



CATÓLICA
UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO
↳ Instituto de Ciências da Saúde

A EXPRESSÃO DO PTEN COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO TRASTUZUMAB
EM CARCINOMAS DA MAMA COM SOBRE-EXPRESSÃO DO HER2

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública
- Especialidade de Hematologia e Imunohemoterapia -

Por
Dina Raquel Aguilera Leitão

Janeiro 2012



CATÓLICA

UNIVERSIDADE CATÓLICA PORTUGUESA | PORTO

↳ Instituto de Ciências da Saúde

A EXPRESSÃO DO PTEN COMO MECANISMO DE RESISTÊNCIA AO TRASTUZUMAB EM CARCINOMAS DA MAMA COM SOBRE-EXPRESSÃO DO HER2

Dissertação apresentada ao Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Católica Portuguesa
para obtenção do grau de mestre em Análises Clínicas e Saúde Pública
- Especialidade de Hematologia e Imunohemoterapia -

Por

Dina Raquel Aguilera Leitão

Sob orientação de

Fernando Carlos de Landér Schmitt

Joana Cancela de Amorim Falcão Paredes

Janeiro 2012

ÍNDICE

ÍNDICE	I
RESUMO	III
ABSTRACT	V
LISTA DE ABREVIATURAS	VII
LISTA DE TABELAS	VIII
LISTA DE FIGURAS	IX
INTRODUÇÃO	2
OBJETIVOS.....	19
MATERIAL E MÉTODOS.....	21
Série de amostras tumorais.....	21
Avaliação da expressão do PTEN por imuno-histoquímica.....	24
Avaliação da deleção do gene PTEN por FISH.....	26
Análise Estatística.....	27
RESULTADOS	29
Expressão imuno-histoquímica do PTEN numa série de carcinomas da mama.....	29
Associação entre expressão de PTEN, parâmetros clínico-patológicos, e resposta terapêutica ao Trastuzumab.....	31
Associação entre expressão de PTEN e a deleção do gene PTEN	33
DISCUSSÃO	36
CONCLUSÕES	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	43
ANEXOS	
Anexo 1.....	A2
Anexo 2.....	A4

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Schmitt, orientador desta tese, por todo o apoio que me deu na elaboração deste trabalho, e um dos maiores responsáveis pela concretização do meu percurso profissional durante estes últimos 22 anos.....TANTO ano professor! O meu muito obrigado por tudo.

À Doutora Joana Paredes, co-orientadora desta tese, pela sua completa e total disponibilidade, pela preciosa ajuda na orientação e elaboração deste trabalho. Por tudo o que me ensinou, e que foi muito... imenso.... e além de tudo grande amiga...BEM HAJA JOANINHA, estarás sempre no meu coração.

À Dra. Cristina Dávila e à Dra. Matilde, médicas do Serviço de Oncologia Médica do H.S.J., pela enorme simpatia e inteira disponibilidade que demonstraram na recolha de dados das doentes seleccionadas para este trabalho, e na colaboração no preenchimento da base de dados.

À Dra. Joana Vieira, Técnica Superior do Serviço de Genética do IPO do PORTO, que muito pacientemente me deu uma enorme ajuda na avaliação dos casos no microscópio de fluorescência.

Ao Doutor André Albergaria pela sua amável colaboração no tratamento estatístico dos dados.

À Dra. Lígia Almeida e à Dra. Bárbara Sousa (Babi) pela enorme ajuda, simpatia e disponibilidade nos arranjos finais do trabalho, para elas o meu muito obrigado, vocês são umas queridas.

À minha QUERIDA família, mãe, filhos e marido quero agradecer do fundo do coração, pela paciência e apoio incalculável que sempre me deram em tudo o que fiz ao longo de toda a minha carreira, sem o vosso apoio nada tinha sido possível realizar. Para vocês um agradecimento muito especial, vocês são a minha estabilidade emocional.

Ao meu querido pai dedico este trabalho, pois tenho a certeza que onde ele estiver, estará muito orgulhoso por eu ter conseguido realizar mais um dos meus sonhos. PAI muito obrigado por tudo o que me ensinaste, adoro-te do fundo do coração.

RESUMO

Os biomarcadores, de uma forma geral, são utilizados para prever a resposta a um determinado tratamento, permitindo assim determinar grupos bem definidos de doentes, que podem ou não beneficiar de uma terapia particular. O objectivo primário das novas drogas anti-neoplásicas é terem como alvo a inibição directa de marcadores moleculares específicos expressos em células tumorais, de forma a melhorar as taxas de cura do cancro e a reduzir a citotoxicidade nas células normais. Recentes avanços na área da biologia molecular facilitaram a identificação de marcadores tumorais, que não só predizem o prognóstico e a resposta terapêutica, como podem eles próprios funcionar também como alvos terapêuticos.

O Trastuzumab, por exemplo, é um anticorpo monoclonal desenhado para tratar um determinado tipo de cancro da mama, cujas células tumorais sobre-expressam o fator de crescimento epidérmico humano de tipo 2 (HER2). No entanto, apesar da sua eficácia inicial, a resistência adquirida ao Trastuzumab desenvolve-se na maioria das pacientes com cancro da mama metastático, e um grande número nem nunca respondem, demonstrando resistência primária. Recentemente foi sugerido que níveis baixos de expressão da fosfatase PTEN podem resultar numa fosforilação aumentada da PI3K/Akt e consequente sinalização, assim como num bloqueio do efeito anti-proliferativo mediado pelo Trastuzumab. Aliás, tem sido demonstrado que pacientes com tumores deficientes em PTEN e com sobre-expressão de HER2 respondem pior à terapia com Trastuzumab. Em termos clínicos, a descoberta de que a expressão ou não de PTEN pode determinar a resposta dos tumores aos inibidores tirosina cinase é de extrema importância, não só porque irá permitir uma melhor seleção das pacientes, como também terá um efeito direto nos serviços de saúde.

Neste trabalho, verificou-se uma associação estatisticamente significativa entre a expressão proteica do PTEN numa série de carcinomas invasivos de mama com HER2 positivo e as taxas de resposta das pacientes tratadas com Trastuzumab. Demonstrou-se que a expressão negativa ou reduzida do PTEN está significativamente associada à positividade dos gânglios linfáticos, assim como à progressão da doença após tratamento.

Curiosamente verificámos ainda que alguns casos apresentaram marcação nuclear intensa do PTEN, estando esta associada à expressão normal do PTEN no citoplasma, assim como a sua ausência estava associada à metastização ganglionar. Identificou-se ainda que a deleção do gene PTEN pode ser responsável pela perda de expressão do PTEN em alguns dos casos analisados.

Com base nestes resultados, podemos concluir que a expressão do PTEN pode seleccionar os doentes que irão responder ou não à terapia com Trastuzumab nos tumores de mama que sobre-expressam HER2.

ABSTRACT

Biomarkers are used to predict the treatment response, allowing the selection of well-defined groups of patients who can benefit or not from a particular therapy. The primary objective of the new anti-neoplastic drugs is to target and inhibit specific molecular markers in tumor cells, in order to improve cancer treatment and to reduce cytotoxicity in normal cells. Recent progress in the area of molecular biology turned easier the identification of tumor markers that not only predict the prognosis and the therapeutic response, but can also work themselves as therapeutic targets.

Trastuzumab, for example, is a monoclonal antibody designed to treat a specific type of breast cancer, which tumor cells over express the human epidermic growth factor receptor type 2 (HER2). However, despite initial efficacy, the acquired resistance to Trastuzumab develops in most of the patients with metastatic breast cancer, and some cases have primary resistance. Recently, it has been suggested that low levels of expression of the phosphatase PTEN can increase the phosphorylation of PI3K/Akt pathway and consequent signaling, as well as in a blockade of the anti-proliferative effect mediated by Trastuzumab. Indeed, it has been demonstrated that patients with PTEN defective tumors and with HER2 over expression respond worse to the therapy with Trastuzumab. In clinical terms, the discovery that PTEN expression will be able to determine tumor response to tyrosine kinase inhibitors is of extreme importance, not only because it will allow a better selection of patients, but also to an effect in the health services.

In the present work, we found a statistically significant association between PTEN expression in a series of invasive breast carcinomas with HER2 over expression and the rates of response of patients treated with Trastuzumab. We demonstrated that negative or reduced PTEN expression is associated with lymph node metastasis, as well as with disease progression after treatment. We still identified that PTEN gene deletion can be responsible for the loss of PTEN expression in some of the analyzed cases. Curiously, we also demonstrated that, in some cases, there was PTEN strong nuclear expression, which was associated to normal PTEN cytoplasmic expression, as well as with negative lymph node invasion.

Based on these results, we can conclude that PTEN expression can select the breast cancer patients that will benefit from Trastuzumab treatment in the HER2 over expressing tumors.

LISTA DE ABREVIATURAS

- **HER2** – Human Epidermal Growth Factor Receptor 2
- **PTEN** - Phosphatase and Tensin homologue deleted on chromosome Ten
- **Ck** - Citoqueratina (ou Cytokeratin)
- **C-Kit** - C-tyrosine kinase receptor -**kit**
- **EGFR** - Epidermal Growth Factor Receptor
- **GIST** – Gastrointestinal Stromal Tumor
- **HSP90** - Heat Shock Protein 90
- **IGF-IR** - Insulin-like Growth Factor 1(IGF-1) Receptor
- **MAPK** - Mitogen-Activated Protein Kinase
- **MUC4** - Mucin 4
- **p27** - Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor 1B (*CDKN1B*)
- **p95 HER2 NH(2)** - Terminally truncated form of HER2
- **P-Caderina** - Caderina Placentária Humana
- **PDGFR α** - Platelet-Derived Growth Factor Receptor- α
- **PI3K** - Phospho-Inositol 3 Kinase
- **RE** - Receptores de Estrogénio
- **RP** - Receptores de Progesterona
- **SSC** – Saline Sodium Citrate –buffer

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo da série de amostras tumorais.

Tabela 2. Resultados da avaliação da expressão proteica do PTEN por Imuno-histoquímica.

Tabela 3. Correlação entre a expressão de PTEN com os dados clinicopatológicos.

Tabela 4. Correlação entre a expressão de PTEN citoplasmática e a expressão de PTEN nuclear.

Tabela 5. Correlação entre a expressão de PTEN nuclear e a presença de gânglios linfáticos metastizados.

Tabela 6. Correlação entre a expressão Imuno-histoquímica de PTEN e a avaliação de PTEN por FISH.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.A) Representação esquemática de uma secção de mama normal, evidenciando as principais estruturas anatómicas **B)** Corte histológico de um ducto mamário maduro, composto por ácinos rodeados por tecido conjuntivo intralobular. [Adaptado de: <http://anatpat.unicamp.br/Dscn5500++.jpg> www.clinimater.com.br/images/anat_mama.jpg]

Figura 2. Representação esquemática da família dos receptores do EGFR-receptores tirosina- cianase transmenbranares do tipo I. A superfamília consiste no EGFR, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 e HER4/ErbB4. Cada receptor contém dois domínios ricos em cisteína (CRD) na porção extra-celular, uma região transmenbranar e um domínio intracelular com atividade tirosina-cinase. [Adaptado e traduzido do *Zhang e cols, Drug News & Perspectives*].

Figura 3. Estrutura esquemática da sinalização mediada pelo receptor membranar HER2. O Her2 é activado por homo ou heterodimerização induzida pela ação de um ligando (fator de crescimento) provocando a ativação da cascata da tirosina-cinase e consequentemente a activação génica (sobre-expressão/amplificação).[Adaptado e traduzido de: <http://www.roche.pt/files/image/her2/fig02.jpg>]

Figura 4. Representação esquemática da amplificação do gene HER2. Nas células normais existem duas cópias do gene HER2 e, nas células com amplificação génica do HER2, há número elevado de cópias do gene que é expresso pelo receptor na membrana citoplasmática das células. [Adaptado e traduzido de www.medscape.com/image].

Figura 5. Representação esquemática do mecanismos de acção do Trastuzumab. Adaptado e traduzido de “Proposed mechanisms of action of Herceptin (trastuzumab)” (Nahta e Esteva 2006).

Figura 6 Representação esquemática da Perda do PTEN e resistência ao Trastuzumab. A deleção do gene PTEN leva ao aumento da expressão e actividade das vias de sinalização, activando a proliferação celular e a supressão da apoptose (tumorigénese). [Adaptado e traduzido de: [http://www.google .pt/search resistance trastuzumab,HER2](http://www.google.pt/search%20resistance%20trastuzumab%20HER2)].

Figura 7. Representação esquemática da localização cromossómica do gene PTEN, que se situa no braço longo do cromossoma 10 (10q23). [Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/PTEN.jpeg>].

Figura 8. A) Expressão Imuno-histoquímica do receptor de superfície HER2 (3+) numa amostra de carcinoma invasivo da mama, em material previamente fixado em formol e incluído em parafina. **B)** Amplificação do gene HER2 pela técnica de Hibridização in situ com Fluorescência (FISH), exemplo de um caso amplificado de carcinoma invasivo da mama, em material previamente fixado em formol e incluído em parafina.

Figura 9. Algoritmo para classificação da expressão do HER2. São elegíveis para tratamento, as doentes com tumores cuja graduação Imuno-histoquímica é 3+ ou amplificados pelo FISH. As IHQ 2+ exige sempre uma avaliação por método complementar (FISH), enquanto os casos IHQ 0 e 1+, são a princípio, considerados negativos.

Figura 10. A) Expressão normal do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama (100X); **B)** Expressão reduzida do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama (200X); **C)** Expressão negativa do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama (200X); **D)** Expressão normal citoplasmática e expressão nuclear do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama (200X).

Figura 11. A) Ausência de deleção do PTEN (sinais vermelhos) demonstrada por FISH em células de carcinoma da mama (60X). **B)** Deleção do PTEN detectada por FISH em células de carcinoma da mama (100X).

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

Anatomia e desenvolvimento normal da mama

Ao contrário da maior parte dos órgãos do corpo humano, a mama humana não se encontra totalmente desenvolvida aquando do nascimento. O seu desenvolvimento inicia-se na embriogénese, evoluindo na puberdade, onde ocorre ramificação do sistema ductal, estando este dependente de elevados níveis de estrogénio. A maturação da glândula mamária só é atingida no final da gravidez e lactação, tendo a influência hormonal um papel preponderante. Após esta fase, os lóbulos regridem até uma estrutura semelhante à da mama antes da gravidez, acabando, na menopausa por se assemelhar à glândula mamária no início do desenvolvimento.

