

A imuno-histoquímica foi realizada pela técnica de reação em peroxidase com identificação a partir de anticorpo secundário biotilado (Polyclonal Rabbit Anti-Goat Immunoglobulin Biotinylated; Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA) e kit de revelação avidina-biotina (ABC Kits; Vector Lab's VECTASTAIN; Burlingame, California USA). A recuperação antigênica ocorreu em calor úmido pressurizado (autoclave a 134°C) com solução de tampão citrato – pH 6,0. Para bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas por três tempos de 5 minutos em solução de H₂O₂ 3% em álcool metílico.

Para bloqueio das proteínas endógenas as lâminas foram incubadas por 20 minutos em Protein Block Serum-Free Ready to Use (Dako North America; Via Real Carpinteria, CA, USA). Os reagentes foram aplicados pela técnica manual, sendo o tempo de incubação do anticorpo primário de 16 horas e do cromógeno 3'3-diaminobenzidina (Liquid DAB+Substrate Chromogen system; Dako North America, Via Real Carpinteria, CA, USA), de 3 minutos. Após a incubação no DAB os cortes foram contra corados com 3 mergulhos em hematoxilina e lavados em água corrente por 5 minutos. Abaixo estão listadas as características do anticorpo e da reação (Tabela 2). Para controle negativo foi omitida a etapa do anticorpo primário, e como controle foi utilizado uma lâmina de cérebro humano.

Figura 9 – Características do Anticorpo e SOX2.

	Fabricante	Clone	Diluição	Tempo de incubação	Recuperação antigênica	Anticorpo secundário
SOX2	R&D AF2018	Policlonal Goat IgG	1:50	16h	Citrato + calor úmido pressurizado	Anti-goat Biotinilado + kit ABC

As amostras foram examinadas quanto à expressão de SOX2 (SOX-2: SRY-box containing gene 2), e sua localização, sendo realizada a contagem para coloração de SOX2 em 1000 células e somente a coloração nuclear foi considerada positiva.

Anintensidade de marcação nuclear, e graduada usando uma pontuação semiquantitativa: score 1: marcação nuclear por imunocoloração forte em menos de 10% das

células cancerígenas, sendo considerado negativo para SOX2 e score 2: marcação nuclear por imunocoloração, forte em mais de 10% das células cancerígenas, sendo considerado positivo para SOX2 (Figura 10) .

Figura 10 – Score de Graduação da expressão da proteína SOX2.

Padrão de Coloração Nuclear	Score	Conclusão	SOX2
Imunocoloração Nuclear forte em <10% das células	1	Negativo	Negativo
Imunocoloração Nuclear forte em ≥10% das células	2	Positivo	Positivo

4.8 Processamento e Análise dos Dados

Foi realizada a contagem dos núcleos em 1000 células, sendo consideradas positivas as células com marcação nuclear castanho-dourado forte para SOX2 e negativas a ausência de coloração nuclear. Como controle positivo foi usado a marcação de SOX2 em cérebro humano e controle negativo lâmina de carcinoma ductal invasor incubada apenas com anticorpo secundário, para comprovar a ausência de marcação inespecífica.

A análise dos dados envolveu estatística descritiva e inferencial. O teste de normalidade de Shapiro-Wilk vislumbrou padrão paramétrico das variáveis contínuas. Diante disso, para a análise estatística dessas variáveis, foi aplicado média \pm desvio padrão para a descrição dos dados. As variáveis categóricas foram descritivas em número de eventos e porcentagem, e tiveram a estatística inferencial analisada pelo teste de qui-quadrado. Para todas as análises foi admitido nível de significância em 5% ($p < 0,05$).

5 RESULTADOS

Foram obtidos nos arquivos do Laboratório de Patologia do HUMAP 33 blocos parafinados de casos de carcinoma ductal invasor mamário. Desses 15 casos foram excluídos devido quantidade insuficiente de tumor avaliável nos cortes ou devido ausência da realização prévia de imunohistoquímica para receptores hormonais (RE, RP), Ki67 ou HER-2. Com amostra final perfazendo um total de 18 participantes.

Todos as 18 amostras tumorais tiveram núcleos fortemente corados para SOX2 variando apenas o número de núcleos, com um mínimo de 1 ao máximo de 363 núcleos corados em 1000 células neoplásicas (Figura 11,12,13). Ao aplicar o score de graduação de expressão de SOX2, 10 pacientes apresentaram SOX2 negativo e 8 SOX2 positivo. A prevalência de amostras tumorais com SOX2 negativo e positivo foi similar nesse estudo ($p=0,222$), com um percentual de 44% de positividade para SOX2 (Figura14).

Figura 11 – Resultado de IHQ para SOX2 em amostra de carcinoma ductal invasor de mama. Marcação citoplasmática intensa e na ampliação a presença de células com imunomarcação nuclear positiva nas células tumorais.

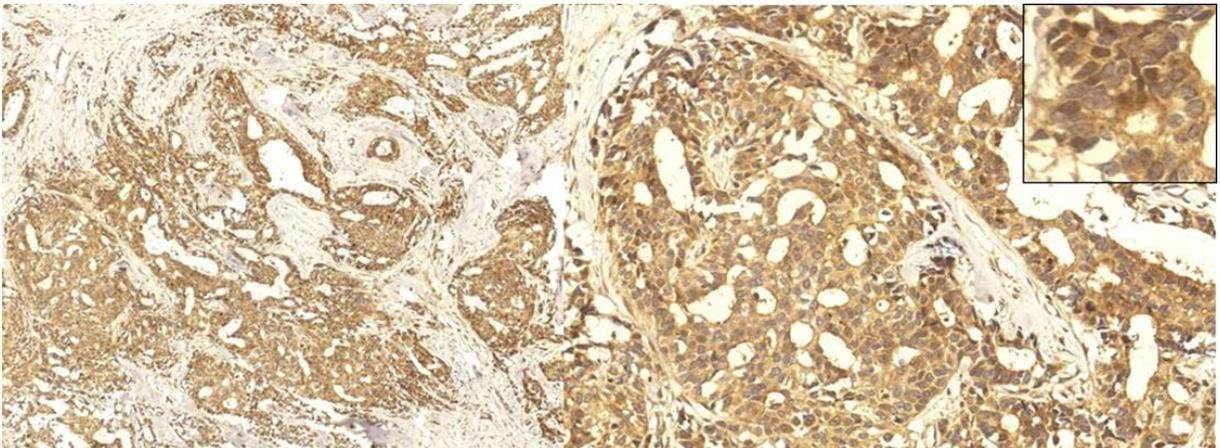


Figura 12 – Resultado de IHQ para SOX2 em amostra de carcinoma ductal invasor de mama. Ausência de imunomarcção nuclear nas células tumorais (ampliação)

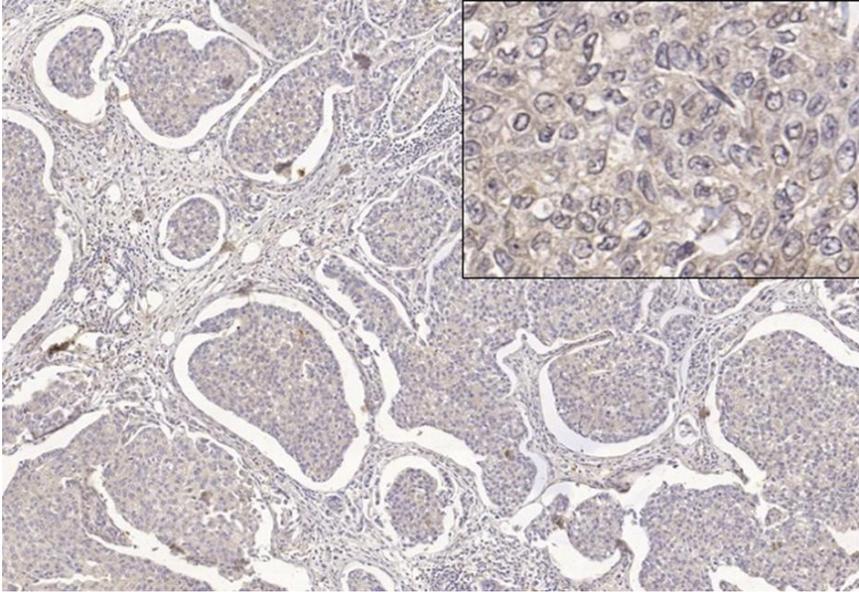


Figura 13 – Resultado de IHQ para SOX2 em amostra de carcinoma ductal invasor de mama. As setas vermelhas indicam imunomarcção positiva nos núcleos.

