

Polimorfismo genético do fator de transcrição FOXP3 em pacientes com câncer de mama

FOXP3 transcription factor genetic polymorphism in breast cancer patients

Caroline Yukari Motoori Fernandes, Mayara Bocchi, Nathalia de Sousa Pereira, Glauco Akelington Freire Vitiello, Alberto Yoichi Sakaguchi, Sarah Lott Moretto, Luiz Henrique Fernandes Spolador, Matheus Dominato Munuera, Mariana de Oliveira Pinsetta, Marla Karine Amarante, Carlos Eduardo Coral de Oliveira, Bruna Karina Banin Hirata

Departamento de Ciências Patológicas, Universidade Estadual de Londrina

Endereço para correspondência:

Bruna Karina Banin Hirata

Departamento de Ciências Patológicas, CCB, Universidade Estadual de Londrina

Londrina, PR, Brasil, Rodovia Celso Garcia Cid - PR 445, Km 380, CEP 86057-970

Telefone: (43) 33715629

E-mail: bkbhirata@gmail.com

Resumo

O câncer de mama é uma das neoplasias malignas mais comuns em mulheres e é responsável por uma grande parcela de mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo. Trata-se de uma doença complexa, heterogênea, cuja evolução depende da interação tumor-hospedeiro. Atualmente, é conhecida a importância prognóstica e terapêutica dos diferentes subgrupos moleculares dentro da carcinogênese mamária. As células T reguladoras (Tregs) naturais CD4+CD25+ atuam na supressão da ativação imune, funcionando como mediadores críticos da homeostasia imune e da auto-tolerância. Entretanto, vários estudos recentes têm demonstrado que a função dessas células é também importante no controle de todas as formas de resposta imune nos contextos de inflamação, infecção, alergia, transplantes e imunidade tumoral. Um dos principais marcadores das Tregs é o fator de transcrição FOXP3 que pode ser expresso também por células malignas e atuar como um supressor tumoral de implicações prognósticas. No presente projeto, pretende-se avaliar dois polimorfismos genéticos do *FOXP3*, g.10403A>G (rs2232365) e g.8048A>C (rs3761548), através da técnica baseada na reação em cadeia da polimerase PCR-RFLP em um estudo do tipo caso-controle em 61 pacientes com tumores de mama subtipos agressivos e em 300 pacientes livres de neoplasia. Não foram observadas diferenças significativas na distribuição genotípica e dos haplótipos do polimorfismo de FOXP3 entre as pacientes com câncer de mama e as mulheres livres de neoplasia, **entretanto** a condução de outros estudos envolvendo subtipos tumorais específicos, especialmente os mais agressivos podem contribuir para a melhor a melhor compreensão do papel destes polimorfismo na patogênese do câncer de mama.

Palavras-chave: Carcinoma mamário humano, células T reguladoras, polimorfismo genético.

Abstract

Breast cancer is one of the most common malignant disease in women and is responsible for a large proportion of cancer-related deaths worldwide. It is a complex, heterogeneous disease whose evolution depends on the tumor-host interaction. Currently, the prognostic and therapeutic importance of different molecular subgroups within breast carcinogenesis is known. Natural CD4 + CD25 + regulatory T cells (Tregs) act to suppress immune activation, acting as

critical mediators of immune homeostasis and self-tolerance. However, several recent studies have shown that the function of these cells is also important in controlling all forms of immune response in the contexts of inflammation, infection, allergy, transplantation and tumor immunity. One of the major markers of Tregs is FOXP3 transcription factor which can also be expressed by malignant cells and act as a tumor suppressor of prognostic implications. The present study aimed to evaluate two FOXP3 single nucleotide polymorphisms (SNP), g.10403A>G (rs2232365) and g.8048A>C (rs3761548), by PCR-RFLP polymerase chain reaction technique in a case-control study in 61 patients with aggressive subtype breast tumors and in 300 neoplasia-free controls. No significant differences in FOXP3 polymorphism genotype and haplotype distribution were observed between breast cancer patients and controls, however, conducting other studies involving specific tumor subtypes, especially the most aggressive ones, may contribute to the better outcome. better understanding of the role of these polymorphisms in the pathogenesis of breast cancer.

Keywords: Human breast carcinoma, regulatory T cells, genetic polymorphism.

INTRODUÇÃO

No Brasil, a estimativa de diagnósticos é de 57.960 novos casos e 56,2 casos por 100.000 habitantes para o ano de 2016 ⁽¹⁾. Os tumores de mama são classificados histologicamente de acordo com o sítio de origem da neoplasia, dividindo-se em ductais e lobulares. Os ductais se desenvolvem nos ductos mamários e representam cerca de 80% dos tumores. Os lobulares desenvolvem-se no interior dos lóbulos e representam cerca de 10 a 15% dos casos. Outros subtipos raros representam menos de 10% dos casos diagnosticados por ano ⁽²⁾.

O estadiamento do tumor e o grau de diferenciação histológica são classificações bastante utilizadas na clínica e são importantes na orientação do tratamento. O sistema de estadiamento mais utilizado é o Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (TNM) de classificação dos Tumores Malignos, preconizado pela União Internacional de Controle ao Câncer (UICC), o qual se baseia na extensão anatômica da doença, considerando as características do tumor primário, nos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza, e na presença ou ausência de metástases. A avaliação desses parâmetros permite a determinação do estadiamento que varia dos estágios I ao IV ⁽³⁾.