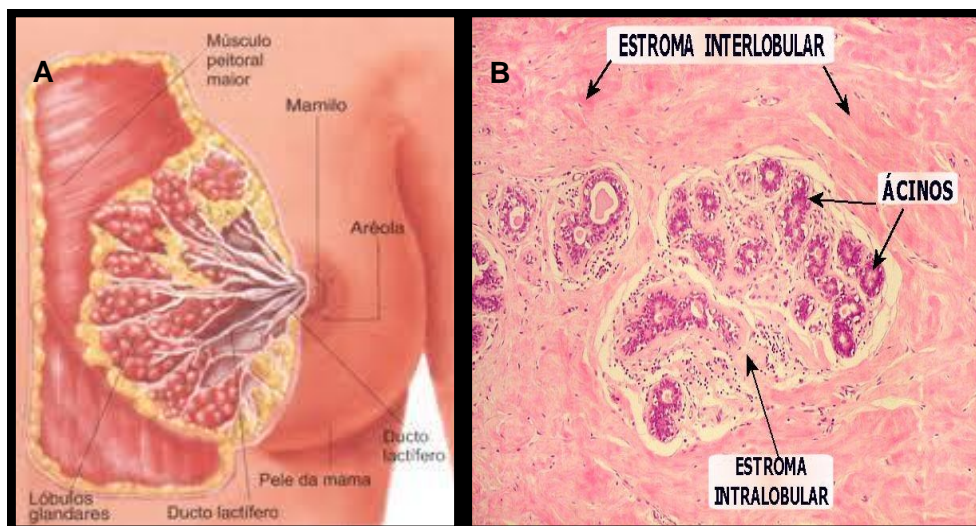


Figura 1. A) Representação esquemática de uma secção de mama normal, evidenciando as principais estruturas anatómicas B) Corte histológico de um ducto mamário maduro, composto por ácinos rodeados por tecido conjuntivo intralobular. Adaptado de: <http://anatpat.unicamp.br/Dscn5500++.jpg> www.clinimater.com.br/images/anat_mama.jpg (Anatpat-Unicamp 2000).

Na mama normal, os ductos e os lóbulos são revestidos por dois tipos de células de origem epitelial: as células epiteliais/luminais e as células mioepiteliais. As primeiras encontram-se na camada interna, junto ao lúmen dos ductos e lóbulos e são responsáveis pela produção de leite. As células mioepiteliais estão em contato com a membrana basal e tem função estrutural de suporte e manutenção das estruturas normais da mama, bem como contratilidade. Além destas células, têm sido descritos outros tipos de células, como as células pluripotentes da mama e células progenitoras, que possuem

um programa de diferenciação previamente definido, sendo responsáveis pela regeneração da glândula mamária.

A mama adulta consiste numa rede de ductos com origem no mamilo, que se ramificam até à formação de ductos terminais. Ao conjunto de cada ducto terminal e seus ácinos, dá-se o nome de Unidade Ducto-Lobular Terminal (UDLT), que é considerada a unidade funcional da mama (Figura 1). O estroma interlobular da glândula mamária é essencialmente constituído tecido conjuntivo fibroso denso e tecido adiposo, enquanto que os lóbulos são revestidos por um estroma específico do tecido mamário, que responde a estímulos hormonais e que se caracteriza pela presença de linfócitos, designado de estroma intralobular. A maior parte das lesões hiperplásicas e neoplásicas da mama tem origem na UDLT, uma vez que é nesta região que se observam mais frequentemente as alterações histopatológicas características destas lesões (Kumar et al. 2005).

O crescimento e desenvolvimento normais da mama são regulados por uma interação complexa de vários fatores hormonais e de crescimento. Entre estes fatores encontram-se hormonas e fatores de crescimento segregados pelas próprias células mamárias e hormonas e fatores de crescimento produzidas por células estromais que assumem um controlo parácrino das células epiteliais mamárias. Os estrogénios, a progesterona, os andrógénios, os glucocorticoides, a prolactina, as hormonas tiróideias, e a insulina são exemplos destes elementos reguladores (Fowble et al. 1994; Haas et al. 1998).

Cancro da mama

O cancro da mama apresenta etiologia multifatorial e envolve elementos da dieta alimentar, fatores hormonais e da vida reprodutiva, além da história familiar, de lesões benignas da mama diagnosticadas previamente e da exposição à radiação ionizante.

Dados epidemiológicos mostram uma associação clara entre a incidência do cancro da mama nos países ocidentais e o estilo de vida destes países, com uma dieta altamente calórica, rica em gordura e proteína animal, aliada à falta de exercício físico. Em estudos realizados em países onde a ingestão de carne é diferente em níveis distintos da população, um maior risco estava associado à maior ingestão de carne,

principalmente carne vermelha. Os fatores hormonais, associados à vida reprodutiva ou ao uso de hormonas exógenas, têm sido considerados importantes fatores de risco para o desenvolvimento do cancro da mama, que ocorre mais frequentemente em mulheres com menarca precoce, nulíparas ou com idade avançada no primeiro parto, infertilidade e menopausa tardia.

No cancro da mama, os sintomas dependem da lesão estar restrita à mama ou ter metastizado para os tecidos adjacentes ou outros órgãos, sendo os locais mais frequentes de metástase a pele, os gânglios linfáticos, a mama contralateral, ossos, pulmões, fígado e sistema nervoso central.

O cancro de mama é o tipo mais comum de cancro entre as mulheres nos EUA e é a segunda principal causa de morte por cancro em mulheres, depois do cancro do pulmão. Na União Europeia, o cancro da mama é de longe a forma mais incidente de cancro em mulheres, com uma estimativa de 429.000 casos diagnosticados (28.9% de toda a incidência de casos em mulheres) (Ferlay et al. 2007). Em Portugal, há registo de cerca de 5200 novos casos de cancro da mama anualmente, sendo ainda a principal causa de morte em mulheres (Ferlay et al. 2007). O risco de desenvolver cancro da mama é menor no continente africano e asiático, incluindo o Japão, onde a probabilidade de uma mulher ter cancro da mama antes de atingir os 75 anos de idade é cerca de 1/3 da observada nos países ocidentais mais desenvolvidos economicamente (Tavassoli e Devilee 2003).

Apesar do crescente aumento das taxas de incidência, as taxas de mortalidade têm sofrido um declínio desde a década de 80. O prognóstico do cancro da mama é favorável quando detetado em estadios precoces e os recentes avanços nas técnicas imagiológicas de deteção de lesões mamárias não palpáveis, bem como a utilização de esquemas quimioterápicos mais eficientes e terapia hormonal adjuvante, contribuíram para a melhora significativa da sobrevida em mulheres com cancro da mama (Baselga e Norton 2002; Tavassoli e Devilee 2003).

Lesões da mama devem ser avaliadas de forma multidisciplinar e, atualmente, esta avaliação pode ser feita através do teste triplo, que inclui exame físico, exames de imagem (mamografia e/ou ecografia) e amostra do tecido, seja por punção aspirativa por agulha fina (PAAF) ou por biopsia por agulha grossa (BAG). O rastreio mamográfico e

o maior nível de informação da população têm possibilitado o diagnóstico do cancro da mama em estadios mais precoces, antes de apresentar metástases para os gânglios linfáticos regionais e, muitas vezes, em estadios não invasivos, o que representa maiores possibilidades de controlo clínico da doença, com melhoria das curvas de sobrevida.

A maioria dos carcinomas da mama, independentemente do seu padrão morfológico, parece ter uma origem comum nas células epiteliais da unidade ducto lobular terminal (UDLT). Embora a progressão biológica destas neoplasias ainda não esteja completamente esclarecida, no que diz respeito aos carcinomas ductais, grande parte dos estudos clínico-patológicos e moleculares parece apontar para uma progressão a partir das lesões intraductais com atipia ou dos carcinomas *in situ* (Schmitt 1995; Schmitt e Andrade 1995; Schmitt et al. 1995). Os carcinomas da mama, enquanto confinados ao interior das estruturas ductais-lobulares são denominados carcinomas *in situ* ou intraductais. Quando a proliferação de células epiteliais ultrapassa a membrana basal e invade o estroma, passam a ser chamados de carcinomas invasivos. O carcinoma ductal invasivo (CDI) representa o tipo histológico mais frequente, representando cerca de 40 a 75% dos casos nas séries de carcinomas de mama publicadas (Tavassoli e Devilee 2003).

As modalidades tradicionais para o tratamento do cancro da mama incluem cirurgia, radioterapia, quimioterapia e terapia hormonal e, embora estas modalidades, isoladas ou em combinações, sejam efetivas na maior parte das doentes, na grande maioria das vezes as características clínicas, anatomo-patológicas e a expressão de alguns marcadores moleculares podem indicar o provável comportamento biológico de uma neoplasia, e, desta forma, colaborar para um tratamento mais adequado desde o diagnóstico inicial da doença, ou ainda prever a resposta das diferentes neoplasias aos agentes terapêuticos existentes. Com base nestes dados, é possível reconhecer três tipos de indicadores de comportamento biológico das neoplasias: os fatores de prognóstico, que devem ser capazes de prever o comportamento da neoplasia desde o momento do diagnóstico; os fatores preditivos, capazes de indicar a capacidade de resposta da neoplasia aos diversos agentes terapêuticos; e os fatores considerados alvos, reais ou potenciais, para terapia específica.

O envolvimento dos gânglios linfáticos é o fator de prognóstico do cancro da mama com maior impacto, sendo relevante a presença de metástases, bem como, o número de gânglios envolvidos. A presença de metástases nos gânglios linfáticos está associada a uma redução da sobrevida aos 10 anos. Estudos com um elevado número de pacientes têm vindo a associar uma pequena redução da sobrevida e tempo livre de doença à existência de micrometástases; no entanto, o seu significado clínico, bem como o de células tumorais isoladas nos gânglios linfáticos, ainda é controverso (Filho 2006). O tamanho do tumor constitui um outro importante fator de prognóstico independente sendo que, quanto maior o tamanho do tumor, maior a probabilidade de surgirem clones com capacidade de metastização e, conseqüentemente, pior o prognóstico. Tumores maiores que 3 centímetros apresentam taxa de recidiva elevada e requerem terapia adjuvante (Elston e Ellis 2002).

O grau histológico consiste num sistema de pontuação que divide os tumores em três graus distintos, tendo em consideração a sua arquitetura tubular, pleomorfismo nuclear e índice mitótico: Grau I bem diferenciado, Grau II moderadamente diferenciado e Grau III pouco diferenciado. Um grau histológico superior corresponde a um pior prognóstico. Este fator prognóstico tem uma correlação significativa com a sobrevida e com o tempo livre da doença (Elston e Ellis 2002).

Os Receptores de estrogénio (RE) e de progesterona (RP), para além de serem indicadores da diferenciação dos tumores, constituem um importante fator preditivo. Os tumores hormonais dependentes, positivos para os dois recetores, representam cerca de 80% do total de tumores da mama e estão associados a uma lenta progressão, boa diferenciação e melhor prognóstico. Foi demonstrado que casos RE positivos/ RP positivos respondem melhor ao Tamoxifeno, especialmente em recidivas, enquanto que casos RE positivos/ RP negativos desenvolvem mais facilmente resistência a este anti-estrogénio (Reis-Filho et al. 2006).

O HER2 é um recetor tirosina-cinase que, devido a uma significativa homologia estrutural, pertence à família do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), constituída por EGFR (HER1), HER2, HER3 e HER4 (figura 2). Cada um destes receptores de superfície é codificado por um gene específico e constituído por dois domínios extracelulares específicos e constituído por dois domínios extracelulares

específicos, um domínio transmembranar, e um domínio intracelular com homologia a proteínas tirosina-quinases (Citri et al. 2003; Stern 2003).

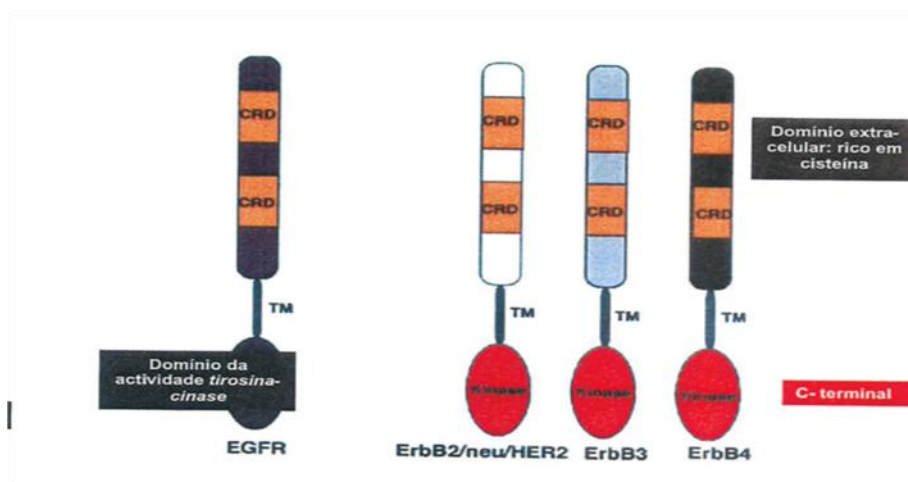


Figura 2. Representação esquemática da família dos receptores do EGFR -receptores tirosina-quinase transmembranares do tipo I. A superfamília consiste no EGFR, HER2/ErbB-2, HER3/ErbB-3 e HER4/ErbB4. Cada receptor contém dois domínios ricos em cisteína (CRD) na porção extra-celular, uma região transmembranar e um domínio intracelular com atividade tirosina-quinase. Adaptado e traduzido de “New perspectives on anti-HER2/neu therapeutics “ (Zhang et al. 2000).