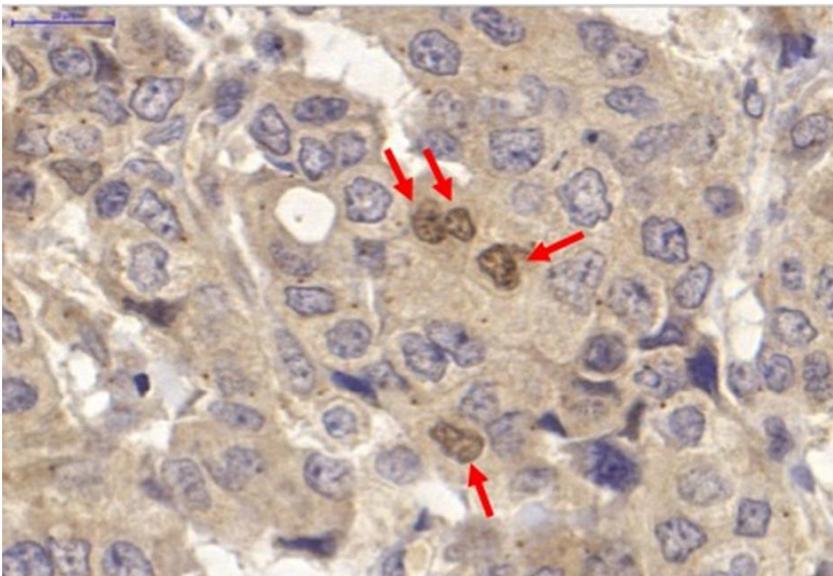
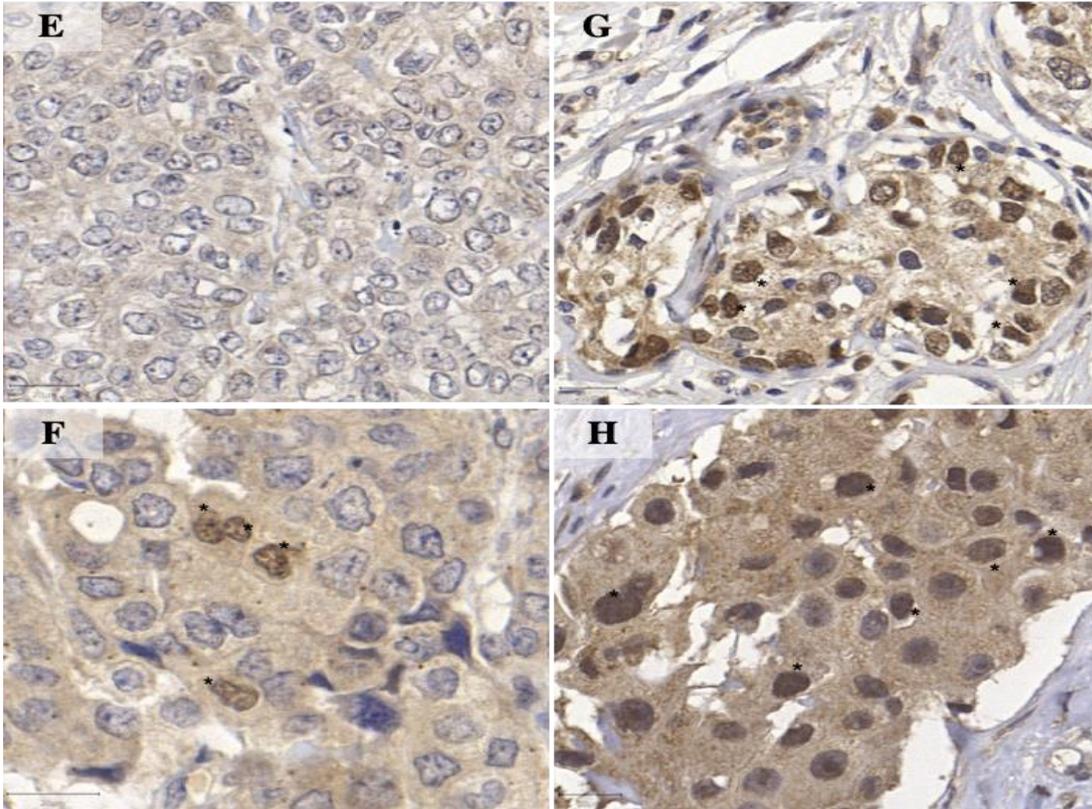
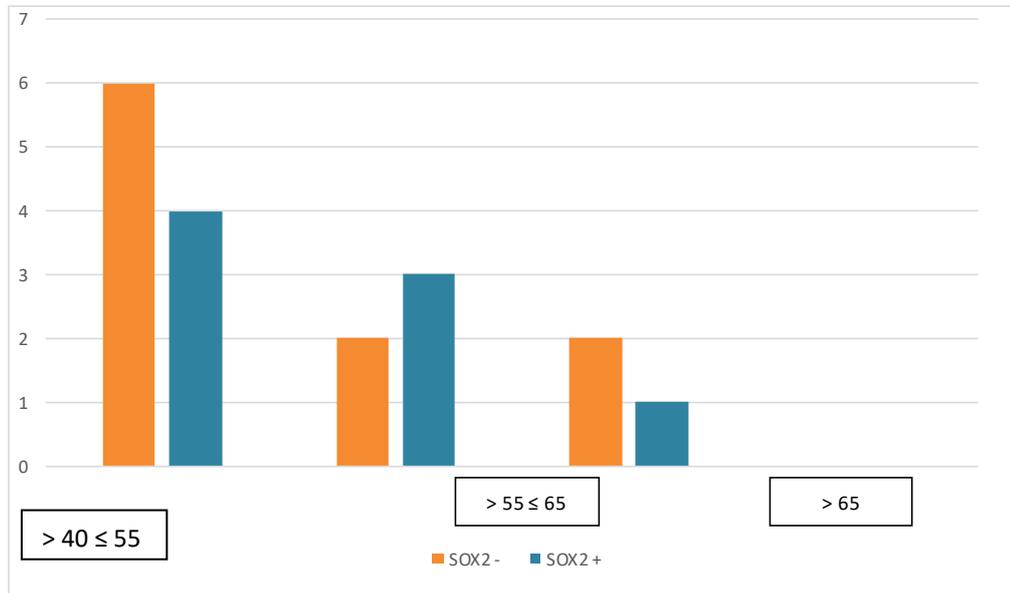


Figura 14 – Análise Imunohistoquímica da expressão de SOX2 em Carcinoma Ductal Invasor. Microfotografia representativa de coloração imuno-histoquímica. A coloração citoplasmática pode ser observada, bem como células tumorais exibindo imunocoloração nuclear positiva. Figura E e F - score 1: forte imunocoloração nuclear em menos de 10% das células cancerosas, considerada negativa para expressão de SOX2; Figura G e H - score 2: forte imunocoloração nuclear em mais de 10% das células cancerosas, considerada positiva para expressão de SOX2.



A idade média dos participantes foi de $56,6 \pm 10,3$ anos (amplitude de 40 a 77 anos). Com relação a positividade para SOX2 ele mostrou maior prevalência nas pacientes com idade entre 55 e 65 anos (Figura 15).