O câncer de mama é estratificado também em subtipos moleculares, dentre eles o HER2+, os tumores mama positivo para receptores hormonais (Luminal A e B) e o câncer de mama Triplo-Negativo. O subtipo HER2+ é caracterizado por uma hiperexpressão do oncogene *HER2* (fator epidérmico humano) e negatividade para os receptores hormonais ⁽⁴⁾. A amplificação do oncogene *HER2* e, concomitante, a superexpressão de sua proteína, é atualmente implicada como um importante biomarcador de prognóstico, proporcionando a este subtipo tumoral o segundo pior prognóstico em relação aos demais ⁽⁵⁾. Isto justifica a incorporação do *status* HER2 juntamente com outros fatores prognósticos, na decisão clínica sobre prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica ⁽⁶⁾. As terapias alvo contra o HER2 são muito eficazes, tanto na forma adjuvante, quanto no contexto metastático. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que melhora as taxas de respostas, reduz a progressão da doença e aumenta a sobrevida, tanto quando utilizado isoladamente ou quando adicionado a quimioterapia ⁽⁷⁾.

A denominação dos tumores de mama positivos para receptores hormonais advém da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as

chamadas células luminais. Dentro do grupo Luminal é possível observar subgrupos com diferenças no perfil de proliferação celular e pelo menos dois grupos são persistentes, sendo eles: Luminal A e Luminal B ⁽⁴⁾.

Classificam-se como Luminais A os tumores positivos para receptores de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2. Caracterizam-se pela elevada expressão de genes representados pelas células epiteliais luminais como as citoqueratinas 7, 8, 18, e 19 ⁽⁸⁾. Em geral, esses tumores possuem baixo grau histológico e representam cerca de 60% dos carcinomas de mama. Em relação aos demais tumores apresentam o melhor prognóstico. Para o tratamento sistêmico são utilizadas terapias alvo-específicas como antiestrogênicos, tamoxifeno e inibidores de aromatase. Além disso, quando avaliado por imunohistoquímica, este subtipo deve apresentar índice da proteína Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas ⁽⁶⁾.

Já os tumores Luminais B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, que são expressos em baixos ou moderados níveis, e não raramente apresentam alto índice proliferativo. Caracterizam-se pela expressão de genes associados ao HER2 e maior número de genes de proliferação celular, o que lhe confere pior prognóstico em relação ao subtipo Luminal A. Para este subgrupo, foi proposta uma nova estratificação, em: Luminal B e Luminal HER2. O Luminal B caracteriza-se pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais e negatividade do HER2, apresentando índice de Ki-67 igual ou superior a 14%, sendo o Luminal HER2 positivo para pelo menos um dos receptores hormonais e também para o HER2 ⁽⁶⁾.

Tem sido demonstrado que os cânceres de mama podem ser classificados em subgrupos biologicamente e clinicamente significativos. Um subgrupo que tem recebido muita atenção possui fenótipo de receptor de estrógeno negativo, receptor de progesterona negativo e fator de crescimento epidérmico humano 2-negativo (não superexpresso), sendo denominado de triplo-negativo (TN) ⁽⁹⁾.

Os tumores triplo-negativos são responsáveis por 10-20% de todos os cânceres de mama, e são biologicamente mais agressivos do que outros subgrupos ⁽⁹⁾. Normalmente, demonstram alto grau histológico e são o subtipo de câncer de mama mais comum em portadores de mutação em *BRCA-1*. Este subtipo tumoral está também associado ao gene *TP53* e estudos epidemiológicos mostram uma alta prevalência entre as mulheres mais jovens e de ascendência africana ⁽¹⁰⁾.

Caracteristicamente, possuem um comportamento mais agressivo e predileção por metástase visceral, possuindo mal prognóstico ⁽¹¹⁾. Terapias personalizadas, como a terapia endócrina e anti-HER2, não são aplicáveis ao câncer de mama triplo negativo, mas apesar da falta de terapias específicas, são sensíveis a antraciclina e taxanos, porém com recidiva precoce comum ⁽¹⁰⁾.

Desta forma, estudos envolvendo cânceres de mama triplo-negativos são de fundamental importância clínica, uma vez que, segundo Dawson et al. (2009), o significado prognóstico dos tumores triplo negativo é incerto, desde que o grupo é heterogêneo ⁽¹²⁾. Portanto, para desenvolver novas estratégias contra determinados subtipos da tumorigênese mamária, é essencial entender as vias específicas que os levam a um comportamento mais agressivo ⁽⁹⁾.

Sabe-se que a patogênese do câncer é iniciada e modulada pela interação tumor-hospedeiro e que, componentes do sistema imune atuam tanto na defesa como contribuem para a progressão tumoral ⁽¹³⁾. O entendimento dessa cooperação é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e estratégias terapêuticas ⁽¹⁴⁾.

Todo carcinoma humano induz uma resposta imune em seu microambiente. Geralmente, esta reação é considerada não efetiva para destruir as células do câncer, contudo, nos últimos anos, algumas evidências têm demonstrado a importância da infiltração de células do sistema imunológico, tais como linfócitos e macrófagos ^(15, 16).

Os mecanismos que inter-relacionam os processos inflamatórios, imunidade e câncer têm sido muito discutidos. Importantes componentes nesta integração são as citocinas produzidas pelas células ativadas do sistema imune inato ou adaptativo que estimulam o crescimento tumoral e a progressão do câncer. Além disso, mediadores solúveis produzidos pelas células tumorais recrutam e ativam células inflamatórias que também estimulam a progressão. Entretanto, as células inflamatórias também podem produzir citocinas, como o IFN- γ , que limitam o crescimento do tumor ⁽¹⁷⁾.

As imunidades inata e adaptativa desempenham importantes papéis na imunovigilância e destruição tumoral ⁽¹⁸⁾. Contudo, os tumores têm a capacidade de evadir do reconhecimento imunológico, induzir disfunção das células imunes e escapar da vigilância imunológica por numerosos mecanismos ⁽¹⁹⁾, tais como diminuição de moléculas de MHC (Complexo de Histocompatibilidade Principal) tipo I e de moléculas co-estimulatórias como B7 e secreção de citocinas imunossupressoras (IL-10 e TGF β 1).