O HER2 encontra-se sobre- expresso em cerca de 40 a 60% de carcinomas ductais *in situ* e em 15 a 30% dos carcinomas invasivos da mama (ductais na maioria), sendo que em 90% dos casos a sobre-expressão é causada por amplificação genica (Bánkfalvi et al. 2000). Mutações pontuais e outras alterações cromossômicas são raras. Nos trabalhos iniciais de Lamon e colaboradores (1987), o HER2 foi apontado como fator de prognóstico independente , com a utilização de 189 amostras tumorais e a técnica de Southern Blot para avaliação da amplificação do gene HER2 (Slamon et al. 1987). Estudos posteriores mostraram a associação quase invariável da sobre-expressão/amplificação do HER2 a outros fatores de prognóstico adverso, entre eles o comprometimento dos gânglios linfáticos, tamanho do tumor, elevado grau histológico, idade avançada e ausência de expressão de receptores hormonais, impedindo a sua classificação como fator independente de prognóstico. De qualquer forma, o HER2

parece correlacionar-se com o comportamento agressivo da neoplasia e menor tempo de sobrevida total livre de doença (Carr et al. 2000; Schnitt 2001).

Além do seu valor como fator prognóstico, discute-se o papel do HER2 como fator preditivo à resposta de determinados agentes quimioterápicos (Piccart et al. 2000; Schnitt 2001).

O cancro da mama é assim uma doença heterogénea pois, apesar de o resultado clínico poder ser previsto devido a determinados indicadores de prognóstico clássicos, há uma percentagem de casos que se comportam de forma inesperada, mesmo se os parâmetros clínicos e patológicos indiquem o contrário (Tavassoli e Devilee 2003). Os estudos de perfis de expressão génica, usando a tecnologia de cDNA microarrays, levaram a uma melhor compreensão celular e molecular desta doença, fornecendo os tão conhecidos “retratos moleculares” dos carcinomas da mama (Sørlie et al. 2001), que permitem o reconhecimento de três grupos principais: 1) um grupo de tumores com características das células luminais; 2) um grupo de tumores com fenótipo basal (e/ou mioepitelial); e 3) um grupo de tumores que sobre-expressam o oncogene HER2.

Os tumores com um fenótipo luminal estão associados com um melhor prognóstico e expressam CK8/18, CK19, bem como um conjunto de factores de transcrição que incluem o Receptor de Estrogénio (RE), prevendo assim a resposta a terapias hormonais, como o tamoxifeno e os inibidores de aromatase (Sørlie et al. 2001). Os tumores do tipo basal são caracteristicamente negativos para RE e HER2 e expressam marcadores de tipo basal, como CK5, CK14, CK17, P-caderina e EGFR (Reis-Filho et al. 2006). Os carcinomas da mama do tipo basal são relatados como tendo um comportamento clínico mais agressivo (Katz et al. 2007) e não possuem um alvo terapêutico específico (Harris et al. 2007).

Os tumores que sobre-expressam HER2 representam 15 a 30% dos carcinomas da mama; estes estão normalmente associados à falta ou à expressão reduzida de RE, estando ainda relacionados a um comportamento biológico agressivo e com maior propensão para metastizar à distância, sobretudo para o sistema nervoso central (Stemmler e Heinemann 2008). Apesar dos carcinomas com sobre-expressão de HER2 serem classificados como um grupo independente, esta classificação não é baseada na diferenciação celular como acontece com os outros dois grupos, mas provavelmente

apenas na existência de uma terapia específica para estes tumores: o anticorpo monoclonal Trastuzumab.

A aprovação do Trastuzumab para utilização em doentes com cancro da mama metastático, fez com que o proto-oncogene HER2 passasse a desempenhar um papel central entre os marcadores moleculares estudados no cancro da mama.

HER2 e Trastuzumab

Recentes avanços no estudo das alterações moleculares e genéticas, subjacentes ao desenvolvimento e progressão do cancro da mama, iniciaram uma mudança nos esquemas terapêuticos, resultantes da identificação de alvos moleculares específicos.

Os receptores hormonais foram os pioneiros entre os marcadores biológicos na era da terapia específica e, atualmente, a terapia hormonal é utilizada em doentes com cancro da mama, cujas células neoplásicas apresentam expressão imuno-histoquímica para receptores de estrogénio e/ou progesterona. O Tamoxifeno é o agente terapêutico de uso mais difundido para estas doentes, ligando-se ao mesmo local de ligação do estradiol, agindo de forma competitiva nos receptores de estrogénio e inibindo o crescimento celular dependente dos estrogénios (Schiff et al. 2003).

Mais recentemente, os receptores tirosina –cinase (RTC) surgem como potenciais alvos terapêuticos, com o aparecimento de moléculas com função inibidora da sua actividade enzimática e/ou de anticorpos monoclonais. Estes ligam-se ao domínio extracelular de alguns receptores, agindo por competição com o ligando ou por alteração da conformação da estrutura do próprio receptor.

O factor de crescimento epidérmico humano do tipo 2 (HER2 ou ErbB-2) (proto-oncogene localizado no cromossoma 17) está sobre-expresso em cerca de 15% a 30% dos carcinomas invasivos da mama (Nagata et al. 2004). Os receptores dos factores de crescimento epidérmicos humanos (ErbB-1, ErbB-2, ErbB-3 e ErbB-4) são receptores transmembranares, com actividade tirosina cinase e homologia parcial que, em condições normais, regulam o crescimento celular, apoptose, adesão, migração e diferenciação, bem como outras respostas celulares. Cada um destes receptores é

constituído por um domínio extracelular de ligação, um segmento transmembranar lipofílico e um domínio intracelular funcional tirosina cinase (presente em todos os receptores, à excepção do ErbB-3). Os domínios tirosina cinase são normalmente activados por homo ou heterodimerização induzida pela acção de um ligando.

O receptor ErbB2/HER2 está intimamente relacionado com a proliferação celular, através da via RAS-MAPK. O HER2 também está implicado na inibição da apoptose, através da via fosfatidilinositol-3-cinase/proteína cinase mitogénica activada (PI3K/AKT/mTOR).

O HER2 tem a particularidade de não possuir um ligando conhecido, razão pela qual a sua activação depende de um processo de heterodimerização em situações normais e patológicas, podendo também ocorrer por homodimerização em casos de sobre-expressão/amplificação génica (Figura 3).

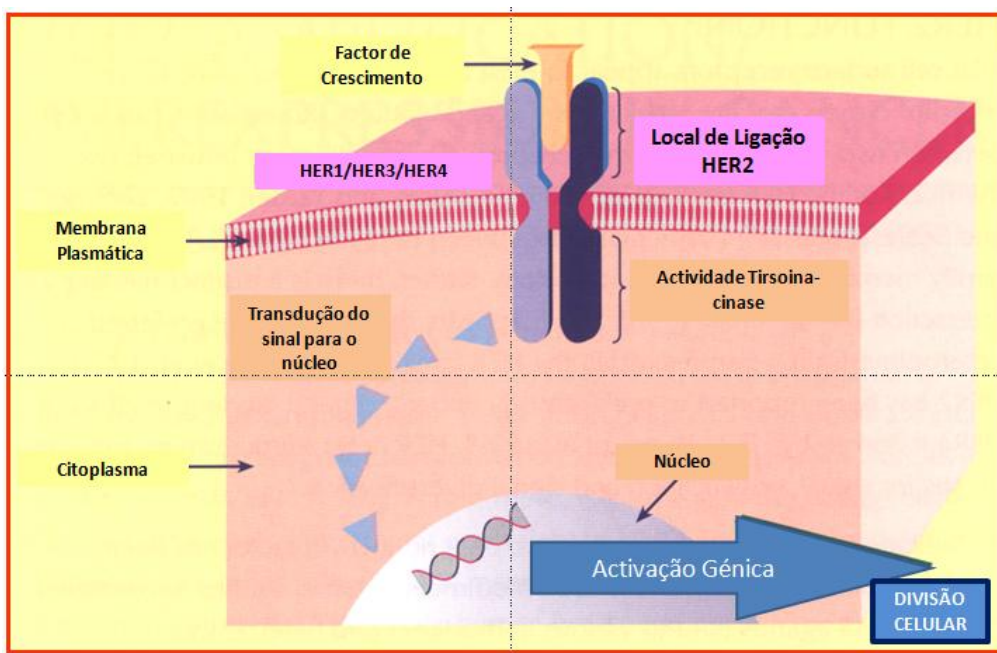


Figura 3. Estrutura esquemática da sinalização mediada pelo receptor membranar HER2. O Her2 é activados por homo ou heterodimerização induzida pela acção de um ligando (fator de crescimento) provocando a ativação da cascata de sinalização da tirosina-cinase e consequentemente a activação génica (sobre-expressão/amplificação). Adaptado e traduzido de: <http://www.roche.pt/files/image/her2/fig02.jpg> (Roche Farmacêutica Química).

Atualmente é recomendada a determinação do *status* do HER2 em todos os carcinomas da mama, uma vez que esta informação fornece dados fundamentais, com importância prognóstica e terapêutica. A expressão do HER2 associa-se a uma redução do período livre de doença, bem como à resposta a determinados agentes quimioterápicos (Slamon et al. 1987). Em 90% dos casos, a sobre-expressão do receptor HER2 deve-se a amplificação génica (Cotran et al. 2005), podendo esta ser detectada através de imuno-histoquímica (IHQ), estudando a expressão da proteína HER2, ou através de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), estudando o número de cópias do gene HER2/*neu* (Park e Davidson 2007) (Figura 4).

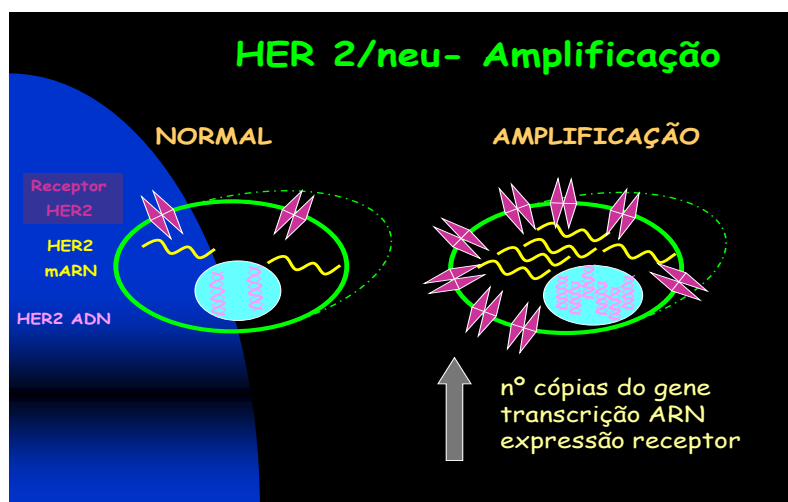


Figura 4. Representação esquemática da amplificação do gene HER2. Nas células normais existem duas cópias do gene HER2 e, nas células com amplificação génica do HER2 há um número elevado de cópias do gene que é expresso pelo receptor na membrana citoplasmática das células. Adaptado e traduzido de http://www.medscape.org/viewarticle/421097_4 (Uhlenhopp).

A sobre-expressão do receptor HER2 confere uma resistência aumentada à terapia hormonal, a alguns quimioterápicos, à radiação gama, e a algumas citocinas (Wolff et al. 2006), indicando assim também uma associação com um potencial metastático aumentado (Singer et al. 2008). O estudo do receptor HER2 conduziu ao desenvolvimento, na última década, de terapias dirigidas com elevada efectividade no tratamento do cancro da mama, sendo um desses exemplos o Trastuzumab, que foi o

primeiro fármaco aplicado com sucesso no tratamento deste tipo de tumores (Hall e Cameron 2009), permitindo um melhor prognóstico no tratamento das doentes.

O Trastuzumab (ou Herceptin), um anticorpo monoclonal humanizado recombinante anti-HER2, foi aprovado pela FDA (Food and Drug Administration) em Setembro de 1998, para tratamento do carcinoma da mama metastático, em associação com o paclitaxel. Posteriormente, em 2005, recebeu a aprovação como tratamento adjuvante do carcinoma da mama com sobre-expressão de HER2, com evidente benefício na manutenção do tratamento durante 1 ano. Numa fase inicial, foram realizados alguns estudos com o Trastuzumab administrado em concomitância com antraciclinas, o que se concluiu não ser praticável, devido ao risco aumentado de cardiotoxicidade.

Os estudos clínicos realizados na última década têm estabelecido que os inibidores de tirosina cinases são seguros e terapeuticamente activos, fazendo parte do esquema padrão para determinados tipos específicos de tumores, como é o caso do Trastuzumab para os carcinomas da mama com sobre-expressão de HER2, Erlotinib e Cetuximab para o cancro do pulmão e cólon com mutações do EGFR, Imatinib e Sunitinib para GISTs e carcinomas do rim metastáticos com mutações activadoras do c-KIT e PDGFR α .

No entanto, apesar do Trastuzumab ser um excelente modelo de tratamento desenhado para um determinado tipo de cancro da mama “alvo”, este está associado actualmente com menos de 35% de resposta quando utilizado em monoterapia (Lan et al. 2005). Estas taxas de resposta estão directamente dependentes da selecção das pacientes (Braga et al. 2006). Actualmente, os parâmetros de eleição para o tratamento com Trastuzumab são a imuno-histoquímica (IHC) para o HER2 com um score de 3+, e/ou a amplificação génica medida por hibridização *in situ* (ISH). Um score de 2+ por IHC ou resultados equívocos de IHC requerem sempre confirmação do número de cópias do gene HER2 por ISH (Milanezi et al. 2008).

Mecanismo de Acção do Trastuzumab

Os mecanismos pelos quais o Trastuzumab induz a regressão dos tumores com sobre-expressão de HER2 continuam por esclarecer; no entanto, são já conhecidos alguns mecanismos que podem justificar a sua acção (Figura 5) (Montemurro et al. 2004):

1) O Trastuzumab diminui a sinalização mediada pelo HER2 através das cascatas PI3K e MAPK. A redução da sinalização através destas vias induz a expressão do inibidor da cinase dependente da ciclina (p27 kip1), que promove a interrupção do ciclo celular e a indução de apoptose.

2) O fármaco rapidamente dissocia a tirosina cinase (Src) do HER2, reduzindo a actividade da primeira, de tal forma que o PTEN (*phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten*) é desfosforilado e translocado para a membrana plasmática, provocando a inibição das vias subsequentes (AKT e mTOR).