Figura 15 – Comparação entre idade das pacientes no momento do diagnóstico do câncer de mama e a expressão do fator de transcrição SOX2 nas amostras cancerígenas estudadas.



Oito pacientes tiveram tamanho tumoral menor que 2cm e 10 pacientes tiveram tamanho tumoral entre 2 e 5 cm. A proporção de pessoas com tamanho tumoral abaixo de 2cm e aqueles entre 2 e 5 cm foi estatisticamente semelhante ($p=0,637$).

A presença de infiltração perineural não teve relação com o tamanho do tumoral ($p=0,800$), mas mostrou relação significativa com a invasão vascular ($p=0,017$). Ou seja, 75% dos pacientes que apresentavam infiltração perineural tiveram invasão vascular e apenas 14,3% dos pacientes que não tiveram infiltração perineural apresentaram invasão vascular.

A presença de embolização linfática, contudo, mostrou relação com invasão vascular ($p=0,001$). Ou seja, 71,4% dos pacientes que apresentavam embolização linfática tiveram invasão vascular, ao passo que nenhum paciente dos que não apresentaram embolização linfática teve invasão vascular.

A presença de linfonodos metastáticos não teve relação com tamanho do tumoral ($p=0,788$) e com infiltração perineural ($p=0,130$). Diferentemente, a presença de linfonodos metastáticos mostrou relação com invasão vascular ($p=0,001$) e com embolização linfática ($p=0,004$). Ou seja, todas as pessoas com linfonodos metastáticos apresentavam invasão vascular e embolização linfática.

Analisando as pessoas com SOX2 positivo e negativo, os grupos não foram diferentes para tamanho tumoral ($p=0,138$) e infiltrado perineural ($p=0,163$).

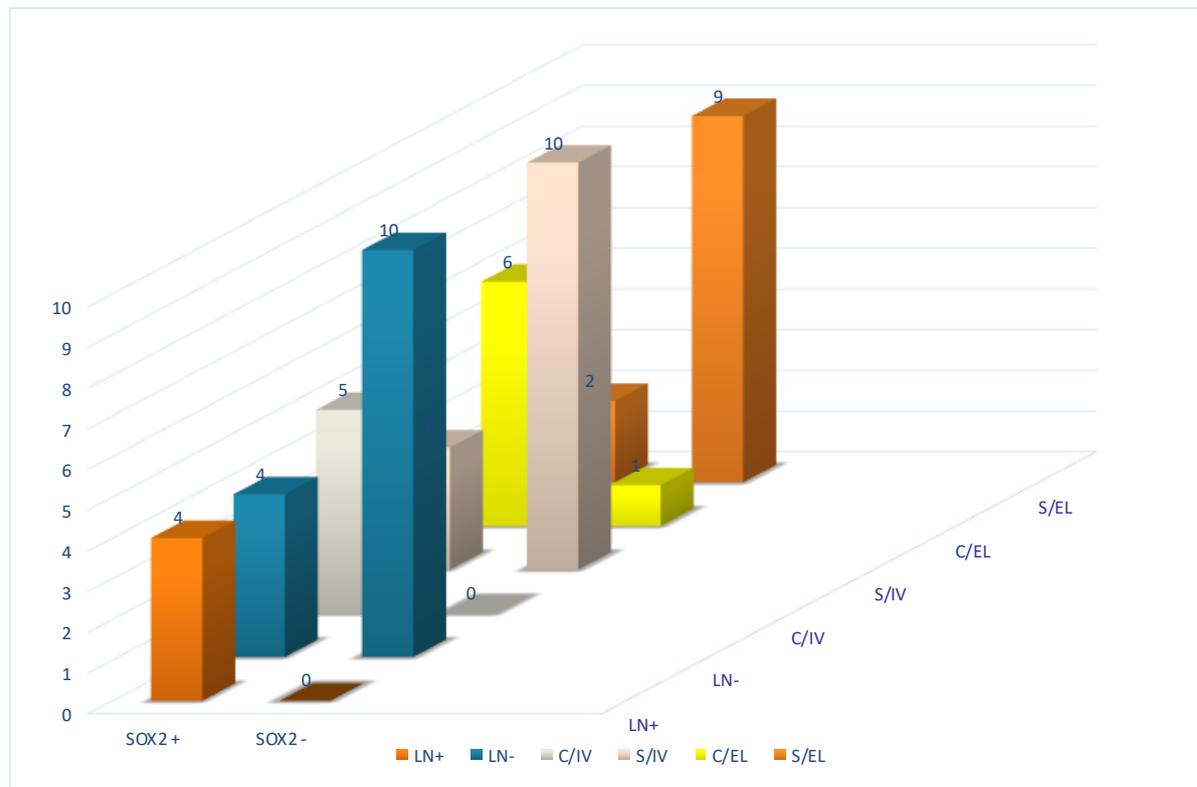
Os grupos, contudo, foram diferentes para invasão vascular ($p=0,003$), embolização linfática ($p=0,005$) e linfonodos metastáticos ($p=0,001$). Ou seja, pacientes com SOX2 positivo têm mais chance de apresentar invasão vascular, embolização linfática e linfonodos metastáticos que os pacientes com SOX2 negativo (Tabela 1), (Figura 16).

Tabela 1 – Correlação entre a expressão de SOX2 e as características clinicopatológicas no câncer de mama.

Clinicopathological Parameters	SOX2 high expression (%)	<i>p value</i>
Tumor size (cm)		
< 2	25	0.163
> 2	75	
Lymph node metastasis		
Yes	50	0.001
No	50	
Vascular invasion		
Yes	62.5	0.003
No	37.5	
Lymphatic embolization	75.5	0.005
Yes	25.5	
No		
ER* status		
Positive	62.5	0.410
Negative	37.5	
PR** status		
Positive	75	0.502
Negative	25	
HER2		
Positive	62,5	0,034
Negative	37,5	

*ER = Estrogen receptor / **PR = Progesterone receptor

Figura 16 – Comprometimento Linfonodal, Invasão Vascular e Embolização Linfática no Câncer de Mama Feminino e sua Correlação com Proteína SOX2.

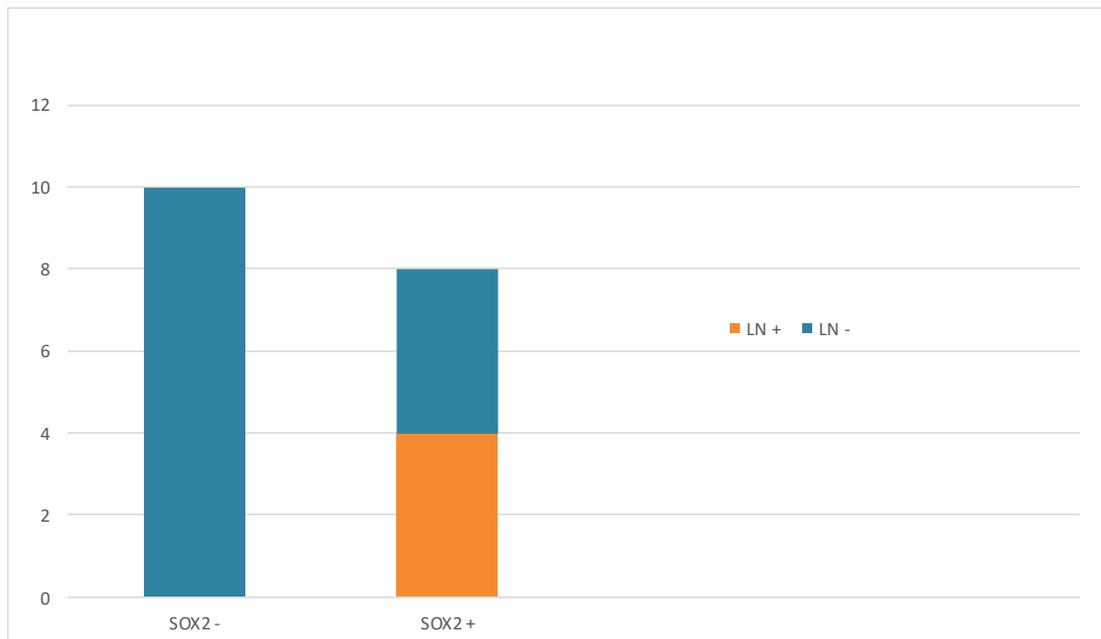


LN+: com comprometimento linfonodal; LN- sem comprometimento linfonodal; C/IV: com invasão vascular; S/IV: sem invasão vascular; C/EL: com embolização linfática; S/EL: sem embolização linfática

Sobre o estadiamento clínico TNM, sete pacientes foram classificadas no estadio 1, oito classificadas no estadio 3 e três pacientes classificadas no estadio 4. A prevalência se mostrou semelhante segundo a proporção em cada grupo ($p=0,3110$). Quando comparado a divisão de pessoas segundo o estadiamento clínico e o SOX2 conseguiu-se demonstrar diferença para esse ($p=0,040$). Ou seja, pessoas com estadiamento mais avançados apresentam mais chance de apresentar SOX2 positivo que pessoas com graus menos avançados de tumor.