Estudos têm relatado que o infiltrado tumoral de células imunes, em particular as células T CD8+, foi correlacionado com a sobrevivência dos pacientes ⁽²⁰⁾, enquanto a presença de outras células, tais como as células T regulatórias (Treg) estão correlacionadas com um pior prognóstico ⁽²¹⁾. É conhecido que a interação quimiocinas e seus receptores auxiliam na migração de células do sistema imune ao microambiente tumoral, muitas vezes induzindo resposta imune benéfica ao crescimento ou extravazamento de células tumorais.

As células Tregs constituem uma linhagem de células T CD4+ que desempenham um papel indispensável na tolerância imunológica aos autoantígenos e na supressão de respostas imunes excessivas, consideradas deletérias ao hospedeiro. No entanto, estas células também limitam as respostas benéficas por suprimirem a imunidade antitumoral ⁽²²⁻²⁴⁾.

As células T reguladoras (Tregs) naturais CD4+CD25+ atuam na supressão da ativação imune, funcionando como mediadores críticos da homeostasia imune e da auto-tolerância ⁽²⁵⁾. Entretanto, vários estudos recentes têm demonstrado que a função dessas células é também importante no controle de todas as formas de resposta imune nos contextos de inflamação, infecção, alergia, transplantes e imunidade tumoral ⁽²⁶⁾.

A busca por um marcador específico de células Tregs em camundongos resultou na identificação do fator de transcrição FOXP3, que é expresso em células Tregs, mas não em células T recentemente ativadas. Foi mostrado que Tregs expressam especificamente FOXP3, que controla seu desenvolvimento e função ⁽²⁷⁾. Portanto, a expressão de FOXP3 pode ser usada como um marcador molecular específico para células Tregs CD4+CD25+ ⁽²⁸⁾.

A expressão por imunohistoquímica da proteína FOXP3, tanto das células do próprio tumor quanto de infiltrados mononucleares/Tregs-FOXP3 positivos tem sido associada ao prognóstico de mama, levantando a possibilidade de este gene ser um marcador promissor dentro da patogênese mamária.

A maioria das células T CD4+ reguladoras é normalmente caracterizada por uma elevada expressão do receptor de superfície da interleucina 2 (IL -2) cadeia α (CD25) e seu fenótipo é geralmente aceito como CD4+CD25hiCTLA4+GITR+FOXP3+CD45RO+CD45RA-CD69 ^(29, 30). FOX (forkheadbox) agora é usado como o símbolo para todos os fatores de transcrição forkhead dos cordados. A análise filogenética resultou na definição de 15 classes para todas as proteínas FOX conhecidas,

assim estes fatores de transcrição são classificados em termos de estrutura e não de função. O FOXP3 (fator de transcrição forkhead box P3) é um membro da família de fator de transcrição forkhead winged-hélice e possui três domínios funcionais: um domínio zinc-finger C2H2 (aminoácidos 200-223), um domínio zíper-leucina (aminoácidos 240-261) e um domínio carboxi-terminal forkhead (aminoácidos 338-421). As análises das respectivas sequências revelaram que essas três regiões não-codificadoras altamente conservadas estão sujeitas a modificações epigenéticas e estão envolvidas na regulação da transcrição do FOXP3⁽³¹⁾.

O FOXP3 foi identificado em 2001 como o causador de uma doença em murinos *scurfy*, que desenvolvem autoimunidade grave espontaneamente e/ou inflamação, como resultado de uma mutação de base única no cromossomo X⁽³²⁾. O tamanho completo do *FOXP3* humano é de 1296 pb e foi relatado que consiste em 11 exons. Este gene situa-se no braço curto do cromossomo X (Xp11.23), o qual está sujeito à inativação cromossômica, e codifica uma proteína de 431 aminoácidos⁽³³⁻³⁶⁾.

Tem sido descritos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em várias regiões do gene *FOXP3*, tais como região promotora, intrônica ou não codificante e exônica ou codificante⁽³⁷⁾. O FOXP3 pode ser alvo de modificações funcionais ou quantitativas em virtude de polimorfismos, e trabalhos do tipo caso-controle envolvendo estes polimorfismos, principalmente em doenças autoimunes e cânceres têm sido desenvolvidos^(37, 38). Dentre os diferentes polimorfismos genéticos descritos em regiões reguladoras do gene, os polimorfismos g.10403A>G (rs2232365) e g.8048A>C (rs3761548) estão localizados no intron-1 do gene *FOXP3* e tem sido associados com doenças auto-imunes, tais como vitiligo^(39, 40) e psoríase^(41, 42), evidenciando sua importância no funcionamento de células Tregs. Além disso, o polimorfismo g.8048A>C também tem sido associado com diferentes tipos de cânceres, dentre eles, colorretal⁽⁴³⁾, pulmão, hepatocelular⁽⁴⁴⁾ e mama⁽⁴⁵⁾. De acordo com um trabalho desenvolvido por Shen et al. (2010)⁽⁴¹⁾, a troca do alelo C para o A no polimorfismo g.8048A>C causa a perda do sítio de ligação de fatores de transcrição, como E47 e c-Myb, diminuindo desse modo a transcrição do gene *FOXP3*⁽⁴¹⁾. Já o segundo polimorfismo parece consistir em um sítio de ligação para o fator de transcrição GATA-3, o qual se liga somente na presença do alelo A⁽⁴⁶⁾. Wang et al. (2011)⁽⁴⁷⁾ desenvolveu um estudo no qual sugere que a combinação de GATA-3 e do próprio *FOXP3* são indispensáveis para a expressão de FOXP3. Dessa forma, o polimorfismo g.10403A>G também pode ter um papel na regulação transcricional desse gene.