3) A eficácia do Trastuzumab pode também ser altamente dependente da sua capacidade de induzir uma resposta imunológica. Os anticorpos que têm como alvo o HER2 promovem a apoptose em múltiplas linhas celulares de carcinoma da mama através da citotoxicidade que é provocada.

4) O Trastuzumab actua também através da inibição da angiogénese, provocando uma diminuição da densidade de microvasos *in vivo* e redução da migração endotelial *in vitro*. Esta acção é potenciada pelo sinergismo evidente entre o trastuzumab e alguns quimioterápicos, como os taxanos.

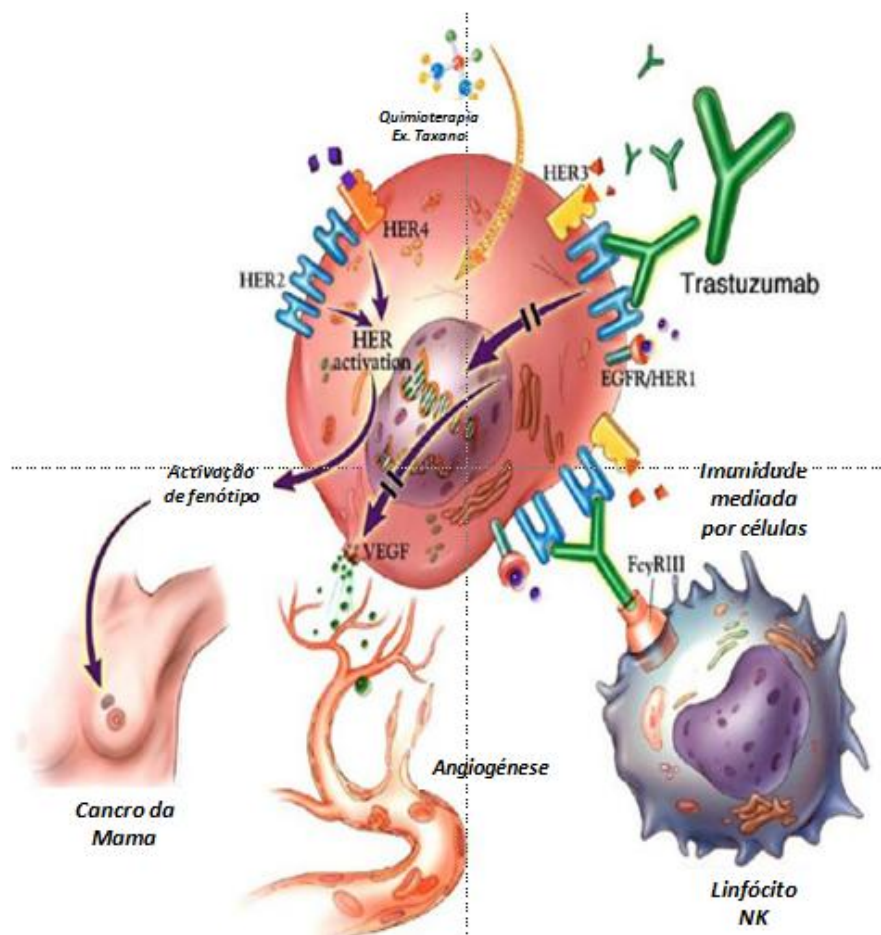


Figura 5. Representação esquemática dos mecanismos de ação do Trastuzumab. Adaptado e traduzido de “Proposed mechanisms of action of Herceptin (trastuzumab)” (Nahta e Esteva 2006).

Mecanismos de Resistência ao Trastuzumab

Apesar da elevada eficácia inicial do Trastuzumab, têm sido descritos casos de resistência a este fármaco (Milanezi et al. 2008). A resistência adquirida ao Trastuzumab desenvolve-se na maioria das doentes com cancro da mama metastático, e um grande número nem nunca responde, demonstrando mesmo resistência primária (Nahta et al. 2006). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a resistência ao Trastuzumab parece estar associada com a expressão aumentada da glicoproteína membranar MUC4, que se liga ao HER2, inibindo assim a ligação do Trastuzumab (Nagy et al. 2005). A sinalização aumentada do receptor do factor de crescimento insulina-like (IGF-IR) também reduz o efeito anti-proliferativo mediado pelo Trastuzumab em células de

cancro da mama com sobre-expressão de HER2 (Harris et al. 2007). Scaltriti e colaboradores demonstraram ainda, numa série de pacientes com cancro da mama avançado positivo para HER2 e tratados com Trastuzumab, que a presença de p95HER2 (forma truncada do receptor) estava também associada com resistência clínica ao Trastuzumab, enquanto que tumores com a expressão do receptor completo exibiam uma taxa de resposta elevada a este tratamento (Scaltriti et al. 2007).

O HER2 está ainda sujeito a um tipo de regulação adicional, mediada por chaperones moleculares, particularmente a proteína Hsp90. O papel da Hsp90 na regulação do HER2 tem sido atribuído principalmente à estabilização do receptor na superfície da célula, uma vez que a inibição da função da Hsp90 resulta na degradação do receptor e dos seus efectores, bloqueando o crescimento das células tumorais. Esta dependência do HER2 da presença de Hsp90 tem sido descrita como mais um mecanismo alternativo de resistência ao Trastuzumab (Citri et al. 2006).

Nagata e colaboradores demonstraram ainda um papel da via PI3K/Akt na resistência ao Trastuzumab, uma vez que sugeriram que níveis baixos da fosfatase PTEN resultavam numa fosforilação aumentada da PI3K/Akt e consequente sinalização, assim como num bloqueio do efeito anti-proliferativo mediado pelo Trastuzumab. Aliás, tem sido demonstrado que pacientes com tumores deficientes em PTEN e com sobre-expressão de HER2 respondem pior à terapia com Trastuzumab (Nagata et al. 2004). Mutações na subunidade catalítica p110 α (PI3KCA) da PI3K ou a amplificação génica da região 3q26 podem ainda interferir com as taxas de resposta ao Trastuzumab, sugerindo que a combinação de Trastuzumab com inibidores da via de sinalização da PI3K pode vir a ser uma estratégia prometedora para reverter o fenómeno de resistência ao Trastuzumab (Pérez-Tenorio et al. 2007).

PTEN e Resposta ao Trastuzumab

Conforme descrito acima, níveis baixos da fosfatase PTEN estão associados a resistência ao Trastuzumab. Uma das causas para esta diminuição do PTEN é a deleção do gene localizado no cromossoma 10q23 (Jacobs et al. 1999, Montemurro, 2004 #13; Kokubo et al. 2005; Modi et al. 2005; Razis et al. 2008; Sengupta et al. 2008), por perda de heterozigotia ou hipermetilação do promotor do gene codificante (Depowski et al. 2001; Razis et al. 2008). A perda da proteína PTEN pode ser detectada em cerca de 5%

a 30% dos casos de cancro da mama (Kokubo et al. 2005; Nagata et al. 2004), e a deleção do seu gene codificante leva ao aumento da expressão e actividade das vias PI3K e Akt (Abbott et al. 2003, Citri, 2003 #4), que tem por consequência a activação da proliferação celular e supressão da apoptose, respectivamente (Razis et al. 2008; Stemmler e Heinemann 2008) (Figura 6).

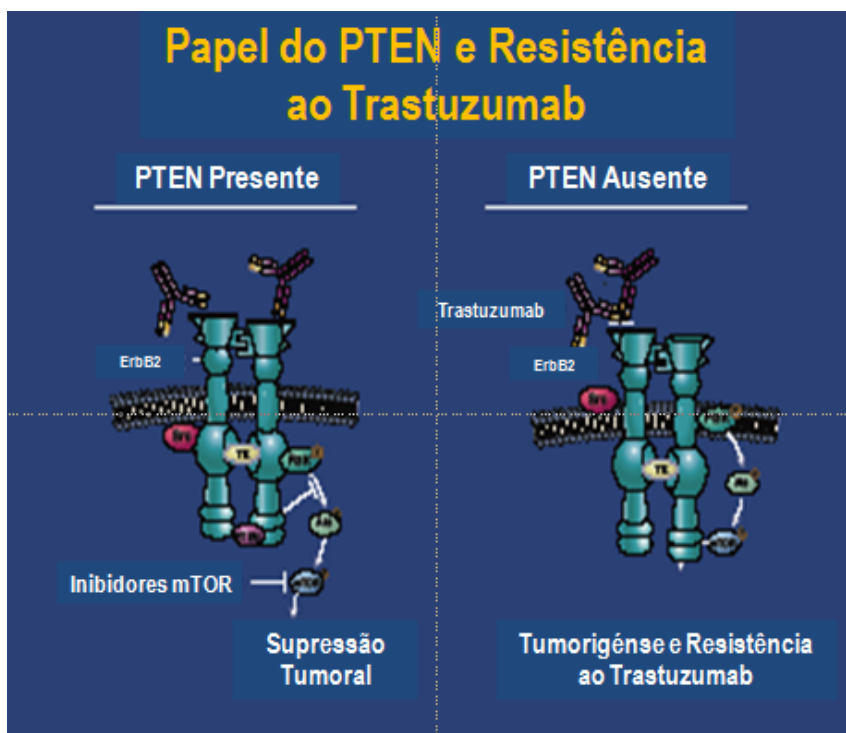


Figura 6. Representação esquemática da perda do PTEN e resistência ao Trastuzumab. A deleção do gene PTEN leva ao aumento da expressão e actividade das vias de sinalização, activando a proliferação celular e a supressão da apoptose (tumorigênese). Adaptado e traduzido de: [http://www.google.pt/search resistance trastuzumab,HER2](http://www.google.pt/search%20resistance%20trastuzumab%20HER2).

Relativamente à prática clínica, a descoberta de que tumores com ou sem expressão de PTEN pode determinar a resposta aos inibidores de tirosina cinase é de extrema importância, não só porque irá permitir uma melhor selecção das pacientes, como também terá um efeito directo nos serviços de saúde. A deleção do PTEN pode ser estudada através de diversas técnicas, como a Imuno-histoquímica (IHQ) e a Hibridização *in situ* por fluorescência (FISH) (Petrocelli e Slingerland 2001).

O PTEN é um gene supressor tumoral localizado no cromossoma 10 (banda cromossómica 10q23.33) (Figura 7). Este gene codifica uma fosfatase com dupla função, fundamental na inibição da migração celular, disseminação e adesão focal celular. Várias neoplasias, incluindo o carcinoma da mama, apresentam mutações ao

nível deste gene; no entanto, o papel destas alterações na carcinogénese, bem como no prognóstico deste tipo de neoplasias, está ainda por esclarecer (Abbott et al. 2003; Kokubo et al. 2005; Razis et al. 2008; Verhagen et al. 2006).

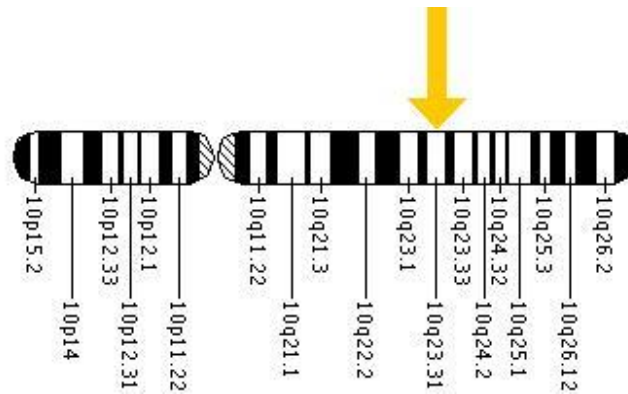


Figura 7. Representação esquemática da localização cromossómica do gene PTEN, que se situa no braço longo do cromossoma 10 (10q23).

Adaptado de: <http://ghr.nlm.nih.gov/dynamicImages/chromomap/PTEN.jpeg>. (Medicine 2007).

A perda de função do PTEN pode funcionar como preditivo de resistência à terapêutica com Trastuzumab. Actualmente sabe-se que a redução da expressão do PTEN confere uma resistência tumoral ao Trastuzumab em xenograftos (Nagata et al. 2004). Este facto pode ter um impacto directo no tratamento de doentes com carcinoma da mama com perda de função do PTEN. A via PI3K pode ser uma das alternativas para contornar esta resistência (Citri et al. 2003).

Numa fase que se torna fundamental personalizar cada vez mais as terapêuticas dos pacientes o mais precocemente possível, é importante determinar quais destes beneficiarão de cada um dos vários tratamentos disponíveis. Esta determinação trará ganhos para as próprias doentes e para os clínicos, assim como benefícios económicos.

OBJETIVOS

OBJETIVOS

O objetivo principal do nosso trabalho foi estudar e validar se a perda de expressão do PTEN constitui um possível mecanismo de resistência ao Trastuzumab em carcinomas invasivos da mama com sobre-expressão de HER2, utilizando uma série de tumores da mama que temos vindo a construir em parceria com o serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João (HSJ), Porto, Portugal.

Para atingir este objetivo propomos:

- Estudar a expressão do PTEN por Imuno-histoquímica numa série de carcinomas da mama com sobre-expressão de HER2.
- Correlacionar a expressão do PTEN com as taxas de resposta dos pacientes tratados com Trastuzumab no serviço de Oncologia do HSJ, isoladamente ou em combinação com outras terapias;
- Estudar se a deleção do gene PTEN pode ser uma das alterações moleculares responsáveis pela perda do PTEN e correlacionar com a expressão proteica nesta série de carcinomas de mama.

MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

Série de amostras tumorais

Foi estudada uma série de 51 doentes com carcinoma invasivos da mama, em material fixado em formol e incluído em parafina, disponibilizado a partir dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do HSJ, entre os anos de 1998 e 2008. A maioria destes casos, 80.4% (41/51), foram histologicamente classificados apenas como carcinoma ductal invasivo (CDI), existindo 5.9% (3/51) com um componente mucinoso, 11.7% (6/51) com um componente micropapilar, e 2% (1/51) com um componente apócrino. Quanto às dimensões dos tumores primários, 31.9% (15/47) tinham tumores com menos que dois centímetros, 40.4% (19/47) entre os dois e os cinco centímetros, e 27.7% (13/47) maiores que cinco centímetros. Relativamente ao grau histológico, 66% (33/50) destes tumores foram classificados como grau III, 32% (16/50) como grau II, e somente um caso (2%; 1/50) foi de grau I. Uma outra informação que nos permite antever a agressividade destes tumores, e até mesmo predizer o tratamento destas doentes, é a existência ou não de gânglios invadidos ou metastizados. Assim, em cerca de 67.3% (33/49) dos casos existiam gânglios com metástases, e os restantes 32.7% (16/49) foram negativos. A série foi ainda avaliada, recorrendo à técnica de imuno-histoquímica, para a expressão de um painel de biomarcadores para a mama, nomeadamente Receptores de Estrógeno (RE), Receptores de Progesterona (RP) e o proto-oncogene HER2. Cerca de 43.1% (22/51) dos casos foram RE negativos e 55.3% (26/47) foram RP negativos. Todos os casos estudados foram seleccionados por serem positivos para a expressão do HER2 (Tabela 1).