Todos os casos que apresentaram metástase linfonodal, independentemente do número de linfonodos comprometidos, tiveram positividade para SOX2 (Figura 17).

Figura 17 – Correlação do Fator de Transcrição SOX2 e linfonodos axilares metastáticos em amostras de tecido cancerígeno mamário feminino.



Nesse estudo 13 pessoas apresentavam receptor de estrogênio positivo (72,2% da amostra) e 5 pessoas apresentavam receptor de estrogênio negativo (27,8% da amostra). Ainda que a proporção de pessoas com receptor de estrogênio positivo seja substancialmente maior, o teste qui-quadrado apontou semelhança significativa nesse item ($p=0,059$) – ainda que o valor de p esteja próximo do limite de 5% estipulado nessa pesquisa.

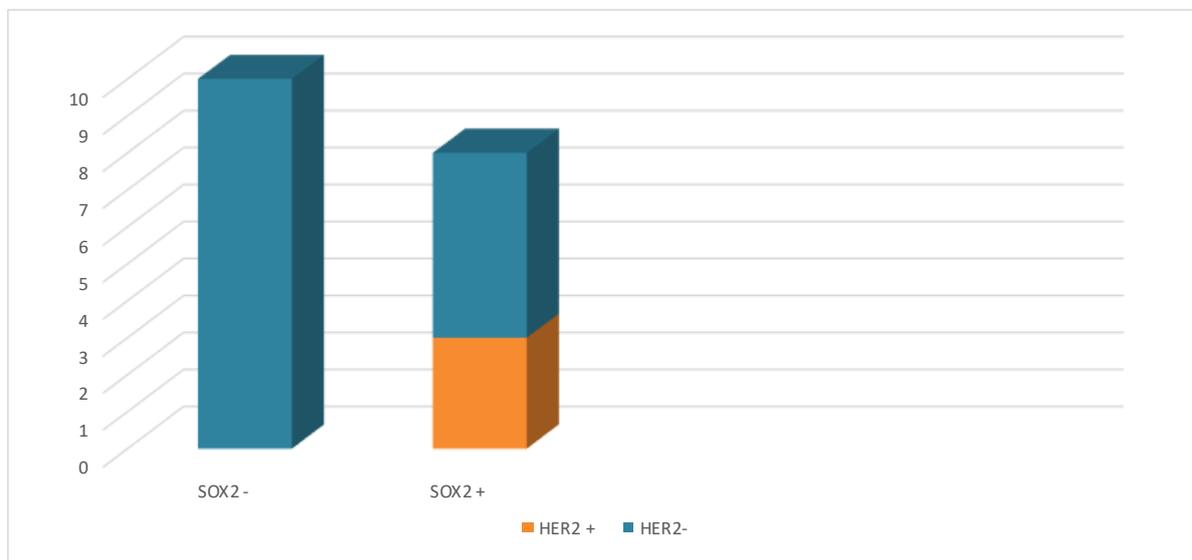
Pessoas com receptores progesterona positivo têm mais chances de apresentar receptores de estrogênio positivo do que de não apresentar receptores de estrogênio ($p=0,009$). Ou seja, 91,7% das pessoas com receptores de progesterona apresentam receptores de estrogênio, apenas 1 pessoa (8,3%) com receptores de progesterona não apresenta receptores de estrogênio ($p=0,009$).

15 pacientes apresentavam valor negativo para HER2 e 3 pessoas apresentavam valores positivos. Essa diferença mostrou-se significativa ($p=0,005$). Analisando pessoas com HER2 positivo e negativo, os grupos foram semelhantes para tamanho tumoral ($p=0,671$), invasão vascular ($p=0,099$) e linfonodos metastáticos ($p=0,612$). Contudo, os grupos de pessoas com HER2 positivo e negativo apresentaram diferença para infiltração perineural ($p=0,043$) e embolização linfática ($p=0,017$). Ou seja, as pessoas com HER 2 positivo

apresentam mais chance de apresentar infiltração perineural e embolização linfática que as pessoas com HER 2 negativo.

Pessoas com SOX2 positivo e negativo não apresentaram diferença quanto a presença de receptores de estrogênio ($p=0,410$), receptores de progesterona ($p=0,502$), marcador Ki67% ($p=0,138$). Os grupos, contudo, foram diferentes para HER2 ($p=0,034$). Ou seja, pessoas com SOX2 positivo têm mais chance de ter HER2 positivo, que pessoas com SOX2 negativo (Figura 18).

Figura 18 – Correlação entre o Fator de Crescimento Epidermal Humano (HER2) e o Fator de transcrição SOX2, em amostras de carcinoma ductal invasor feminino.



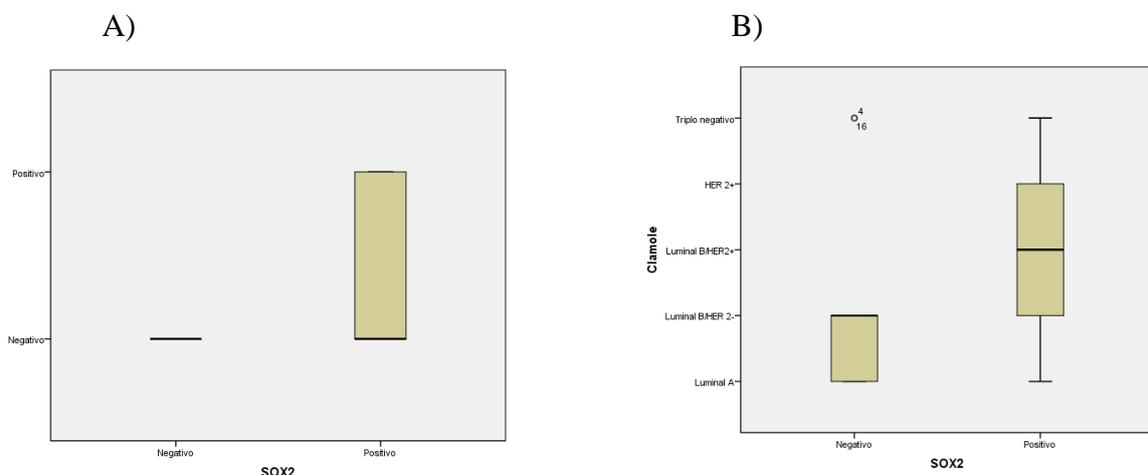
A Tabela 2 abaixo demonstra a relação dos pacientes no teste de classificação molecular. A prevalência de cada tipo tumor foi semelhante do ponto de vista estatístico ($p=0,168$).

Tabela 2 – Classificação Molecular para câncer de mama, na população estudada, Campo Grande – MS.