Sabe-se que o FOXP3 é um forte candidato a gene supressor tumoral no câncer de mama, por outro lado quando expresso em células T regulatórias pode estar relacionado à evasão tumoral do sistema imunológico. Nesse contexto, o presente estudo objetivou investigar a influência de dois polimorfismos intrônicos de FOXP3, g.10403A> G (rs2232365) e g.8048A> C (rs3761548) em amostras de câncer de mama, enfocando subtipos agressivos.

Sabendo-se que o câncer de mama é um tumor de alta incidência e relevância clínica no Brasil e no mundo, e frente à crescente importância dos subtipos moleculares de tumores mamários, que carecem de terapia específica e efetiva, e ao fato de muitas das pacientes evoluírem rapidamente para um quadro de recidiva local e metástase a distância, nosso Laboratório de pesquisa tem desenvolvido projetos que incluem a análise de diferentes marcadores moleculares em pacientes portadoras de tumores de mama, incluindo aqueles que pertencem a subtipos moleculares específicos como os tumores triplo-negativos, basalóides e HER+. Adicionalmente, cada vez mais, sabe-se que os medicamentos devem ser adequados ao perfil genético de cada paciente, e alterações no metabolismo e eliminação de compostos como quimioterápicos e drogas

alvo, podem influenciar muito o resultado final do tratamento de um paciente com câncer.

Sendo assim, o objetivo deste estudo foi avaliar o polimorfismo genético do fator de transcrição FOXP3 em pacientes com câncer de mama e controles livres de neoplasia e correlacionar os polimorfismos genéticos com dados clínico patológicos das pacientes. Procurou-se avaliar também o polimorfismo genético para o *FOXP3* em pacientes e doadoras saudáveis e verificar se existe associação entre os subtipos moleculares e genótipos FOXP3.

MATERIAL E MÉTODOS

Aspectos Éticos e de Biossegurança

Este projeto foi cadastrado na Plataforma Brasil e foi aprovado pelo comitê de Ética da Universidade Estadual de Londrina, CAAE No. 1712311340005231, CEP/UEL 189/2013. Todos os indivíduos do estudo receberam um código após assinarem o termo de consentimento. O “Laboratório de Estudos e Aplicações de Polimorfismos de DNA” da Universidade Estadual de Londrina, bem como o Laboratório de Patologia do Hospital de Câncer de Londrina, estão dentro das normas de Biossegurança.

Seleção e caracterização das amostras

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas de pacientes atendidas Hospital do Câncer de Londrina, Londrina, Paraná, Brasil (CHL) e incluíram: sangue periférico (5 mL), coletado com EDTA como anticoagulante, para análise de polimorfismos. No presente estudo foram obtidas 61 amostras, dos quais 19 foram diagnosticadas como Luminal B HER2+ (LB), 15 como HER2+ e 27 como subtipo TN. Para o grupo controle, foram coletadas 300 amostras de sangue de mulheres assistidas na Unidade Básica de Saúde de Londrina e como critério de inclusão foram selecionadas doadoras sem história de neoplasia de mama atual ou anterior, de acordo com exame clínico e mamografias atualizadas para o momento da coleta e nem histórico de câncer de mama na família. Como parâmetro de pareamento, as amostras controles foram ainda coletadas na mesma região (Londrina/PR).

Dados referentes aos parâmetros prognósticos e subgrupos imuno-histoquímicos do câncer de mama foram gentilmente cedidos pelo CHL. Os parâmetros incluíram: tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos, índice de proliferação Ki67, grau histológico, receptores hormonais, superexpressão de HER2 e estadiamento TNM (classificação Tumor / Nódulo / Metástase), que foram determinados de acordo com os critérios de classificação da União Internacional de Controle ao Câncer⁽⁴⁸⁾.

Obtenção de sangue periférico

Amostras do sangue periférico (5 mL) foram coletados em EDTA, e o DNA genômico foi extraído a partir de 200 µL de sangue periférico total pelo Kit de Extração Mini Spin Plus (BioPur, Curitiba, Paraná, BR) de acordo com as instruções do fabricante. As amostras de DNA passaram por quantificação por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (ThermoScientific, Wilmington, Delaware, EUA) nos comprimentos de onda 260/280nm e posteriormente armazenadas a 20°C.

Análise dos polimorfismos genéticos de FOXP3

A reação em cadeia da polimerase (PCR) seguida de restrição enzimática (PCR-RLFP) foi realizada para genotipar os SNPs rs2232365 e rs3761548, que também são denominados g.10403A>G e g.8048A>C, respectivamente, de acordo com o GenBank Accession Number NG_007392.1

Aproximadamente 100 ng de DNA foram amplificados com *primers* específicos para os dois polimorfismos propostos de FOXP3 g.10403A>G (rs2232365) e g.8048A>C (rs3761548), sintetizados de acordo com Paradowska-Gorycka et al. (2015)⁽⁴⁹⁾ e He et al. (2013)⁽⁵⁰⁾, respectivamente.

As reações de amplificação foram realizadas em um volume final de 25µl com 0,1mM de dNTP; 0,2µM de cada iniciador; 0,8mM de MgCl₂; Tampão 1x (20mM de Tris-HCl ph 8,5; 50mM de KCl), albumina sérica bovina 0,8x e 1,25U de Taq polimerase (Invitrogen, Carlsbad, EUA). Sem exceção todas as reações foram realizados controles negativos para certificar a ausência de contaminação. Os ciclos de PCR foram iguais para os dois polimorfismos, com exceção da temperatura de anelamento que foi de 59°C para o polimorfismo g.10403A>G e de 65°C para o polimorfismo g.8048A>C. O ciclo foi constituído de uma etapa de desnaturação de 5 minutos a 94°C, seguida de 35 ciclos de 94°C por 45 segundos, 59°C ou 65°C por 45 segundos e 72°C por 45 segundos, com extensão final de 10 minutos a 72°C.