A determinação da expressão do proto-oncogene HER2 foi feita em primeira linha com recurso à técnica de imuno-histoquímica, tendo sido classificados como positivos os casos 3+ (Figura 8A). Nos casos classificados como 2+, recorreu-se à técnica de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), para a determinação do número de cópias do gene (Figura 8B). Apenas os casos classificados como 3+ por imuno-histoquímica ou amplificados por ISH são seleccionados para terapia com Trastuzumab (Figura 9).

Tabela 1. Resumo da série de amostras tumorais.

	Nºde casos	Percentagem
Tipo Histológico		
CDI	41	80.4
Mucinoso	3	5.9
Micropapilar	6	11.7
Apócrino	1	2.0
Tamanho do Tumor		
<2cm	15	31.9
>2cm e <5cm	19	40.4
>5cm	13	27.7
Grau Histológico		
I	1	2.0
II	16	32.0
III	33	66.0
Gânglios Linfáticos		
Negativo	16	32.7
Positivo	33	67.3
RE		
Negativo	22	43.1
Positivo	29	56.9
RP		
Negativo	26	55.3
Positivo	21	44.7
HER2		
Negativo	0	0.0
Positivo	51	100.0
Progressão		
Não	26	52.0
Sim	24	48.0
Resultado/Tratamento		
Sem progressão	28	54.9
Resposta Completa	3	5.9
Resposta Parcial	3	5.9
Doença Estável	3	5.9
Progressão	14	27.4

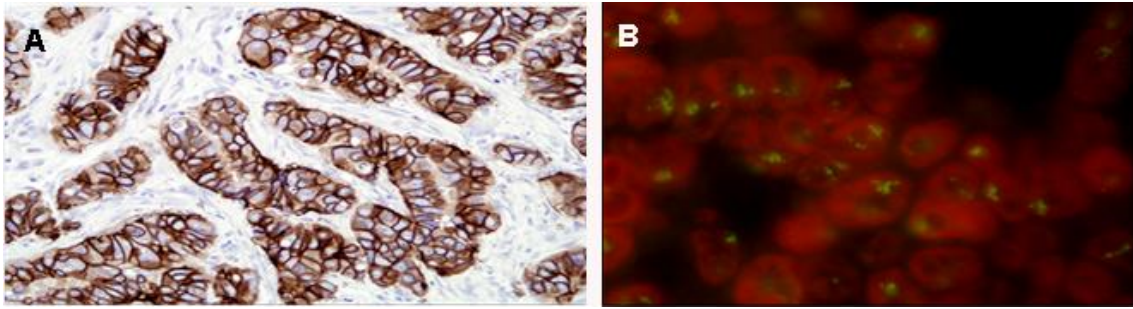


Figura 8. A) Expressão Imuno-histoquímica do receptor de superfície HER2 (3+) numa amostra de carcinoma invasivo da mama, em material previamente fixado em formol e incluído em parafina. B) Amplificação do gene HER2 pela técnica de Hibridização in situ com Fluorescência (FISH) exemplo de um caso amplificado carcinoma invasivo da mama, em material fixado em formol e incluído em parafina.

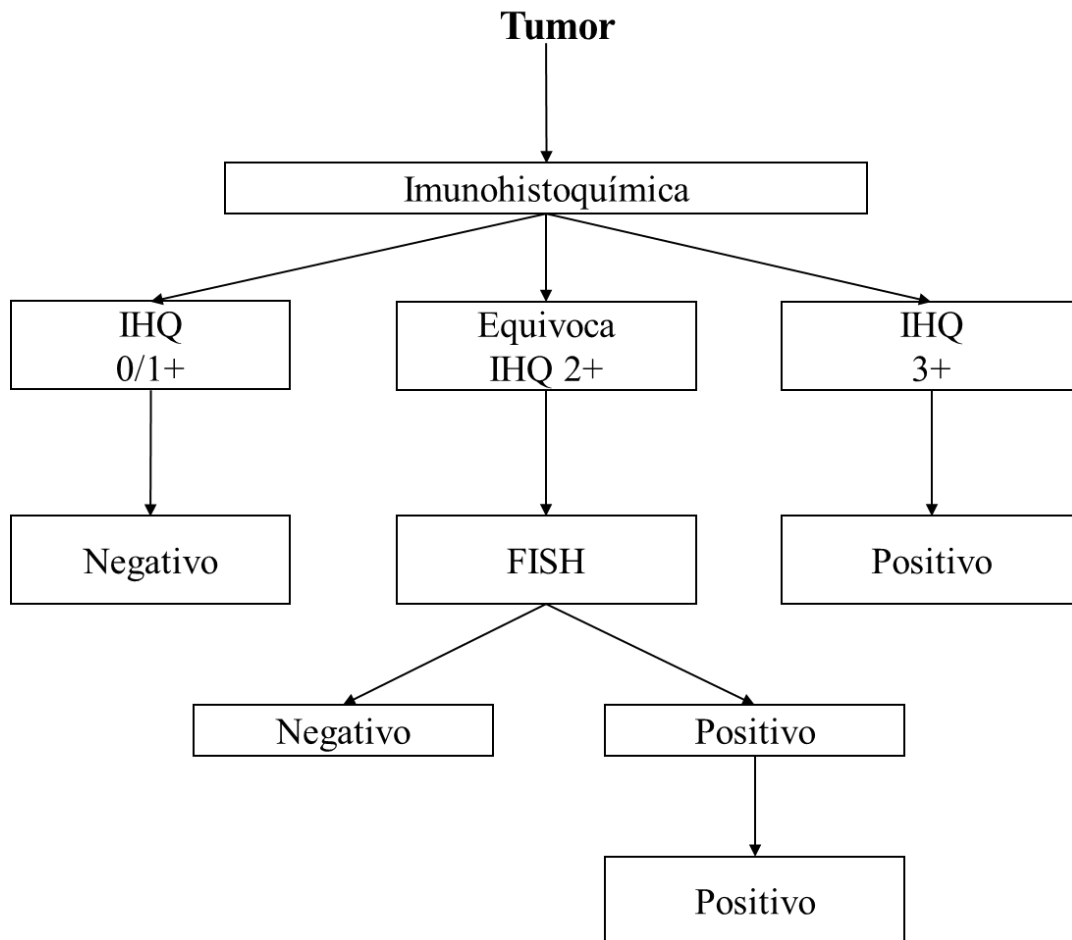


Figura 9. Algoritmo para classificação da expressão do HER2. São elegíveis para tratamento, as doentes com tumores cuja graduação Imuno-histoquímica é (3+) ou amplificados pelo FISH. As IHQ 2+ exige sempre uma avaliação por método complementar (FISH), enquanto os casos IHQ 0 e 1+, são considerados negativos.

As maiorias das doentes foram tratadas com Trastuzumab em terapia adjuvante ou pós-cirurgia, ou em quimioterapia primária ou neoadjuvante. Uma percentagem grande destas doentes, 58.8% (30/51), teve como tratamento primário a cirurgia, na sua maioria mastectomia com ressecção axilar dos nódulos linfáticos, sendo que em 41.2% (21/51) das doentes foi realizada quimioterapia primária antes da cirurgia. Relativamente à informação sobre as taxas de resposta das pacientes tratadas com Trastuzumab pelo Departamento de Oncologia do HSJ, isoladamente ou em combinação com outras terapias, conseguimos os registos de que 52% (26/50) das doentes não progrediram durante o tratamento adjuvante; no entanto, 48% (24/50) das doentes progrediram, não respondendo de forma eficaz ao tratamento. Aliás, actualmente, mais de metade das doentes 54.9% (28/51) estão livres de doença, sem registo de progressão. Existe, no entanto, um grupo de pacientes com resposta completa (5.9%, 3/51), com resposta parcial (5.9%, 3/51) ou com doença estável (5.9%, 3/51) ao Trastuzumab, após progressão. Desta série, 27.4% (14/51) tiveram progressão da doença. Até à data, sabemos que 72.6% (37/51) destas mulheres encontram-se vivas, e 27.4% (14/51) já faleceram devido a doença metastática.

Avaliação da expressão do PTEN por imuno-histoquímica

Neste trabalho foi efetuada a optimização/padronização da técnica de imuno-histoquímica (IHQ) para o anticorpo PTEN (Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome ten, clone 138 G6, Rabbit mAb da Cell Signaling Technology). Como controlo positivo, utilizou-se um tecido específico de acordo com a brochura do próprio anticorpo (caso de tumor da próstata com tecido normal adjacente). Nos 51 casos de carcinoma de mama da série já estudada, foi efetuado o protocolo de IHQ para a determinação do PTEN (Anexo I).

Resumidamente, utilizou-se a técnica automatizada de IHQ com o equipamento BenchMark™ XT Staining System-Ventana Medical SystemInc. (Tucson, Arizona 85755 USA), utilizando o sistema de detecção ultra View™ Universal DAB™Detection KIT. Foram efectuados cortes histológicos de 3 µm de espessura a partir dos blocos de parafina, e colocados em lâminas Super Frost Plus, secos “overnight”

(12h) na estufa a 37°C. Este sistema automático permite uma completa automatização da técnica de IHQ a partir do momento em que a lâmina é introduzida no equipamento, sendo previamente colocada uma etiqueta no canto fosco da lâmina onde consta o protocolo e a identificação do caso. Assim, o protocolo é efetuado dentro do equipamento na sua totalidade, iniciando-se pela recuperação antigénica a 95° C com Cell Conditionig Solution (CC1) em três ciclos de 8, 30 e 60 minutos, respectivamente. Para a inibição da peroxidase endógena, utiliza-se uma solução comercial de peróxido de hidrogénio a 3% (UV Inibitor) que vem incluído no Kit de detecção, cuja incubação é de 4 minutos. O Anticorpo primário PTEN foi diluído a 1/50 numa solução comercial específica (Diluyente Lab Vision Corporation TA-125-UD), e a incubação foi feita durante duas horas a uma temperatura de 37°C. O sistema de detecção HRP utilizado teve um tempo de incubação de 8 minutos, e é composto por um cocktail de imunoglobulinas (goat anti-mouse IgG e IgM e goat anti-rabbit), sendo um sistema multi-link que permite a ligação de qualquer tipo de anticorpo, sendo ele monoclonal ou policlonal. Este sistema de detecção é formado por uma estrutura de pequenas e numerosas estruturas sintéticas, denominados multímetros, possuindo estes uma enorme capacidade de amplificar os sinais específicos que se estabelecem entre o antigénio e o anticorpo. Estes multímetros possuem, nas suas extremidades, moléculas de peroxidase que permitem reagir no final da reação, por oxidação, com o cromogénio DAB e dando cor à reação. O DAB Chromogen, composto por 0.2% 3,3' diaminobenzidina tetrahydroclorido, tem o tempo de incubação de 8 minutos. No Kit de detecção está incluído um intensificador de sinal, UV Copper, que contém sulfato de cobre, atribuindo uma cor mais escura e mais intensa à marcação detetada; nesta solução, as lâminas permanecem 4 minutos. O contraste nuclear é feito com Hematoxilina II (Hematoxilina de Mayer) durante 12 minutos.

O protocolo termina neste passo, e as lâminas são retiradas do equipamento. Fora do aparelho é efectuada a lavagem, a desidratação das lâminas numa bateria crescente de álcoois, e finalmente são montadas com meio de montagem (Micron CTM 6 Thermo Scientific) que permite não somente a observação microscópica, mas também preservação e arquivo definitivo das lâminas. A coloração das lâminas foi avaliada microscópicamente (microscópio óptico Zeiss Axios Kop 2) com a colaboração de um patologista e uma bióloga, de forma independente.

Avaliação da deleção do gene PTEN por FISH

Neste trabalho foi efetuada a otimização e padronização da técnica de hibridização *in situ* (FISH) em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina, utilizando o LSI PTEN/CEP10 Dual probe mix (Vysis® LSI®). Assim, seleccionaram-se da série dos 51 casos, de acordo com a classificação estabelecida da expressão da proteína PTEN por IHQ, os que foram classificados como negativos (5 casos) e reduzidos (4 casos) e ainda alguns casos normais (2 casos).

Para efetuarmos a técnica de hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) utilizaram-se cortes de parafina a 4 µm, colocados em lâminas adesivadas Super Frost Plus, e secos “overnight” (12h) na estufa a 37°C. A técnica manual de FISH foi padronizada com o mesmo controlo positivo utilizado para a otimização do PTEN para IHQ (caso de tumor da próstata com tecido normal adjacente). Assim, após a desparafinização automática das lâminas (Micron HMS740 ThermoScientific), estas foram sujeitas a uma recuperação antigénica em banho-maria, com uma solução tampão citrato de sódio salino 1X SSC (UltraPure™ 20X SSC, Invitrogen) a uma temperatura de 98°C durante 15 minutos. Este passo é fundamental na tentativa de expor e hidratar as células, pois todos estes tecidos foram previamente sujeitos a uma fixação com formol a 10% tamponado durante várias horas, o que provoca nos tecidos a formação de ligações covalentes muito fortes, que impedem a acessibilidade aos receptores ou epítomos tecidulares. Efetuou-se uma digestão enzimática com a enzima Proteinase K da Qiagen, variando entre os 5 e os 20 minutos, dependendo do tipo de tecido (biopsia ou peça cirúrgica), permitindo a melhor permeabilização das células para que a sonda tenha possibilidade de chegar ao núcleo das mesmas. As sondas de dupla coloração para o DNA foram co-desnaturadas a 80°C durante 5 minutos e posteriormente submetidas a hibridação a 37°C durante 16/18 horas numa placa de aquecimento específica, Hibridyzer. Após o passo de hibridação, as lâminas são submetidas a uma lavagem com o tampão adstringente, 2X SSC, a uma temperatura entre os 72°-74°C em banho-maria, com a finalidade retirar todo o material que não sofreu hibridação, evitando assim que este reaja e provoque ruído de fundo e artefatos de fluorescência.