Classificação molecular	Tamanho amostral	Porcentagem
Luminal A	7	38,9
Luminal B/HER 2-	5	27,8
Luminal B/HER 2+	2	11,1
HER2+	1	5,6
Triplo -	3	16,7
Total	18	100

Pessoas divididas segundo a classificação molecular de tumores apresentaram diferença para SOX2 positivo ($p=0,001$). Ou seja, Luminal A e Luminal B HER 2- têm mais chance de apresentar valores negativos SOX2 que os demais tipos tumorais, que têm mais chance de apresentar valores positivos de SOX2 (Figura 20).

Figura 19 - Correlação entre expressão de SOX2 e HER2. Teste de normalidade de Shapiro-Wilk's demonstrando a correlação da Proteína SOX2 em pacientes com câncer de mama com a expressão de HER2 (A) e superexpressão de SOX2 em tumores subtipos Luminal B com HER2 positivo e nos canceres HER2 positivo (B).



6 DISCUSSÃO

O câncer de mama representa umas das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam o aumento da frequência desta neoplasia, tanto nos países desenvolvidos, quanto nos países em desenvolvimento. De acordo com dados da literatura, a probabilidade de se desenvolver câncer de mama aumenta com a idade, e embora apresente maior prevalência na pós-menopausa, a doença ocorre em praticamente todas as faixas etárias a partir da idade reprodutiva (REGINELLI et al., 2014). Em nosso estudo a média de idade de diagnóstico do câncer de mama e de positividade para SOX2 mostrou-se em concordância com a literatura mundial.

A história natural do câncer de mama ainda não é bem compreendida, já que seu comportamento evolutivo não se reproduz de maneira uniforme em todas as mulheres. Busca-se explicar a divergência comportamental de alguns tumores que possuem as mesmas características clínicas, com os conhecimentos adquiridos através dos fatores prognósticos que envolvem o contexto geral do câncer de mama (ELOMRANI et al., 2015).

Um crescente corpo de evidências está acumulando apoio a hipótese de que células-tronco cancerígenas, ou células iniciadoras de tumor dirigem e mantem muitos tipos de malignidades humanas (DIEHN et al., 2009). Células-tronco normais e cancerígenas compartilham fenótipos que podem refletir a atividade de vias de sinalização comuns, com alta expressão de SOX2 entre outros (SIMOES et al., 2011). O papel de SOX2 na organogênese ou função da mama ainda não é ainda bem entendido, no entanto em um tecido mamário saudável não há expressão significativa de SOX2. Já em células cancerígenas mamárias esteve está superexpresso tanto em análise quantitativa de mRNAs em RT-PCR quanto por Western blotting (CHEN et al., 2014). Em concordância a esses achados em nosso estudo a totalidade das amostras de carcinoma ductal invasor apresentaram forte marcação nuclear para SOX2 por análise imuno-histoquímica, mostrando-se superexpresso em quase metade das amostras.

Um papel ativo para SOX2 durante a tumorigênese mamária é ainda suportado por dados coletados em linhas celulares de câncer de mama, onde SOX2 promove a proliferação celular e a tumorigênese in vivo, facilitando parcialmente a transição G1/S e regulando, em conjunto com a β -catenina, a expressão de genes efetores, como CCND1 (CHEN et al., 2008).

Altos níveis de SOX2 parecem estar estreitamente correlacionados com vários processos durante o desenvolvimento tumoral, incluindo iniciação, manutenção, invasão e metástase. Portanto, o SOX2 parece desempenhar um papel na invasão tumoral e metástase, visto que a expressão do fator de transcrição SOX2 está intimamente relacionado ao aumento do tamanho e grau tumoral, metástase linfonodal e alta invasividade das células neoplásicas (FENG; LU, 2017).

Consistentemente demonstramos aqui íntima relação entre invasão vascular, embolização linfática e metástase linfonodal e mais importante conseguimos identificar a relação de positividade do SOX2 com esses marcadores de pior prognóstico e em pacientes com pior estadiamento TNM no diagnóstico inicial da doença. Isto se deve principalmente ao comprometimento linfonodal, visto que nesse estudo o fator de transcrição SOX2 encontra-se superexpresso nas pacientes com metástase linfonodal.

Aproximadamente 70-75% dos casos de câncer de mama expressam o receptor alfa de estrogênio (REa), e estão relacionadas a um melhor prognóstico, no entanto, foi relatado que as células-tronco da mama não possuem RE ou a expressam em níveis muito baixos (CLAYTON et al., 2004). Em estudo anterior foi mostrado que as células-tronco cancerígenas, que expressam altos níveis de SOX2, carecem ou expressam níveis muito baixos de RE e portanto, serão mais resistentes ao tamoxifeno, conferindo um fenótipo menos diferenciado da doença cancerígena (PIVA et al, 2014). Em nosso estudo não conseguimos demonstrar diferença significativa entre expressão dos receptores hormonais e a expressão de SOX2.

Em conta partida os resultados foram animadores ao que se refere ao oncogêne HER2, visto que consistentemente identificamos a superexpressão de SOX2 em tumores HER2 positivo.

Já é de conhecimento que de 15 a 20% dos cânceres de mama expressam HER2 e este oncogene está diretamente ligado ao prognóstico e a resposta terapêutica tendo papel substancial na sobrevida global e livre de doença. Com anteriormente exposto, em nosso estudo a presença do HER2 nas amostras cancerígenas foi acompanhado da positividade do fator de transcrição SOX2. Diferindo em parte de outro estudo que demonstrou uma expressão significativamente maior de SOX2 em tumores do tipo basal ou triplo negativo (RODRIGUES-PILLA et al., 2007). Acreditamos que essa discrepância possa estar relacionada a amostra usada pelo autor que envolveu maior número de pacientes na pré-menopausa e portadoras de alteração genética tipo BRCA1.

O câncer de mama é classificado em três subtipos principais com base na presença ou ausência de marcadores moleculares para receptores de estrogênio ou progesterona e fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2).

O câncer de mama triplo negativo apresenta maiores índices de recorrência do que os outros dois subtipos, com 85% de sobrevida em 5 anos para estadio I contra 94% a 99% para receptores hormonais positivos e HER2 positivos, já a sobrevida global média do câncer de mama metastático tri-negativo é de aproximadamente 1 ano versus aproximadamente 5 anos para os outros 2 subtipos.

Aqui identificamos SOX2 superexpresso no subtipo molecular HER2 e negativos nos subtipos onde receptores hormonais estão presentes, colaborando com achados anteriores que arrolam SOX2 a tumores com pior resposta terapêutica, indicando que os níveis de SOX2 são maiores em pacientes após falência terapêutica endócrina e também nos tumores primários desses pacientes, em comparação com os dos respondentes (WUEBBEN; RIZZINO, 2017).

Finalmente o que podemos observar que o fator de transcrição SOX2 tem sido visto como um potencial marcador de prognóstico e sobrevida, devendo no futuro ser incluído no rol de biomarcadores tumorais emergentes para o câncer de mama, logo mais estudos como o nosso envolvendo a proteína SOX2 e o câncer de mama podem fornecer pistas importantes para o diagnóstico e tratamento da doença.

7 CONCLUSÃO

A heterogeneidade tumoral é uma das características da malignidade resultando em tumorigenicidade, resistência ao tratamento e potencial metastático. No câncer de mama, essa heterogeneidade é reconhecida desde século XIX, mas sua relevância clínica só foi estabelecida a pouco mais de meio século com o reconhecimento do envolvimento dos receptores hormonais no prognóstico da doença. A partir de então novos marcadores tumorais foram sendo reconhecidos e se tornaram extremamente relevantes não só no que se refere aos fatores de prognóstico, mas também de resposta ao tratamento, modificando de sobremaneira o desfecho clínico de milhares de mulheres no mundo todo.

O principal objetivo do estudo foi avaliar o fator de transcrição SOX2 no carcinoma ductal invasor mamário e nosso êxito foi demonstrar a presença dessa proteína na totalidade das amostras estudadas, apresentando um score positivo em boa parte delas.

Demostramos por imunohistoquímica a expressão e marcação nuclear do fator de transcrição SOX2 nas células cancerígenas mamárias.