Os produtos de PCR (5µl) de g.10403A>G foram submetidos a digestão enzimática durante 12 horas a 55°C com 1 unidade/reação de enzima de restrição BsmBI (New England Biolabs, Beverly, EUA), e os produtos de PCR (6µl) de g.8048A>C foram digeridos durante 12 horas a 37°C com 2 unidades/reação de enzima de restrição PstI (New England Biolabs, Beverly, EUA). Os produtos foram analisados em gel de poliacrilamida (10%), corados com nitrato de prata (AgNO₃). Iniciadores específicos, produtos de PCR e os fragmentos de restrição estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1. Sequências de iniciadores oligonucleotídicos, tamanhos de fragmentos e produtos de restrição de g.10403A>G (rs2232365) e g8048A>C (rs3761548) dos polimorfismos genéticos.

Gene	GenBank	Temperatura Anelamento	Iniciador	Sequência
	Acession Number			
FOXP3 (rs2232365)	NC_000023.11	59°C	<i>Forward</i>	5' AGGAGAAGGAGTGGGCAT TT 3'
			<i>Reverse</i>	5' TGTGAGTGGAGGAGCTGAGG 3'
FOXP3 (rs3761548)	NC_000023.11	65°C	<i>Forward</i>	5' GGCAGAGTTGAAATCCAAGC 3'
			<i>Reverse</i>	5' CAACGTGTGAGAAGGCAGAA 3'

Análise de haplótipos

Os haplótipos de *FOXP3* foram determinados com base nos genótipos de todos os participantes do estudo, utilizando o *software* PHASE versão 2.1.1^(51, 52). O teste de permutação também foi realizado, usando o mesmo *software*, para verificar as diferenças na distribuição de haplótipos entre os controles e os subtipos de câncer de mama.

Análise Estatística

Análises de regressão logística binária foram conduzidas para investigar associações entre polimorfismos ou estruturas de haplótipos e câncer de mama,

controlados por idade. As associações foram testadas considerando modelos genotípicos (heterozigotos ou homozigotos variantes *versus* homozigotos selvagens), modelo dominante (heterozigotos e homozigotos variantes *versus* homozigotos selvagens) e modelo recessivo (homozigotos variantes *versus* homozigotos selvagens e heterozigotos). Correlação entre os polimorfismos ou haplótipos e parâmetros clínicos foram avaliadas pelo teste tau-b de Kendall. Todas as análises estatísticas foram realizadas no *software* SPSS versão 22.0 (SPSS Inc., Chicago, EUA), bicaudais e com nível de significância de 5%.

RESULTADOS

A idade dos pacientes envolvidos no presente estudo variou de 31 a 99 anos, com média de 54 (\pm 10,9) anos. A maioria dos pacientes apresentou carcinoma ductal invasivo (95,1%). O tamanho tumoral médio foi de 3 cm, os tumores TN apresentaram o maior tamanho (3,5 cm). Os parâmetros prognósticos em pacientes com câncer de mama na amostragem geral e divididos por subtipos são mostrados na Tabela 2, com exceção de alguns parâmetros que não estavam disponíveis.

Tabela 2. Caracterização dos dados clinicopatológicos na amostragem total de pacientes com câncer de mama e em subtipos agressivos.

Dados clinicopatológicos		Amostra	Luminal B	HER2- superexpresso	Triplo Negativo
		Total	HER2+		
Tamanho do tumor (n=59)	≤ 3,0 cm	33 (55,9%)	14 (73,7%)	9 (69,2%)	10 (37%)
	> 3,0 cm	26 (44,1%)	5 (26,3%)	4 (30,8%)	17 (63%)
Estádio TNM (n=59)	I e II	36 (61%)	11 (64,7%)	10 (66,7%)	15 (55,6%)
	III e IV	23 (39%)	6 (35,3%)	5 (33,3%)	12 (44,4%)
Grau Histopatológico (n=57)	II	17 (29,8%)	7 (36,8%)	4 (36,4%)	6 (22,2%)
	III	40 (70,2%)	12 (63,2%)	7 (63,6%)	21 (77,8%)
Ki-67 (n=55)	Baixo	4 (7,3%)	3 (18,8%)	0 (0%)	1 (3,7%)
	Moderado	17 (30,9%)	6 (37,5%)	5 (41,7%)	6 (22,2%)
Acometimento de linfonodos (n=58)	Alto	34 (61,8%)	7 (43,7%)	7 (58,3%)	20 (74,1%)
	Sim	29 (50%)	9 (50%)	9 (64,3%)	11 (42,3%)
	Não	29 (50%)	9 (50%)	5 (35,7%)	15 (57,7%)

TNM: Sistema Tumor-Nódulo-Metástase

Os genótipos predominantes de g.10403A> G e g.8048A> C na amostra total de

câncer de mama foram AG (44,3%) e CC (49,2%), respectivamente, e o menos frequente foi o genótipo AA para ambos polimorfismos, com 24,6% em g.10403A> G e 11,5% em g.8048A> C. As frequências de diferentes haplótipos de *FOXP3* para amostragem total e subtipos de câncer de mama foram determinados e são mostrados na Tabela 3. O haplótipo mais frequente em todos os grupos foi o CA e o menos frequente foi o AA.

Tabela 3. Frequência dos haplótipos dos polimorfismos de *FOXP3* na amostra total e nos subtipos agressivos de câncer de mama.

Haplótipos	Amostra Total	LB	HER2+	TN
AC	56 (45.9%)	16 (42.1%)	12 (40%)	28 (51.9%)
AA	1 (0.8%)	1 (2.6%)	0 (0%)	0 (0%)
GC	26 (21.3%)	8 (21.1%)	6 (20%)	12 (22.2%)
GA	39 (32%)	13 (34.2%)	12 (40%)	14 (25.9%)
Total	122 (100.0%)	38 (100.0%)	30 (100.0%)	54 (100.0%)

LB: Luminal B com superexpressão de HER2; HER2+: HER2-superexpresso; TN: triplo-negativo.