Para que seja possível visualizar morfológicamente todo o tecido, e detetar melhor os sinais vermelhos e verdes nos núcleos das células, fez-se um contraste nuclear com o

meio de montagem DAPI (Vectashield-mounting médium with DAPI-H-1200). Este contraste fornece uma cor azul às células, contrastando com os sinais de hibridação vermelhos e verdes nos núcleos.

As lâminas, após introdução do meio de montagem, têm que permanecer cerca de 15 a 20 minutos em repouso, para que o meio de montagem se integre nas células, e permanecerem às escuras para evitar que a fluorescência decaia com a luz, podendo ser observadas de imediato ao microscópio de fluorescência. Se essa observação microscópica não se proceder durante as primeiras duas horas que se seguem ao final do término da técnica, estas têm que ser congeladas a -20°C , permitindo assim que a fluorescência se mantenha estável.

As lâminas foram observadas com a colaboração de uma bióloga experiente, do serviço de Genética do IPO do Porto. A sonda de coloração dupla utilizada deteta o centrómero do cromossoma 10, dando uma fluorescência verde, e a porção do gene do PTEN com um fluorocromo vermelho.

Nos casos considerados sem deleção (normais) foram observados dois sinais vermelhos e dois sinais verdes por núcleo. Nos casos com deleção, foi observado um sinal vermelho e dois sinais verdes por núcleo em mais de 20% das células.

Análise Estatística

A análise estatística foi feita pelo software IBM SPSS Statistics 19.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA). As características clínico-patológicas e imuno-histoquímicas foram comparadas com a expressão de PTEN utilizando tabelas de contingência e os testes do qui-quadrado (χ^2) ou o Fisher Exact Test. Em todas as análises, uma associação foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0.05$.

RESULTADOS

RESULTADOS

Expressão imuno-histoquímica PTEN numa série de carcinomas da mama

Os tumores onde a expressão do PTEN foi avaliada por IHQ foram analisados microscópicamente por dois avaliadores independentes e pela autora do trabalho.

De acordo com o que já foi descrito em trabalhos anteriores, elaborados por outros elementos do nosso grupo de investigação da nossa instituição (Carvalho 2010), a classificação da expressão citoplasmática do PTEN foi considerada normal, reduzida ou ausente (negativa), tendo como termo de comparação (controlo interno) o padrão da coloração/intensidade de marcação das células endoteliais/perícitos dos vasos do estroma adjacente.

Dos 51 carcinomas da mama avaliados, 64.7% (33/51) foram considerados normais para a expressão do PTEN, o que corresponde à existência de uma coloração no citoplasma das células tumorais, idêntica à coloração existente nos vasos do tecido adjacente (Figura 9A). Em 19.6% (10/51) dos casos, a expressão era reduzida, ou seja, apresentavam uma intensidade de coloração mais ténue em relação à marcação vascular (Figura 9B). Em 15.7% (8/51) dos casos havia negatividade para a expressão do PTEN nas células tumorais (Figura 9C). Uma vez que redução ou perda do PTEN está relacionada com a resistência ao Trastuzumab, decidimos comparar, neste trabalho, os casos negativos juntamente com os casos reduzidos para o PTEN *versus* os casos com PTEN normal, e a resposta terapêutica. Assim, para as 51 pacientes avaliadas, 35.6% (18/51) dos casos eram negativos ou reduzidos (Tabela 2). Curiosamente 31% (16/51) dos casos apresentaram também uma coloração nuclear para o PTEN (Figura 9D).

Tabela 2. Resultados da avaliação da expressão proteica do PTEN por IHQ.

PTEN IHQ	Casos (%)	
Normal	33 (64.7)	33(64.7)
Reduzido	10 (19.6)	18(35.3)
Negativo	8 (15.7)	

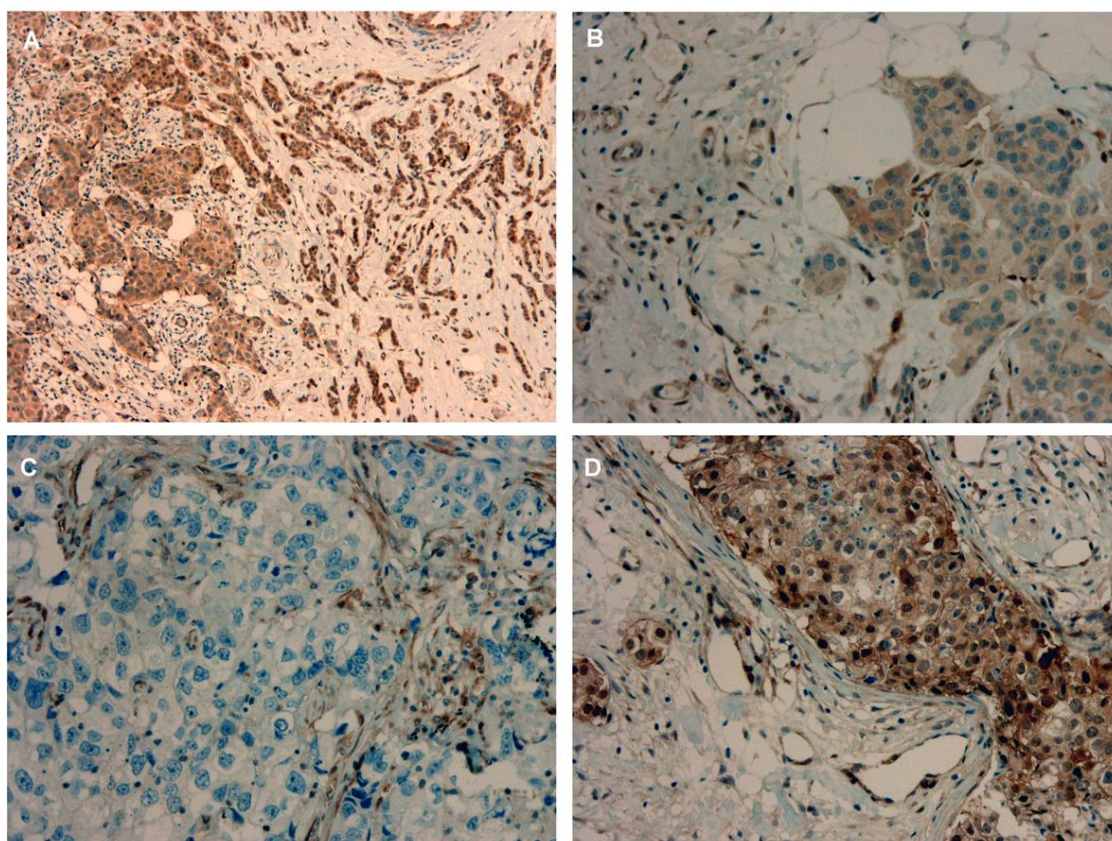


Figura 10.A. Expressão normal do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama(100X); **B)** Expressão reduzida do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama (200X); **C)** Expressão negativa do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama (200X); **D)** Expressão normal citoplasmática e expressão nuclear do PTEN por IHQ em células de carcinoma da mama (200X).

Associação entre expressão de PTEN, parâmetros clínico-patológicos, e resposta terapêutica ao Trastuzumab

Os resultados das associações que efetuamos entre a expressão de PTEN por IHQ e alguns parâmetros clínico-patológicos da série de casos de cancro da mama analisados, estão resumidos na Tabela 3. Esta análise mostra que a expressão imuno-histoquímica do PTEN não estava relacionada com o tamanho do tumor, tipo histológico e grau histológico. Embora a maior parte das pacientes apresentasse metástases ganglionares no momento do diagnóstico, devido ao facto de se tratarem de tumores agressivos, encontramos uma correlação significativa entre a ausência ou redução de expressão do PTEN e presença de metástases axilares ($p=0.06$). Não houve correlação entre expressão de PTEN e receptores hormonais, embora a maior parte dos tumores PTEN negativos tenham sido geralmente receptores hormonais negativos.

Quanto à resposta ao tratamento com Trastuzumab, verificou-se uma associação entre as doentes que não progrediram e a expressão normal do PTEN ($p=0.02$ e $p=0.045$).

Estudámos ainda a correlação entre os resultados obtidos da marcação citoplasmática por IHQ do PTEN e a marcação nuclear encontrada. Verificámos que os casos PTEN negativos e reduzidos são, na sua maioria, também negativos para a marcação nuclear (88.9%; 16/18), sendo que apenas 11.1% (2/18) tiveram marcação nuclear intensa ($p=0.021$) (Tabela 4).

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre PTEN nuclear e a maior parte dos parâmetros clínico-patológicos avaliados, nem com a resposta terapêutica ao Trastuzumab. No entanto, verificamos que existia uma associação significativa entre a ausência de expressão nuclear do PTEN e a presença de gânglios metastizados ($p=0.04$). Assim constatamos que quando existe metastização ganglionar, cerca de 76.5% (26/34) dos casos têm uma expressão nuclear negativa para o PTEN. Esta correlação está resumida na Tabela 5.

Tabela 3. Correlação entre a expressão de PTEN com os dados clinicopatológicos.

	PTEN [Negativo + Reduzido] N=18	PTEN [Normal] N=33	p
Tipo Histológico			
CDI	14 (77.8)	27 (81.9)	0.727
Non-CDI	4 (22.2)	6 (18.1)	
Tamanho do Tumor			
<2cm	3 (16.7)	12 (41.4)	0.209
>2cm e <5cm	9 (50.0)	10 (34.5)	
>5cm	6 (33.3)	7 (24.1)	
Grau Histológico			
Grau I	0 (0.0)	1 (3.1)	0.303
Grau II	8 (44.4)	8 (25.0)	
Grau III	10 (55.6)	23 (71.9)	
Gânglio Linfáticos			
Negativo	3 (16.7)	13 (41.9)	0.060
Positivo	15 (83.3)	18 (58.1)	
RE			
Negativo	10 (55.6)	12 (36.4)	0.186
Positivo	6 (37.5)	21 (63.3)	
RP			
Negativo	10 (62.5)	16 (51.6)	0.477
Positivo	6 (37.5)	15 (48.4)	
Progressão			
Sim	12 (70.6)	12 (36.4)	0.020
Não	5 (29.4)	21 (63.6)	
Estado Actual			
Vivas	13 (72.2)	24 (72.7)	0.608
Mortas	5 (27.8)	9 (27.3)	

Tabela 4. Correlação entre as expressões de PTEN citoplasmático e PTEN nuclear.

	PTEN [Negativo + Reduzido] N=18	PTEN [Normal] N=33	p
PTEN Nuclear			
Negativo	16 (88.9)	19 (57.6)	0.021
Positivo	2 (11.1)	14 (42.2)	

Tabela 5. Correlação entre a expressão de PTEN nuclear e a presença de gânglios linfáticos metastizados.

	PTEN [Nuclear Negativo] N=34	PTEN [Nuclear Positivo] N=15	p
Gânglios Linfáticos			
Negativo	8 (23.5)	8 (53.3)	0.040
Positivo	26 (76.5)	7 (46.7)	

Associação entre expressão de PTEN e a deleção do gene PTEN

Os casos que foram previamente selecionados para serem avaliados por FISH para a deleção do PTEN foram analisados num microscópio de fluorescência ZEISS, com sistema de análise e captura de imagem da Cytovision, onde se verificou a existência de deleção do *PTEN* com a colaboração de uma bióloga experiente. Nos casos considerados sem deleção (normais), foram observados dois sinais vermelhos e dois sinais verdes por núcleo. Nos casos com deleção, foi observado um sinal vermelho e dois sinais verdes por núcleo em mais de 20% das células (Yoshimoto et al. 2007) (Figura 10). Dos 11 casos que conseguimos obter leitura para o FISH, a maior parte foram considerados normais [82% (9/11)] e 18% (2/11) tiveram deleção para o PTEN. Os resultados obtidos desta avaliação estão resumidos na Tabela 6.

Tabela 6. Correlação entre a expressão Imuno-histoquímica de PTEN e a avaliação de PTEN por FISH.

	PTEN [Negativo+ Reduzido] (%)	PTEN Normal (%)	p
PTEN (FISH)			
Deleção (n=2)	22.2 (2/9)	0.0 (0/2)	0.461
Normal (n=9)	77.8 (7/9)	100.0 (2/2)	

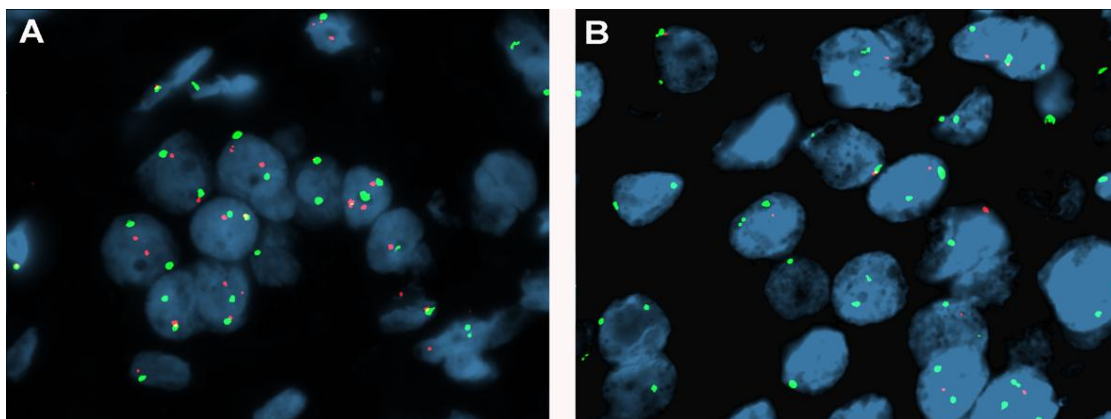


Figura 11. **A)** Ausência de deleção do PTEN (sinais vermelhos) demonstrada por FISH em células de carcinoma da mama (60X). **B)** Deleção do PTEN detectada por FISH em células de carcinoma da mama (100X).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A perda da actividade do PTEN pelas células tumorais foi sugerida como um importante mecanismo de resistência à acção do Trastuzumab no tratamento das doentes com cancro da mama. Nagata e colaboradores demonstraram, *in vitro*, que células com deficiência de PTEN sofrem menor inibição da proliferação celular quando tratadas com Trastuzumab, uma vez que não existe a fosfatase que permite a redução na fosforilação do AKT (Nahta et al. 2004). O tratamento destas células com inibidores do PI3K foi capaz de reverter a resistência ao Trastuzumab. Neste mesmo estudo, a análise tecidual de 47 pacientes portadoras de cancro de mama metastático, revelou que a perda da expressão do PTEN estava associada a menores taxas de resposta ao tratamento com Trastuzumab + Taxano. Estes resultados sugerem que a perda do PTEN pode servir como factor preditivo de resistência ao Trastuzumab e que a utilização de drogas que inibem o PI3K pode servir como alternativa terapêutica em pacientes com baixa concentração do PTEN.