Demonstramos a associação do fator de transcrição SOX2 e comprometimento linfonodal, caracterizando uma superexpressão desse em tumores de pior estadiamento clínico.

Demostramos superexpressão do fator de transcrição SOX2 em tumores onde o oncogene HER2 estava presente, conferindo um fenótipo menos diferenciado ao tumor. E em contrapartida o fator de transcrição teve sua expressão reduzida ou ausente em pacientes que expressam receptores hormonais.

Assim, esse estudo expande os horizontes de pesquisa sobre o câncer de mama e o fator de transcrição SOX2, evidenciando que a continuidade das pesquisas nessa área poderá contribuir com os avanços de diagnóstico e tratamento do câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAIN K.S.; ALLRED D.C.; CLARK G.M. Breast cancer outcome and predictors of outcome: Are there age differentials? **Journal of the National Cancer Institute. Monographs**, v.16, p.35-42. 1994.

ALI H. R.; PROVENZANO E.; DAWSON S.-J; BLOWS F. M.; LIU B.; SHAH M. Association between CD8+ T-cell infiltration and breast cancer survival in 12 439 patients. **Annals of Oncology**, v. 25, p.1536–1543. 2014.

AMERICAN CANCER SOCIETY. Global cancer statistics, 2012. Disponível em: <http://www.cancer.org>, (Accessed February, 2015).

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. AJCC 7th Ed Cancer Staging Manual, 2010. Disponível em: <https://www.cancerstaging.org>

APURI S. Neoadjuvant and adjuvant therapies for breast cancer. **Southern Medical Journal.**, v.110, n. 10, p. 638-642. 2017.

ARAGÓN F.; PERDIGÓN G.; DE MORENO DE BLANC A. Modification in the diet can induce beneficial effects against breast cancer. **World Journal Clinic Oncology**, v. 5, n. 3, p. 455-464. 2014.

ASSI H.A.; KHOURY; K.E.; DBOUK, H.; KHALIL L.E.; MOUHIEDDINE T.H.; EL SAGHIR N.S. Epidemiology and prognosis of breast cancer in young women. **Journal of thoracic disease**, v.5 Suppl 1, p. S2–8. 2013.

BARROS A.C.S.D.; LEITE K.R. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea/Molecular. **Revista Brasileira de Mastologia**, v 25, n 4, p. 146-155. 2015.

BRAY F.; FERLAY J.; SOERJOMATARAM I. et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **Cancer Journal Clinical**, v. 68, p.394- 424. 2018

BRUFISKY A.M.; BHARGAVA R.; DAVIDSON N.E. Prognostic/Predictive Immunohistochemistry Assays for Estrogen Receptor. **Positive Breast Cancer: Back to the Future**, v. 30, n. 36, p. 4451–4453. 2014.

BUITRAGO F.; UEMURA G.; SENA M.C.F. Fatores prognósticos em câncer de mama. **Comunidade Ciências Saúde**, v. 22, Sup 1, p. S69-S82. 2011.

BURSTEIN H.J. Bevacizumab for advanced breast cancer: all tied up with a RIBBON? **Journal Clinical of Oncology**, v. 29, p.1232–1235. 2011

CANCELLO G.; MAISONNEUVE P.; ROTMENSZ N. et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. **Annals Oncology**, n.21, p. 1974–81. 2010.

CAPLAN L. Delay in breast cancer: implications for stage at diagnosis and survival. **Frontier in Public Health**, v. 29, n. 87, p. 1-5. 2014.

CASTILLO S.D.; SANCHEZ-CESPEDES M. The SOX family of genes in cancer development: biological relevance and opportunities for therapy. **Expert Opinion Ther Targets**; n. 16, p. 903- 919. 2012.

CHEN Y, SHI L, ZHANG L, LI R, LIANG J, YU W, SUN L, YANG X, WANG Y, ZHANG Y, SHANG Y. The molecular mechanism governing the oncogenic potential of SOX2 in breast cancer. **Journal Biology of Chemistry**, v.283, p.17969–78, 2008.

CHEN C.; YUAN J.P.; WEI W.; TU Y.; YAO F.; YANG X-Q. et al. Subtype classification for prediction of prognosis of breast cancer from a biomarker panel: Correlations and indications. **International Journal of Nanomedicine**, v. 9, n 1, p. 1039–1048. 2014.

CHENG Y.S.; KUO S.J.; CHEN D.R. Sparing sentinel node biopsy through axillary lymph node fine needle aspiration in primary breast cancers. **World Journal of Surgical Oncology**, v. 9, p. 1039-1048, 2013.

CHOU Y.T.; LEE C.C.; HSIAO S.H.; LIN S.E.; LIN S.C.; CHUNG C.H. et al. The emerging role of SOX2 in cell proliferation and survival and its crosstalk with oncogenic signaling in lung cancer. **Stem Cells**, v.31, p. 2607–2619. 2013.

CLAYTON H, TITLEY I, VIVANCO M. Growth and differentiation of progenitor/stem cells derived from the human mammary gland. **Experimental Cell Research**, v.297, p.444 – 460, 2004.

COLLEONI M. Adjuvant therapies for special types of breast cancer. **Breast**; v. 20 (Suppl 1), p.15-40. 2011.

CORTAZAR, P. et al. Pathological complete response and long-term clinical benefit in breast cancer: the CTNeoBC pooled analysis. **Lancet**, v. 384, p.164–172. 2014.

DIEHN M, CHO RW, CLARKE MF. Therapeutic implications of the cancer stem cell hypothesis. **Seminars in Radiation Oncology**, v.19, p.78 – 86, 2009.

DONG C.; WILHELM D.; KOOPMAN P. Sox genes and cancer. **Cytogenetic Genome Research**, v.105, p. 442–447. 2004.

EARLY BREAST CANCER TRIALISTS’ COLLABORATIVE GROUP (EBCTCG); DAVIES C.; GODWIN J. et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient level meta-analysis of randomised trials. **Lancet**, v.378, p.771-784. 2011.

ELOMRANI F, ZINE M, AFIF M, L'ANNAZ S, OUZIANE I, MRABTI H, ERRIHANI H. Management of early breast cancer in older women: from screening to treatment. **Breast Cancer (Dove Med Press)** v.7, p.165-71, 2015.

ELSTON C.W.; ELLIS I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long term follow-up. **Histopathology**, v.19, p. 403–10. 1991.

ENGSTROM M.J.; OPDAHL S.; HAGEN A.I. et al: Molecular subtypes, histopathological grade and survival in a historic cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Research Treatment**, n. 140, p.463-473. 2013.

FASCHING P.A.; HEUSINGER K.; HAEBERLE L.; NIKLOS M.; HEIN A.; BAYER C.M.; RAUH C.; SCHULZWENDTLAND R. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. **BMC Cancer**, v.11, p. 486. 2011.

FENG X, LU M. Expression of sex-determining region Y-box protein 2 in breast cancer and its clinical significance. **Saudi Medical Journal**. v38, P. 685–90, 2017.

FREITAS-JUNIOR R.; GONZAGA C.M.R.; FREITAS N.M.A. et al. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. **Clinics**, v. 67, p.731-7. 2012.

GOBBI H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **Jornal Brasileiro Patologia Médica Laboratorial**, v. 48, n. 6, p.463-474. 2012.

GOLDHIRSCH A.; WOOD W.C.; COATES A.S.; GELBER R.D.; THÜRLIMANN B.; SENN H.J. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, v. 22, p. 1736-47. 2011.

GRALOW J.; OZOLS R.F.; BAJORIN D.F.; CHESON B.D.; SANDLER H.M.; WINER E.P.; et al. Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening. A report from The American Society of Clinical Oncology. **Journal Clinical of Oncology**, v 26, n. 2, p.313-25, 2008.