Não foram observadas diferenças significativas na distribuição genotípica e dos haplótipos dos polimorfismos de *FOXP3* entre as pacientes com câncer de mama e as mulheres livres de neoplasia, e portanto o estudo caso-controle demonstrou ausência de associação destes polimorfismos genéticos com a susceptibilidade ao câncer de mama. (Tabela 4).

Tabela 4. Estudo de associação caso-controle dos polimorfismos rs2232365 e rs3761548 do gene *FOXP3* no câncer de mama.

	Genótipo	Controle n= 300	Pacientes n=61	OR	IC95%	Valor de p
rs2232365	GG	47 (15,7%)	19 (31,2%)	1	---	---
	AG	147 (49,0%)	27 (44,3%)	1,02	0,54 – 1,94	1,00
	AA	106 (35,3%)	15 (24,6%)	0,79	0,38 – 1,64	0,58
	GA+AA	253 (84,3%)	42 (68,9%)	0,93	0,51 – 1,67	0,88
rs3761548	CC	127 (42,3%)	30 (49,2%)	1	---	---
	CA	132 (44,0%)	24 (39,3%)	0,77	0,42 – 1,39	0,45
	AA	41 (13,7%)	7 (11,5%)	0,72	0,29 – 1,77	0,53
	CA+AA	173 (57,7%)	31 (50,8%)	0,76	0,43 – 1,32	0,33

*Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. OR: Odds ratio; IC: intervalo de confiança

A análise considerando os parâmetros clínicos não mostrou nenhuma correlação significativa entre os polimorfismos de *FOXP3* g.10403A> G e g.8048A> C, como evidencia a Tabela 5.

Tabela 5. Análise de correlação dos polimorfismos de *FOXP3* g.10403A> G e g.8048A> C com parâmetros prognósticos em amostras de câncer de mama.

Parâmetros prognósticos		g.10403A>G			g.8048A>C		
		GG	AG	AA	CC	AC	AA
Tamanho do tumor (n=59)	< 3.0 cm	5	10	6	11	7	3
	>3.0 cm	14	15	9	17	17	4
		p=0,37 τ =-0,11			p=0,74 τ =0,042		
Estádio TNM (n=59)	I - II	11	14	11	19	12	5
	III - IV	8	12	3	10	11	2
		p=0,27 τ =-0,13			p=0,69 τ =0,050		
Grau histopatológico (n=60)	II	6	6	5	8	6	3
	III	13	20	10	21	18	4
		p=0,98 τ =-0,003			p=0,71 τ =-0,049		
Ki-67 (n=55)	Baixo	1	2	1	2	2	0
	Moderado	5	8	4	9	7	1
	Alto	11	15	8	14	14	6
		p=0,82 τ =-0,029			p=0,23 τ =0,142		
Acometimento de linfonodos (n=58)	Não	8	13	8	14	13	2
	Sim	10	12	7	15	9	5
		p=0,60 τ =-0,066			p=0,88 τ =0,020		

TNM: Sistema Tumor-Nódulo-Metástase

DISCUSSÃO

No presente estudo, analisamos os polimorfismos g.10403A> G e g.8048A> C, em 61 pacientes diagnosticadas com câncer de mama e em 300 controles livres de neoplasia.

Nenhuma associação foi encontrada entre g.8048A> C em relação à susceptibilidade ao câncer de mama. Observações semelhantes foram feitas por Raskin et al. (2009)⁽⁵³⁾ na população israelense, Zheng et al. (2013)⁽⁵⁴⁾ na população chinesa e por Jahan et al. (2014)⁽⁵⁵⁾ na população indiana. Além disso, uma metanálise realizada por Jiang e Ruan (2014)⁽⁴⁴⁾ indicou que g.8048A> C não está associado a carcinoma mamário, mas com a suscetibilidade ao carcinoma hepatocelular e câncer de pulmão.

Como discutido anteriormente, o alelo G pode estar relacionado à menor expressão de FOXP3 devido ao local de ligação perdido ao GATA-3. Muitos estudos mostraram que, no câncer de mama, o FOXP3 poderia ser considerado um gene supressor de tumor, conferindo um melhor prognóstico^(56, 57).

Como o genótipo g.10403A> G GG, o g.8048A>C AA também parece estar relacionado à menor expressão do FOXP3. Shen et al. (2010)⁽⁴¹⁾ observaram que pacientes com psoríase com o genótipo AA g.8048A> C apresentaram redução na expressão do gene FOXP3. Esses autores demonstraram que a alteração de C para A causa perda de ligação aos fatores de transcrição E47 e c-Myb, levando a uma transcrição defeituosa do gene FOXP3.

Além disso, Jahan et al. (2013)⁽³⁹⁾ observaram uma associação altamente significativa do genótipo AA g.8048A> C com estágios avançados da carcinogênese mamária (III e IV). No presente estudo não foi encontrada correlação com o estágio tumoral, provavelmente tal resultado discrepante seja devido aos subtipos de câncer de mama estudados. Esses autores não estratificaram a amostra de câncer de mama e, provavelmente, incluíram subtipos de melhor prognóstico, como o Luminal A e o Luminal B HER2-, diferentemente do presente estudo, que incluiu apenas subtipos agressivos de câncer de mama.

Apesar de nenhum resultado significativo, como a expressão do FOXP3 era anteriormente relacionada com os parâmetros clínicos do câncer de mama, o haplótipo de câncer de mama do gene pode ser um futuro candidato a marcador prognóstico para esta doença.