Com base nestes estudos *in vitro*, o objectivo principal do nosso trabalho foi estudar e validar se a perda de expressão do PTEN em carcinomas invasivos da mama com sobre-expressão de HER2, se relacionava com resistência ao Trastuzumab, utilizando uma série de 51 tumores da mama do serviço de Anatomia Patológica do HSJ, Porto, Portugal. Todas estas doentes foram diagnosticadas com tumores que tinham amplificação do HER2 e, como tal, tinham indicação para serem tratadas com Trastuzumab num esquema neo-adjuvante (quimioterapia primária ou pré-cirurgia) ou adjuvante (pós-cirurgia), em mono ou em combinação com outras terapias. Verificámos que a maioria dos casos foram considerados normais para a expressão do PTEN, com uma coloração no citoplasma das células tumorais idêntica à coloração existente nos vasos do tecido adjacente. No entanto, verificámos expressão reduzida ou mesmo negativa em cerca de 35% dos casos, que se associou de forma significativa com a resistência ao tratamento com o Trastuzumab. De facto, verificou-se que a maioria das doentes que não progrediram tinham tumores com expressão normal do PTEN, enquanto que aquelas que recidivaram e progrediram após tratamento apresentavam maioritariamente tumores com expressão reduzida de PTEN ou com perda de expressão.

Apesar de não se ter encontrado correlação com a maioria dos parâmetros clínico-patológicos avaliados, verificou-se uma associação entre a perda ou redução da expressão de PTEN e a existência de gânglios metastizados.

Os resultados obtidos nesta série permitem-nos assim avançar que a expressão do PTEN é um parâmetro que será importante avaliar clinicamente nos tumores com sobreexpressão e/ou amplificação do oncogene HER2, uma vez que parece seleccionar e discriminar as doentes que beneficiarão da terapia com Trastuzumab.

Outros mecanismos de resistência ao Trastuzumab têm vindo a ser decritos, que necessitam também de validação em séries retrospectivas de tumores de doentes com cancro da mama HER2. O IGF-IR (receptor do “insulin-like growth factor-I”), por exemplo, é um receptor tirosina-quinase transmembranar associado a proliferação celular e à capacidade de metastatização celular, cujo aumento na expressão está relacionado com a diminuição na actividade antiproliferativa do Trastuzumab. Estudos *in vitro* demonstraram que células neoplásicas da mama com sobre-expressão de IGF-IR são resistentes ao Trastuzumab na presença do IGF-I (Lu et al. 2001). Nahta e colaboradores observaram, usando outro modelo experimental, que a presença de heterodímeros IGF-IR/HER2, em células resistentes ao Trastuzumab, induz a fosforilação do HER-2, o que não se observou em células sensíveis (Nahta et al. 2005).

O ligando IGF tinha capacidade de activar, de forma mais rápida, as vias de sinalização intracelular do PI3K e MAPK em células resistentes. A redução da expressão do p27 foi também associada à incapacidade do Trastuzumab em bloquear o ciclo celular. O tratamento com inibidores da sinalização do IGF-IR ou indutores do p27 foram capazes de restaurar a sensibilidade ao Trastuzumab (Nahta et al. 2004). Estes dados sugerem que redução da actividade do p27 está associada à resistência ao Trastuzumab, possivelmente mediada pela heterodimerização do IGF-IR com o HER2. O IGF-IR pode ser visto então como importante alvo terapêutico em pacientes resistentes ao Trastuzumab.

Um outro mecanismo potencial de resistência associado a tratamentos com anticorpos é o desenvolvimento de mecanismos que interfiram na ligação do agente terapêutico com seu alvo proteico. A expressão da glicoproteína membranar MUC4 – mucina capaz de mascarar proteínas transmembranares – está elevada em clones de

células resistentes ao Trastuzumab, e o seu nível associa-se inversamente com a capacidade de ligação do Trastuzumab a estas células, como descrito por Nagy e colaboradores. Em células de adenocarcinoma de mama, a sobre-expressão do MUC4 levou ao bloqueio da ligação do HER2 com o anticorpo específico (Nagy et al. 2005).

A inibição do reconhecimento de células neoplásicas pelo sistema imunitário, supressão da apoptose, indução da proliferação celular e metastatização são outros mecanismos sugeridos para a acção do MUC4 em células tumorais. Vale a pena reforçar o facto de que até o momento o único mecanismo de resistência demonstrado clinicamente foi a expressão da forma truncada do HER2 (p95HER2) (Scaltriti et al. 2007). Os resultados do presente trabalho vêm demonstrar que a ausência de demonstração do PTEN por imuno-histoquímica também é um mecanismo de resistência que pode ser demonstrado numa série clínica e não experimental.

Neste trabalho verificámos ainda que bastantes casos apresentavam ainda marcação intensa de PTEN a nível nuclear, que se associou significativamente com a expressão citoplasmática normal e com um melhor prognóstico. Foi demonstrado por Chung e Eng, previamente, que a localização nuclear do PTEN coincide com as fases G0/G1 do ciclo celular. Estes autores demonstraram que o PTEN no citoplasma inibe a fosforilação do Akt e activa o p27, enquanto o PTEN nuclear inibe a ciclina D1 e a fosforilação da MAPK (Chung e Eng 2005). Adicionalmente, demonstraram que enquanto o PTEN nuclear é requerido para fazer paragem do ciclo celular, o PTEN citoplasmático é requerido para induzir apoptose (Chung et al. 2006). Assim, parece-nos que a expressão nuclear-citoplasmática regula de forma diferencial o ciclo celular e a apoptose e, desta forma, evidencia que o importe nuclear do PTEN tem um papel fundamental na carcinogénese.

Um dos objectivos deste trabalho foi também padronizar a técnica manual de hibridização *in situ* com fluorescência (FISH) para detectar deleção do gene PTEN, com o intuito de introduzir esta técnica na rotina do laboratório de Anatomia Patológica da Unidade de Diagnósticos do IPATIMUP, e com o objectivo de relacionar com a expressão imuno-histoquímica da proteína PTEN. Foi possível padronizar um protocolo que contornou a maioria dos problemas de artefatos de fixação/processamento que normalmente torna crítica o resultado final da técnica. Esta técnica de FISH para

avaliação de deleções de genes é extremamente delicada e requer detalhes técnicos minuciosos, muito particularmente no que diz respeito à variação das temperaturas ao longo da técnica (digestão enzimática, desnaturação, hibridação e lavagens pós hibridação), para que o seja possível obter excelente qualidade de hibridação, excelente definição morfológica das células malignas, com marcação de tal forma específica que nos permita um diagnóstico fidedigno e sem hesitações. Esta conjugação de detalhes na maioria das vezes tem que ser feito caso a caso, para que seja possível determinar os tempos/temperaturas a adoptar para cada um, minimizando as repetições e consequentemente gastos laboratoriais.

Dos 19 casos seleccionados para FISH foi possível obter resultados satisfatórios em 11 deles. Os oito casos onde não foi possível avaliar o resultado, deveu-se à hiperdigestão dos núcleos. Em dois casos negativos/reduzidos para o PTEN foi possível detectar deleção do gene PTEN, demonstrando que este é um dos mecanismos que explica a perda de expressão. Aliás, já foi demonstrado previamente que mutações do gene PTEN, LOH e hipermetilação do promotor são os mecanismos que podem explicar a perda de expressão, e consequentemente de função, do PTEN (Dourdin et al. 2008; Goel et al. 2004; Kurose et al. 2000). Vitolo e colaboradores demonstraram que a deleção do gene PTEN promove a sinalização tumorigénica, resistência a apoptose, e resposta alterada a agentes quimioterápicos em células epiteliais da mama (Vitolo et al. 2009).

Assim, foi possível validar que a expressão de PTEN em carcinomas da mama com sobre-expressão de HER2 é um mecanismo de resistência ao tratamento com Trastuzumab. Com base neste resultado, é possível pensar que, futuramente, as drogas que inibem a via PI3K/Akt podem vir a ter um papel relevante no tratamento das doentes com tumores que sobre expressam HER2 e que têm perda ou expressão reduzida de PTEN.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

- 1) A perda ou expressão reduzida do PTEN, em casos de carcinoma da mama com sobre-expressão de HER2, relaciona-se com a progressão da doença após tratamento com Trastuzumab. Assim, a técnica de imuno-histoquímica permite classificar os casos em normais, reduzidos e negativos, e prever a taxa de resposta ao tratamento.
- 2) Foi possível efectuar a técnica de Hibridização *in situ* com Fluorescência para estudar a deleção do gene PTEN, e verificámos que alguns casos negativos/reduzidos podem ser explicados por deleção.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbott, R.T., Tripp, S., Perkins, S.L., et al. Analysis of the pi-3-kinase-pten-akt pathway in human lymphoma and leukemia using a cell line microarray. *Modern Pathology*, 2003, vol. 16 (6), p. 607-612.

Anatpat-Unicamp. (2000, 22.08.2011). Os lóbulos mamários. *Teaching website for Pathology, Neuropathology & Neuroimaging*. Adaptado e traduzido em Dezembro, 2011, de <http://anatpat.unicamp.br/Dscn5500++.jpg>.

Bánkfalvi, Á., Simon, R., Brandt, B., et al. Comparative methodological analysis of erbb-2/her-2 gene dosage, chromosomal copy number and protein overexpression in breast carcinoma tissues for diagnostic use. *Histopathology*, 2000, vol. 37 (5), p. 411-419.

Baselga, J. e Norton, L. Focus on breast cancer. *Cancer Cell*, 2002, vol. 1 (4), p. 319-322.

Braga, S., Dal Lago, L., Bernard, C., et al. Use of trastuzumab for the treatment of early stage breast cancer. *Expert Review of Anticancer Therapy*, 2006, vol. 6 (8), p. 1153-1164.

Carr, J.A., Havstad, S., Zarbo, R.J., et al. The association of her-2/neu amplification with breast cancer recurrence. *Arch Surg*, 2000, vol. 135 (12), p. 1469-1474.

Carvalho, S.T.V.S.P. *Signalling pathways in basal-like breast carcinomas: A clue on pathogenesis and therapeutical target*. Tese de Doutorado. Faculdade de Medicina, Universidade do Porto. Porto, 2010.

Chung, J.-H. e Eng, C. Nuclear-cytoplasmic partitioning of phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 (pten) differentially regulates the cell cycle and apoptosis. *Cancer Research*, 2005, vol. 65 (18), p. 8096-8100.

Chung, J.-H., Ostrowski, M.C., Romigh, T., et al. The erk1/2 pathway modulates nuclear pten-mediated cell cycle arrest by cyclin d1 transcriptional regulation. *Human Molecular Genetics*, 2006, vol. 15 (17), p. 2553-2559.

Citri, A., Harari, D., Shohat, G., et al. Hsp90 recognizes a common surface on client kinases. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, vol. 281 (20), p. 14361-14369.

Citri, A., Skaria, K.B. e Yarden, Y. The deaf and the dumb: The biology of erbb-2 and erbb-3. *Experimental Cell Research*, 2003, vol. 284 (1), p. 54-65.

Cotran, R.S., Kumar, V. e Robbins, S.T. *Patologia*. 7ª edição. Rio de Janeiro: ELSEVIER, 2005.

Depowski, P.L., Rosenthal, S.I. e Ross, J.S. Loss of expression of the pten gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer. *Modern Pathology*, 2001, vol. 14 (7), p. 672-676.

Dourdin, N., Schade, B., Lesurf, R., et al. Phosphatase and tensin homologue deleted on chromosome 10 deficiency accelerates tumor induction in a mouse model of erbb-2 mammary tumorigenesis. *Cancer Research*, 2008, vol. 68 (7), p. 2122-2131.

Elston, C. e Ellis, I. 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*, 2002, vol. 41 (3a), p. 154-161.

Ferlay, J., Autier, P., Boniol, M., et al. Estimates of the cancer incidence and mortality in europe in 2006. *Annals of Oncology*, 2007, vol. 18 (3), p. 581-592.

Filho, G.B. Capítulo da mama. In KOOGAN, G. *Patologia - bogliolo*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

Fowble, B.L., Schultz, D.J., Overmoyer, B., et al. The influence of young age on outcome in early stage breast cancer. *International Journal of Radiation Oncology Biology Physics*, 1994, vol. 30 (1), p. 23-33.

Goel, A., Arnold, C.N., Niedzwiecki, D., et al. Frequent inactivation of pten by promoter hypermethylation in microsatellite instability-high sporadic colorectal cancers. *Cancer Research*, 2004, vol. 64 (9), p. 3014-3021.

Haas, J.A., Schultz, D.J., Peterson, M.E., et al. An analysis of age and family history on outcome after breast-conservation treatment: The university of pennsylvania experience. *The cancer journal from Scientific American*, 1998, vol. 4 (5), p. 308-315.

Hall, P.S. e Cameron, D.A. Current perspective – trastuzumab. *European Journal of Cancer*, 2009, vol. 45 (1), p. 12-18.

Harris, L.N., You, F., Schnitt, S.J., et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for her2-positive early breast cancer. *Clinical Cancer Research*, 2007, vol. 13 (4), p. 1198-1207.