GUBBAY J.; COLLIGNON J.; KOOPMAN P.; CAPEL B.; ECONOMOU A.; MUNSTERBERG A. et al. A gene mapping to the sex-determining region of the mouse Y chromosome is a member of a new family of embryonically expressed genes. **Nature**, v. 346, p. 245–50. 1990.

GUTH S.I.; WEGNER M. Having it both ways: Sox protein function between conservation and innovation. **Cellular Molecular Life Sciences**, v. 65, p. 3000–18. 2008.

KAMACHI Y.; UCHIKAWA M.; KONDOH H. Pairing SOX off. **Trends in Genetics**, v. 16, p.182–187. 2000.

- KAKARALA M.; WICHA M.S. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. **Journal Clinical of Oncology**, v.26, p.2813-2820. 2008.
- KASS L.; ERLER J.T.; DEMBO M.; WEAVER V.M. Mammary epithelial cell: Influence of extracellular matrix composition and organization during development and tumorigenesis. **International Journal Biochemistry Cell Biology**, v.39, n.11, p.1987- 1994. 2007.
- KELBERMAN D, RIZZOTI K, AVILION A, BITNER-GLINDZICZ M, CIANFARANI S, COLLINS J, et al. Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. **Journal Clinical Investigate**, v.116, p. 2442-2455. 2006
- HANAHAN D.; WEINBERG R.A. Hallmarks of Cancer: the next generation, **Cell** **144**, v.5, p. 646–674. 2011.
- HARRIS, A L. Breast screening remains a controversial issue. **Breast Journal Cancer**, v.108, p.2197. 2013.
- HORTOBAGYI G.N.; D'ORSI C.J.; EDGE S.B.; MITTENDORF E.A.; RUGO H.S.; SOLIN L.J. et al. AJCC Cancer Staging Manual. **Breast**. 8th. 2017.
- HUANG YH, LUO MH, NI YB, TSANG JY, CHAN SK, LUI PC, YU AM, TAN PH, TSE GM. Increased SOX2 expression in less differentiated breast carcinomas and their lymph node metastases. **Histopathology**, v. 64, p. 494–503, 2014.
- IARC - **INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER**. 2015. Disponível em: <http://www.iarc.fr/> [Accessed October 14, 2019].
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2019: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. **INCA**, p.123, 2018.
- LAKHANI S.R.; ELLIS. I.O.; SCHNITT S.J.; TAN P.H.; VAN DE VIJVER M.J. World Health Organization classification of tumor of the breast: **IARC**; 2012.
- LEFEBVRE V.; DUMITRIU B.; PENZO-MÉNDEZ A.; HAN Y.; PALLAVI B.; Control of cell fate and differentiation by Sry-related high-mobility-group box (Sox) transcription factors. **International Journal Biochemical Cellular Biology**, v. 39, p. 2195–214. 2007.
- LENGERKE C.; FEHM T.; KURTH R. et al. Expression of the embryonic stem cell marker SOX2 in early-stage breast carcinoma. **BMC Cancer**. v.11 p.42. 2011.
- LOVELL-BADGE R. The early history of the Sox genes. **International Journal Biochemical Cellular Biologic**, v42 p. 378–380. 2010
- NATRAJAN R.; LAMBROS M.; RODRÍGUEZ-PINILLA S.; MORENO-BUENO G.; TAN D.; MARCHIÓ C. et al. Tiling Path Genomic Profiling of Grade 3 Invasive Ductal Breast Cancers. **Clinical Cancer Research**, v. 15, p. 2711-, 2722. 2009.

NOVAK D., et al. SOX2 in development and cancer biology **Seminars in Cancer Biology**, <https://doi.org/10.1016/j.semcancer.2019.08.007>.

O-CHAROENRAT P.P. Triple Negative Breast Cancer. **Breast Cancer: Targets and Therapy**, p.239–243. 2015.

PEPPERCORN J.; PEROU C.M.; CAREY L.A. Molecular subtypes in breast cancer evaluation and management: divide and conquer. **Cancer Investigat**, v.26, p.1-10. 2008

PEROU C.M.; SORLIE T.; EISEN M.B.; VAN DE RIJN M.; JEFFREY S.S.; REES C.A. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 17, p.747-52. 2000.

PIVA M.; DOMENICI G.; IRIONDO O.; RÁBANO M.; SIMÕES B.M.; COMAILLS V.; BARREDO I.; LÓPEZ-RUIZ J.A.; ZABALZA I.; KYPTA R.; VIVANCO M.M. Sox2 promotes tamoxifen resistance in breast cancer cells. **Molecular Medicine**, v. 6, n. 1, p. 66–79. 2014.

PRAT A.; PEROU C.M. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Molecular Oncology**, v. 5, n. 1, p. 5-23. 2011

PRIOR H.M.; WALTER M.A. Sox genes: architects of development. **Molecular Medicine**, v.2, n. 4, p. 405-412. 1996.

REGINELLI A., CALVANESE M., RAVO V., DI FRANCO R., SILVESTRO G., GATTA G., SQUILLACI E., GRASSI R., CAPPABIANCA S. Management of breast cancer in elderly patients. **International. Journal. Surgery.**, v.12 (Suppl 2), p. S187-S192, 2014.

RODRIGUEZ-PINILLA S.M.; SARRIO D.; MORENO-BUENO G.; RODRIGUEZ-GIL Y.; MARTINEZ M.A.; HERNANDEZ L.; ET AL., Sox2: a possible driver of the basal-like phenotype in sporadic breast cancer. **Modern Pathology**, v. 20, p.474–481. 2007.

SG-BCC 2013 — 13th St.Gallen Breast Cancer Conference

SATO K.; MIYASHITA M.; ISHIDA T.; SUZUKI A.; TADA H.; WATANABE G.; et al., Prognostic significance of the progesterone receptor status in Ki67-high and -low Luminal Blike HER2-negative breast cancers. **Breast Cancer**, v. 23, n. 2, p. 310-317. 2016.

SEONG M.K.; LEE J.Y.; BYEON J.; SOHN Y.J.; SEOL H.; LEE J.K.; et al. Bcl-2 is a highly significant prognostic marker of hormone-receptor-positive, human epidermal growth factor receptor-2-negative breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 150, n.1, p.141–148. 2015.

SIMOES BM, PIVA M, IRIONDO O, COMAILLS V, LOPEZ-RUIZ JA, ZABALZA I, MIEZA JA, ACINAS O, VIVANCO D. Effects of estrogen on the proportion of stemcells in the breast. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.129, p.23 – 35, 2011.

SOERJOMATARAM I.; LOUWMAN M.W.; RIBOT J.G.; ROUKEMA J.A.; COEBERGH J.W. An overview of prognostic factors of long-term survivors of breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v.107, p.309-330. 2008.

SONG L.; LIU D.; HE J.; WANG X.; DAI Z.; ZHAO Y.; KANG H.; WANG B., SOX1 inhibits breast cancer cell growth and invasion through suppressing the Wnt/beta catenin signaling pathway, **Journal of Pathology, Microbiology and Immunology**, v.124, n. 7. 2016.

SORLIE, T. PEROU C.M., TIBSHIRANIE R., AASF T., GEISLERG S., JOHNSEN H., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of the United States of America**, v. 98, p. 10869–10874, 2001.

SOTIRIOU C. Molecular mechanisms which predict response to chemotherapy. **Breast**; v. 20 (Suppl 1): S3 (Abstr S05), 2011.

TAO Z.; SHI A.; LU C.; SONG T.; ZHANG Z.; ZHAO J., Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. **Cellular Biochemistry and Biophysics**, v. 72, n. 2, p.333–338. 2015.

THU K.L.; BECKER-SANTOS D.D.; RADULOVICH N.; PIKOR L.A.; LAM W.L.; TSAO M.S., SOX15 and other SOX family members are important mediators of tumorigenesis in multiple cancer types. **Oncoscience**, v. 1, p. 326–35. 2014.