O presente estudo demonstrou ausência de associação dos polimorfismos genéticos de FOXP3 com a susceptibilidade ao câncer de mama, bem como ausência de correlação com os dados clinicopatológicos da doença. É importante ressaltar, no entanto, que os tumores mamários são complexos e heterogêneos, desta forma outros mecanismos, além do polimorfismo genético, podem estar relacionados à regulação da expressão gênica de FOXP3, o que pode ter criado um viés na determinação da influência deste polimorfismo no desenvolvimento e prognóstico do tumor mamário. Portanto, a condução de outros estudos envolvendo subtipos tumorais específicos, especialmente os mais agressivos, incluindo análises haplotípicas, podem contribuir para a melhor a melhor compreensão do papel destes polimorfismo na patogênese do câncer de mama.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. INCA. Estimativa 2016 Incidência de Câncer no Brasil. In: Saúde Md, editor. 2015.
2. Vargo-Gogola T, Rosen JM. Modelling breast cancer: one size does not fit all. *Nature Reviews Cancer*, 7: 659, 2007.
3. Sobin LH, Wittekind CH. TNM Classification of Malignant Tumours. Nova Iorque: John Wiley & Sons; 2002.
4. Soares FA, Andrade VP. Classificação Molecular do Câncer de Mama. **Boletim da Associação Brasileira de Mastologia Regional de São Paulo**, São Paulo, v. XV, n. 97, p. 2-5, jan. 2012.
5. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Borresen-Dale AL. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics*, 7: 127, 2006.
6. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *Journal of clinical oncology*, 28: 1684-1691, 2010.
7. Constantinidou A, Smith I. Is there a case for anti-HER2 therapy without chemotherapy in early breast cancer? *The Breast*, 20: S158-S161, 2011.
8. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, Hastie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Thorsen T, Quist H, Matese JC, Brown PO, Botstein D, Lonning PE, Borresen-Dale AL. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98: 10869-10874, 2001.
9. Kurebayashi J. Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics. *Breast cancer*, 16: 275-280, 2009.
10. Carotenuto P, Roma C, Rachiglio AM, Botti G, D'Alessio A, Normanno N. Triple negative breast cancer: from molecular portrait to therapeutic intervention. *Critical reviews in eukaryotic gene expression*, 20: 17-34, 2010.
11. Maegawa RO, Tang SC. Triple-negative breast cancer: unique biology and its management. *Cancer investigation*, 28: 878-883, 2010.
12. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *European journal of cancer*, 45 Suppl 1: 27-40, 2009.
13. Yaqub S, Aandahl EM. Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis. *Critical reviews in oncogenesis*, 15: 43-63, 2009.
14. Fridman WH, Galon J, Dieu-Nosjean MC, Cremer I, Fisson S, Damotte D, Pages F, Tartour E, Sautes-Fridman C. Immune infiltration in human cancer: prognostic

significance and disease control. *Current topics in microbiology and immunology*, 344: 1-24, 2011.

15. de la Cruz-Merino L, Barco-Sanchez A, Henao Carrasco F, Nogales Fernandez E, Vallejo Benitez A, Brugal Molina J, Martinez Peinado A, Grueso Lopez A, Ruiz Borrego M, Codes Manuel de Villena M, Sanchez-Margalet V, Nieto-Garcia A, Alba Conejo E, Casares Lagar N, Ibanez Martinez J. New insights into the role of the immune microenvironment in breast carcinoma. *Clinical & developmental immunology*, 2013: 785317, 2013.

16. Ostrand-Rosenberg S, Sinha P. Myeloid-derived suppressor cells: linking inflammation and cancer. *J Immunol*, 182: 4499-4506, 2009.

17. Lin WW, Karin M. A cytokine-mediated link between innate immunity, inflammation, and cancer. *The Journal of clinical investigation*, 117: 1175-1183, 2007.

18. Wang RF. Regulatory T cells and innate immune regulation in tumor immunity. *Springer seminars in immunopathology*, 28: 17-23, 2006.

19. Whiteside TL. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. *Oncogene*, 27: 5904-5912, 2008.

20. Sato E, Olson SH, Ahn J, Bundy B, Nishikawa H, Qian F, Jungbluth AA, Frosina D, Gnjjatic S, Ambrosone C, Kepner J, Odunsi T, Ritter G, Lele S, Chen YT, Ohtani H, Old LJ, Odunsi K. Intraepithelial CD8⁺ tumor-infiltrating lymphocytes and a high CD8⁺/regulatory T cell ratio are associated with favorable prognosis in ovarian cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 102: 18538-18543, 2005.

21. Curiel TJ, Coukos G, Zou L, Alvarez X, Cheng P, Mottram P, Evdemon-Hogan M, Conejo-Garcia JR, Zhang L, Burow M, Zhu Y, Wei S, Kryczek I, Daniel B, Gordon A, Myers L, Lackner A, Disis ML, Knutson KL, Chen L, Zou W. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nature medicine*, 10: 942-949, 2004.

22. Sakaguchi S, Yamaguchi T, Nomura T, Ono M. Regulatory T cells and immune tolerance. *Cell*, 133: 775-787, 2008.

23. Toker A, Huehn J. To be or not to be a Treg cell: lineage decisions controlled by epigenetic mechanisms. *Science signaling*, 4: pe4, 2011.

24. Vignali DA, Collison LW, Workman CJ. How regulatory T cells work. *Nature reviews Immunology*, 8: 523-532, 2008.

25. Fontenot JD, Rudensky AY. A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3. *Nature immunology*, 6: 331-337, 2005.

26. Hori S, Sakaguchi S. Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells. *Microbes and infection*, 6: 745-751, 2004.