Jacobs, T.W., Gown, A.M., Yaziji, H., et al. Specificity of herceptest in determining her-2/neu status of breast cancers using the united states food and drug administration-approved scoring system. *Journal of Clinical Oncology*, 1999, vol. 17 (7), p. 1983.

Katz, M., Amit, I., Citri, A., et al. A reciprocal tensin-3-cten switch mediates egf-driven mammary cell migration. *Nature Cell Biology*, 2007, vol. 9 (8), p. 961-969.

Kokubo, Y., Gemma, A., Noro, R., et al. Reduction of pten protein and loss of epidermal growth factor receptor gene mutation in lung cancer with natural resistance to gefitinib (iressa). *British Journal of Cancer*, 2005, vol. 92 (9), p. 1711-1719.

Kumar, V., Abbas, A.K., Fausto, N., et al. *Archives of pathology & laboratory medicine*. 7ª edição. Philadelphia, Pa, 2005.

Kurose, K., Zhou, X.-P., Araki, T., et al. Biallelic inactivating mutations and an occult germline mutation of pten in primary cervical carcinomas. *Genes, Chromosomes and Cancer*, 2000, vol. 29 (2), p. 166-172.

Lan, K.-H., Lu, C.-H. e Yu, D.H. Mechanisms of trastuzumab resistance and their clinical implications. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 2005, vol. 1059 (1), p. 70-75.

Lu, Y., Zi, X., Zhao, Y., et al. Insulin-like growth factor-i receptor signaling and resistance to trastuzumab (herceptin). *Journal of the National Cancer Institute*, 2001, vol. 93 (24), p. 1852-1857.

Medicine, U.S.N.L.O. (2007). Pten. *Genetics Home Reference* Adaptado e traduzido em Outubro, 2011, de <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/PTEN>.

Milanezi, F., Carvalho, S. e Schmitt, F.C. Egfr/her2 in breast cancer: A biological approach for molecular diagnosis and therapy. *Expert Review of Molecular Diagnostics*, 2008, vol. 8 (4), p. 417-434.

Modi, S., Stopeck A e Ms, G. Trastuzumab and kos-953 (17aag) is feasible and active in patients with metastatic breast cancer: Preliminary results of a phase i/ii study. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2005, vol. 94 (Suppl. 1), p. S72.

Montemurro, F., Valabrega, G. e Aglietta, M. Trastuzumab-based combination therapy for breast cancer. *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, 2004, vol. 5 (1), p. 81-96.

Nagata, Y., Lan, K.-H., Zhou, X., et al. Pten activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of pten predicts trastuzumab resistance in patients. *Cancer Cell*, 2004, vol. 6 (2), p. 117-127.

Nagy, P., Friedländer, E., Tanner, M., et al. Decreased accessibility and lack of activation of erbb2 in jimt-1, a herceptin-resistant, muc4-expressing breast cancer cell line. *Cancer Research*, 2005, vol. 65 (2), p. 473-482.

Nahta, R. e Esteva, F.J. Herceptin: Mechanisms of action and resistance. *Cancer Letters*, 2006, vol. 232 (2), p. 123-138.

Nahta, R., Takahashi, T., Ueno, N.T., et al. P27(kip1) down-regulation is associated with trastuzumab resistance in breast cancer cells. *Cancer Research*, 2004, vol. 64 (11), p. 3981-3986.

Nahta, R., Yu, D., Hung, M.-C., et al. Mechanisms of disease: Understanding resistance to her2-targeted therapy in human breast cancer. *Nature Clinical Practice. Oncology.*, 2006, vol. 3 (5), p. 269-280.

Nahta, R., Yuan, L.X.H., Zhang, B., et al. Insulin-like growth factor-i receptor/human epidermal growth factor receptor 2 heterodimerization contributes to trastuzumab resistance of breast cancer cells. *Cancer Research*, 2005, vol. 65 (23), p. 11118-11128.

Park, B.H. e Davidson, N.E. Pi3 kinase activation and response to trastuzumab therapy: What's new with herceptin resistance? *Cancer Cell*, 2007, vol. 12 (4), p. 297-299.

Pérez-Tenorio, G., Alkhori, L., Olsson, B., et al. Pik3ca mutations and pten loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer *Clinical Cancer Research*, 2007, vol. 13 (12), p. 3577-3584.

Petrocelli, T. e Slingerland, J. Pten deficiency: A role in mammary carcinogenesis. *Breast Cancer Research*, 2001, vol. 3 (6), p. 356 - 360.

Piccart, M.J., Di Leo, A. e Hamilton, A. Her2: A 'predictive factor' ready to use in the daily management of breast cancer patients? *European Journal of Cancer*, 2000, vol. 36 (14), p. 1755-1761.

Razis, E., Briasoulis, E., Vrettou, E., et al. Potential value of pten in predicting cetuximab response in colorectal cancer: An exploratory study. *BMC Cancer*, 2008, vol. 8 (1), p. 234.

Reis-Filho, J.S., Pinheiro, C., Lambros, M.B.K., et al. Egfr amplification and lack of activating mutations in metaplastic breast carcinomas. *The Journal of Pathology*, 2006, vol. 209 (4), p. 445-453.

Roche Farmacêutica Química, L. (2011). Cancro da mama her2+. Adaptado e traduzido em Dezembro, 2011, de <http://www.roche.pt/files/image/her2/fig02.jpg>.

Scaltriti, M., Rojo, F., Ocaña, A., et al. Expression of p95her2, a truncated form of the her2 receptor, and response to anti-her2 therapies in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 2007, vol. 99 (8), p. 628-638.

Schiff, R., Massarweh, S., Shou, J., et al. Breast cancer endocrine resistance. *Clinical Cancer Research*, 2003, vol. 9 (1), p. 447s-454s.

Schmitt, F.C. Multistep progression from an oestrogen-dependent growth towards an autonomous growth in breast carcinogenesis. *European Journal of Cancer*, 1995, vol. 31 (12), p. 2049-2052.

Schmitt, F.C. e Andrade, L. Spectrum of carcinoembryonic antigen immunoreactivity from isolated ductal hyperplasias to atypical hyperplasias associated with infiltrating ductal breast cancer. *Journal of Clinical Pathology*, 1995, vol. 48 (1), p. 53-56.

Schmitt, F.C., Leal, C. e Lopes, C. P53 protein expression and nuclear DNA content in breast intraductal proliferations. *The Journal of Pathology*, 1995, vol. 176 (3), p. 233-241.

Schnitt, S.J. Breast cancer in the 21st century: Neu opportunities and neu challenges. *Mod Pathol*, 2001, vol. 14 (3), p. 213-218.

Sengupta, P.P., Northfelt, D.W., Gentile, F., et al. Trastuzumab-induced cardiotoxicity: Heart failure at the crossroads *Mayo Clinic Proceedings*, 2008, vol. 83 (2), p. 197-203.

Singer, C.F., Köstler, W.J. e Hudelist, G. Predicting the efficacy of trastuzumab-based therapy in breast cancer: Current standards and future strategies. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Cancer*, 2008, vol. 1786 (2), p. 105-113.

Slamon, D., Clark, G., Wong, S., et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the her-2/neu oncogene. *Science*, 1987, vol. 235 (4785), p. 177-182.

Sørli, T., Perou, C.M., Tibshirani, R., et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2001, vol. 98 (19), p. 10869-10874.

Stemmler, H.-J. e Heinemann, V. Central nervous system metastases in her-2-overexpressing metastatic breast cancer: A treatment challenge. *The Oncologist*, 2008, vol. 13 (7), p. 739-750.

Stern, D.F. Erbbs in mammary development. *Experimental Cell Research*, 2003, vol. 284 (1), p. 89-98.

Tavassoli, F.A. e Devilee, P. Tumours of the breast. In TAVASSOLI, F.A. e P. DEVILEE. *World health organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press, 2003, p. 9 -112.

Uhlenhopp, M.B. (2011). Her2 amplification/overexpression in cancer. *Medscape Oncology, Education* Adaptado e traduzido em Dezembro, 2011, de http://www.medscape.org/viewarticle/421097_4.

Verhagen, P., Van Duijn, P.W., Hermans, K.G.L., et al. The pten gene in locally progressive prostate cancer is preferentially inactivated by bi-allelic gene deletion. *The Journal of Pathology*, 2006, vol. 208 (5), p. 699-707.

Vitolo, M.I., Weiss, M.B., Szmanski, M., et al. Deletion of pten promotes tumorigenic signaling, resistance to anoikis, and altered response to chemotherapeutic agents in human mammary epithelial cells. *Cancer Research*, 2009, vol. 69 (21), p. 8275-8283.

Wolff, A.C., Hammond, M.E.H., Schwartz, J.N., et al. American society of clinical oncology/college of american pathologists guidelines/ recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, 2006, vol. 25 (1), p. 118-145.

Yoshimoto, M., Cunha, I.W., Coudry, R.A., et al. Fish analysis of 107 prostate cancers shows that pten genomic deletion is associated with poor clinical outcome. *British Journal of Cancer*, 2007, vol. 97 (5), p. 678-685.

Zhang, H., Wang, Q., Greene, M., et al. New perspectives on anti-her2/neu therapeutics. In *Drug news perspectives*. Philadelphia, USA: Prous Science, 2000, 13(6) p. 325.

ANEXOS

ANEXOS

Anexo 1: Protocolo da técnica IHQ- PTEN em sistema automático

Utilizam-se cortes de 2-3µm em lâminas adesivadas (super frost plus), após secagem na estufa a 60°C durante 30 minutos ou durante a noite na estufa a 37°C.

A – Procedimento fora do equipamento:

- 1 - Fazer o registo dos casos no sistema informático do BenchMark XT Software, imprimir uma etiqueta com o código de barras correspondente para cada lâmina (nº do exame e protocolo associado) e colar na zona esmerilhada (Ventana BenchMark USER GUIDE).
- 2- Colocar as lâminas na porta das lâminas, com o código de barras voltado para o interior do mesmo, que se encontra na parte superior do aparelho, numa gaveta por baixo dos dispensadores dos reagentes; fechar a gaveta, colocando-a assim na posição correcta.
- 3- Colocar os respectivos reagentes nos dispensadores, com o código de barras voltado para fora, no suporte apropriado, e encaixados nos respectivos pins metálicos.
- 4- Clicar “RUN”, responder às perguntas elaboradas pelo computador, indicar o número de lâminas introduzidas no aparelho, se necessário programar hora para o início ou término do programa e, clicar “START RUN”

B – Resumo do procedimento automático executado dentro do equipamento:

- 1- **Várias passagens em EZPrep, a diferentes temperaturas (75°C – 80°C), para desparafinização das lâminas;**
- 2- Incubação por dois ciclos em Reagent Buffer (RB) a 90°C, de 12 e 8 minutos respectivamente, para recuperação antigénica;
Várias passagens por Tampão RB;
- 3- Incubação com anticorpo UV INHIBTOR 4 minutos
Várias passagens por Tampão RB

4- Digestão enzimática: PROTEASE 3 (4 minutos a 37°C); sómente para alguns anticorpos de acordo com o protocolo do aparelho.

Várias passagens por Tampão RB;

5- Incubação com o respectivo Anticorpo Primário

Várias passagens por Tampão RB;

6- Incubação OPTION durante 8 minutos;

Várias passagens por Tampão RB;

7- Incubar com o anticorpo UV HRP UNIVERSAL MULT durante 8 minutos;

Várias passagens por Tampão RB;

8- Incubação em durante UV DAB+ UV DAB H2O2 8 minutos

Várias passagen por Tampão RB

9- Incubação UV COOPER durante 4 minutos

Várias passagen por Tampão RB;

10- Contraste Nuclear com Hematoxilina II durante 4 minutos;

Passagem por Tampão RB;

11- Pós-contraste com BLUING REAGENT durante 4 minutos;

Passagem por Tampão RB;

12- Retirar as lâminas do aparelho e proceder às lavagens;

- Passagem das lâminas por uma solução de água corrente e detergente das mãos para retirar o óleo de protecção LCS (Liquid Coverslip) e fazer várias passagens por água corrente para remover o detergente;

13- Desidratação com álcool a 95%, 100%, 100% e montagem das lâminas.

Anexo 2: Protocolo FISH – PTEN

• 1º Dia

1- Cortes histológicos 3/4 micras e secagem 56-60°C durante 1h

2- Desparafinização (reagentes limpos) e Hidratação.

3- Recuperação Antigénica:

- No Banho- Maria a 98°C em 1XSSC durante 15min.
Pré- aquecer a solução durante 5 min e depois introduzir as

lâminas.

Lavagem em água Bidestilada 3 min.

4- Digestão Enzimática:

- Secar as lâminas colocá-las no Hibridyzer a 37°C.
Colocar 100µl da solução de Proteinase K durante :

- Cortes histológicos - 20 min
- Biópsias - 10/15min
- Citologias - 8/10min

- Colocar uma lamela grande sobre os tecidos

- Preparação da solução de Proteinase K – QIAGEN- (PK):

3 µl da PK para 100ml 2XSSC

5- Retirar a lamela (deslizando sobre a lâmina) e lavar 2XSSC durante 5 min

6- Colocar as lâminas no Hibridyser e deixá-las secar completamente.

7- Aplicar a 10 µl da sonda ALK, colocar uma lamela de acordo com as dimensões do tecido e lutar com cola ou parafilm.

- Programa 9 do hibridyzer (16-18H)
- Preparação da sonda: 10 µl para cada lâmina

- 7 µl Tampão
- 2 µl H2O Autoclavada
- 1 µl de sonda

• **2º Dia**

- 9- Colocar uma cuvete com 2XSSC no banho – maria a 72°C (dentro da cuvete) (+/- 80°C o banho).
- 10- Retirar a cola á volta da lamela e colocar as lâminas, sem retirar a lamela, dentro de uma cuvete com 2XSSC á temperatura ambiente. Deixar ficar até a lamela sair por completo.
- 11- Colocar as laminas na cuvete a 72°C durante 2min.
- 12- Retirar do banho-maria e deixar secar completamente no escuro.
- 13- Colocar uma gota de meio de montagem DAPI (Vectashield – Mounting Medium with DAPi - H- 1200) em cada lâmina e montar com lamela GRANDE, sempre tendo a preocupação de resguardar da LUZ.
- 14- Deixar ficar no escuro durante 10/20min antes de observar ao microscópio de Fluorescência.