UNTCH M, GERBER B, HARBECK N, JACKISCH C, MARSCHNER N, MÖBUS V, VON MINCKWITZ G, LOIBL S. 13th St. Gallen International Breast Cancer Conference 2013: Primary Therapy of Early Breast Cancer Evidence, Controversies, Consensus. **SG-BCC 2013 Breast Care 03/2013**: in press.

VAN SCHOONEVELD E.; WILDIERS H.; VERGOTE I.; VERMEULEN P.B.; DIRIX L.Y.; VAN LAERE S.J. Dysregulation of microRNAs in breast cancer and their potential role as prognostic and predictive biomarkers in patient management. **Breast Cancer Research**, n. 17, p. 21, 2015.

VAN'T VEER L.J.; DAI H.; VAN DE VIJVER M.J.; HE Y.D.; MAO M. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, p. 530-6, 2002.

VIALE G. The current state of breast cancer classification. **Annals of Oncology**, v. 23, p. 207-210. 2012.

VOGUEL V.G. Epidemiology, genetics and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. **Menopause: The Journal of The North American Menopause Society**, v.15, n. 4, p. 782-9. 2008.

WEIGELT.B.; GEYER F.C.; REIS-FILHO J.S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Molecular Oncology**, v.4, p. 192–208. 2010.

WIRAPATI P. SOTIRIOU C.; KUNKEL S. et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. **Breast Cancer Research**, v. 10, R65. 2008.

WOLFF A. C., HAMMOND M.E., HICKS D.G., DOWSETT M., MCSHANE L.M., ALLISON K.H., et al. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **Journal Clinical of Oncology**, v. 31, p. 3997–4013. 2013.

WUEBBEN E. L., RIZZINO A. The dark side of SOX2: cancer - a comprehensive overview. **Oncotarget**, v. 8, (No. 27), p: 44917-44943. 2017

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Global status report on noncommunicable diseases. 2019.

YARDEN Y.; SLIWKOWSKI M. X. Untangling the ErbB signalling network. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 2, p.127–137. 2001.

ZHANG J.; LIANG Q.; LEI Y.; YAO M.; LI L.; GAO X.; FENG J.; ZHANG Y.; GAO H.; LIU D.X. et al. SOX4 induces epithelial-mesenchymal transition and contributes to breast cancer progression. **Cancer Research**, v. 72, p. 4597–4608. 2012.

Você está sendo convidada a participar do projeto de pesquisa: **“Expressão proteica de SOX2 e SOX3 em neoplasias malignas da mama”**, de responsabilidade dos pesquisadores RAQUEL CRISTINA RODRIGUES com orientação de ALMIR DE SOUSA MARTINS. Você precisa decidir se quer participar ou não. Por favor, não se apresse em tomar a decisão. Leia cuidadosamente o que se segue e pergunte ao responsável pelo estudo qualquer dúvida que você tiver.

Apesar dos avanços nas pesquisas, o câncer de mama é ainda a neoplasia maligna que mais acomete as mulheres. O câncer de mama, se diagnosticado precocemente e tratado de forma adequada, possui bom prognóstico, com sobrevida média em cinco anos de 83% a 92%, podendo chegar a 98% nos casos de doença localizada.

O presente trabalho tem como objetivo investigar a expressão gênica da proteína SOX2 e SOX3 em tumores de mama, e correlacionar sua expressão com a supressão ou promoção tumoral e assim no futuro, beneficiar os pacientes com este tipo de câncer através da elaboração de estratégias terapêuticas inovadoras.

Não haverá custo algum para o paciente e sua família. Sua participação é voluntária e não tem fins lucrativos, ou seja, não haverá pagamento e nem ressarcimento de qualquer despesa. Você poderá deixar de participar do estudo no momento em que desejar.

Para realização do estudo serão usadas amostras teciduais armazenadas no setor de patologia do hospital universitário, do tumor que foi extirpado quando do momento da cirurgia. Queremos deixar claro que a Sra não será submetida a nem novo procedimento cirúrgico devido ao projeto e a nenhum tipo de questionário. Todas as informações necessárias à pesquisa serão obtidas de material armazenado e de informações já presentes em seu prontuário.

Podemos assegurar que o projeto será realizado sob a observância das normas preconizadas pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, obedecendo às normas de biossegurança e guardando sigilo ético. Mas como na maioria das pesquisas, a nossa também apresenta riscos. Entre eles destaca-se o extravio das amostras teciduais parafinadas e ou dos dados coletados. Tais riscos pretendem ser amenizados pela criação de uma base de dados única e protegida e do adequado manuseio e transporte das amostras. Contudo podemos assegurar que nenhum dano físico será instituído a sua pessoa. E seu acompanhamento ambulatorial será mantido conforme rotina protocolar, sem necessidades de retornos extra ou novos procedimentos invasivos.

Se você concordar em participar do estudo, seu nome e identidade serão mantidos em sigilo, somente a equipe de pesquisa terá acesso as informações pertinentes ao andamento do mesmo.

Você será informado periodicamente de qualquer nova informação que possa modificar a sua vontade em continuar participando do estudo. Deixamos claro que os dados obtidos serão utilizados exclusivamente para este estudo.

Se tiver dúvidas a respeito do estudo poderá ligar a qualquer momento para pesquisador responsável Raquel Cristina Rodrigues, no telefone (67) 981085829 ou e-mail: raquelcrodrigues2005@gmail.com.

Se houver dúvidas sobre seus direitos como participante deste estudo poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da UFMS, no telefone (67) 3345 7187.

Sua participação no estudo é voluntária. A Sra pode escolher não fazer parte do estudo, ou pode desistir a qualquer momento. Isso não acarretará a perda de qualquer benefício ao qual a Sra tenha direito. Independente de sua participação ou não no estudo você manterá seu acompanhamento conforme rotina instituída pelo seu médico assistente, sem nenhum prejuízo a você e a Sra não será proibida de participar de novos estudos.

Este documento foi realizado em duas vias de igual teor, sendo que uma via ficará com você e outra com o pesquisador.

Rúbrica Pesquisador: _____

Rúbrica Responsável: _____

Considerando, que fui informado(a) dos objetivos e da relevância do estudo proposto, de como se dará a minha participação, dos procedimentos a serem realizados e riscos decorrentes deste estudo, declaro o meu consentimento e concordo com a minha participação voluntária na pesquisa acima

descrita, como também concordo que os dados obtidos na investigação sejam utilizados para fins científicos (divulgação em eventos e publicações).

Campo Grande (MS), ____ de _____ de 20 ____.

Pesquisador Responsável

Convidado a Participar da Pesquisa
(Participante)

Idade no Diagnóstico da Doença: _____

Tamanho Tumor no USG: _____ x _____ x _____ cm

BIRADS USG: _____ BIRADS MMG: _____

Data Cirurgia: _____/_____/_____

Tipo de Cirurgia: () Mastectomia Simples +LS () MRM

() Ressecção Segmentar + LS () Ressecção Segmentar e Esvaziamento Axilar

Tamanho Tumor patologia : _____ Tipo histológico de Tumor: _____

Grau histológico: () I () II () III Invasão vascular: () Sim () Não

Infiltração perineural: () Sim () Não Embolização linfática: () Sim () Não

Linfonodos axilares: () Sim () Não Nº: _____ Comprometidos: () Sim () Não Nº _____

Metástase a Distância : () Sim () Não Qual sítio: () Fígado () Pulmão () Osso

Classificação TNM: _____

Imunohistoquímica: () Sim () Não

RE : () + RE : () - % : _____ RP : () + RP : () - % : _____

Ki - 67 % : _____ CERb- B2: () 0 () 1 () 2 () 3 Fish: _____

Classificação Molecular:

Luminal A () Luminal B () HER-2 () Triplo Negativo ()

QTX: () Sim () Não Nº de Sessões: _____ RTX: () Sim () Não Nº de Sessões: _____

Tamoxifeno: () Sim () Não Quanto Tempo: _____

Outro tipo de hormonioterapia: () Sim () Não Qual: _____

Herceptin: () Sim () Não