27. Fontenot JD, Gavin MA, Rudensky AY. Foxp3 programs the development and function of CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. *Nature immunology*, 4: 330-336, 2003.
28. Kronenberg M, Rudensky A. Regulation of immunity by self-reactive T cells. *Nature*, 435: 598-604, 2005.
29. Betts GJ, Clarke SL, Richards HE, Godkin AJ, Gallimore AM. Regulating the immune response to tumours. *Advanced drug delivery reviews*, 58: 948-961, 2006.
30. Sakaguchi S. Naturally arising Foxp3-expressing CD25⁺CD4⁺ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self. *Nature immunology*, 6: 345-352, 2005.
31. Huehn J, Polansky JK, Hamann A. Epigenetic control of FOXP3 expression: the key to a stable regulatory T-cell lineage? *Nature reviews Immunology*, 9: 83-89, 2009.
32. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepfer B, Clark LB, Yasayko SA, Wilkinson JE, Galas D, Ziegler SF, Ramsdell F. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nature genetics*, 27: 68-73, 2001.
33. Ban Y, Tozaki T, Tobe T, Jacobson EM, Concepcion ES, Tomer Y. The regulatory T cell gene FOXP3 and genetic susceptibility to thyroid autoimmunity: an association analysis in Caucasian and Japanese cohorts. *Journal of autoimmunity*, 28: 201-207, 2007.
34. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3. *Immunity*, 22: 329-341, 2005.
35. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Current opinion in rheumatology*, 15: 430-435, 2003.
36. Torgerson TR, Ochs HD. Regulatory T cells in primary immunodeficiency diseases. *Current opinion in allergy and clinical immunology*, 7: 515-521, 2007.
37. Oda JM, Hirata BK, Guembarovski RL, Watanabe MA. Genetic polymorphism in FOXP3 gene: imbalance in regulatory T-cell role and development of human diseases. *Journal of genetics*, 92: 163-171, 2013.
38. Gao L, Li K, Li F, Li H, Liu L, Wang L, Zhang Z, Gao T, Liu Y. Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients. *Journal of dermatological science*, 57: 51-56, 2010.
39. Jahan P, Cheruvu R, Tippisetty S, Komaravalli PL, Valluri V, Ishaq M. Association of FOXP3 (rs3761548) promoter polymorphism with nondermatomal vitiligo: A study from India. *Journal of the American Academy of Dermatology*, 69: 262-266, 2013.

40. Song P, Wang XW, Li HX, Li K, Liu L, Wei C, Jian Z, Yi XL, Li Q, Wang G, Li CY, Gao TW. Association between FOXP3 polymorphisms and vitiligo in a Han Chinese population. *British Journal of Dermatology*, 169: 571-578, 2013.
41. Shen Z, Chen L, Hao F, Wang G, Fan P, Liu Y. Retraction: Intron-1 rs3761548 is related to the defective transcription of Foxp3 in psoriasis through abrogating E47/c-Myb binding. *J Cell Mol Med*, 14: 226-226, 2010.
42. Song QH, Shen Z, Xing XJ, Yin R, Wu YZ, You Y, Guo H, Chen L, Hao F, Bai Y. An association study of single nucleotide polymorphisms of the FOXP3 intron-1 and the risk of Psoriasis vulgaris. *Indian journal of biochemistry & biophysics*, 49: 25-35, 2012.
43. Tang Y, Cheng Y, Martinka M, Ong CJ, Li G. Prognostic significance of KAI1/CD82 in human melanoma and its role in cell migration and invasion through the regulation of ING4. *Carcinogenesis*, 35: 86-95, 2013.
44. Jiang L-L, Ruan L-W. Association between FOXP3 promoter polymorphisms and cancer risk: A meta-analysis. *Oncol Lett*, 8: 2795-2799, 2014.
45. Lopes LF, Guembarovski RL, Guembarovski AL, Kishima MO, Campos CZ, Oda JM, Ariza CB, de Oliveira KB, Borelli SD, Watanabe MA. FOXP3 transcription factor: a candidate marker for susceptibility and prognosis in triple negative breast cancer. *BioMed research international*, 2014: 341654, 2014.
46. Wu Z, You Z, Zhang C, Li Z, Su X, Zhang X, Li Y. Association between Functional Polymorphisms of Foxp3 Gene and the Occurrence of Unexplained Recurrent Spontaneous Abortion in a Chinese Han Population. *Clinical & developmental immunology*, 2012: 896458, 2012.
47. Wang Y, Su MA, Wan YY. An essential role of the transcription factor GATA-3 for the function of regulatory T cells. *Immunity*, 35: 337-348, 2011.
48. Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. TNM classification of malignant tumours. Nova Iorque: John Wiley & Sons; 2009.
49. Paradowska-Gorycka A, Jurkowska M, Felis-Giemza A, Romanowska-Prochnicka K, Manczak M, Maslinski S, Olesinska M. Genetic polymorphisms of Foxp3 in patients with rheumatoid arthritis. *The Journal of rheumatology*, 42: 170-180, 2015.
50. He YQ, Bo Q, Yong W, Qiu ZX, Li YL, Li WM. FoxP3 genetic variants and risk of non-small cell lung cancer in the Chinese Han population. *Gene*, 531: 422-425, 2013.
51. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P. A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *American journal of human genetics*, 68: 978-989, 2001.
52. Stephens M, Scheet P. Accounting for decay of linkage disequilibrium in haplotype inference and missing-data imputation. *American journal of human genetics*, 76: 449-462, 2005.

53. Raskin L, Rennert G, Gruber SB. FOXP3 germline polymorphisms are not associated with risk of breast cancer. *Cancer Genetics and Cytogenetics*, 190: 40-42, 2009.
54. Zheng J, Deng J, Jiang L, Yang L, You Y, Hu M, Li N, Wu H, Li W, Li H, Lu J, Zhou Y. Heterozygous genetic variations of FOXP3 in Xp11.23 elevate breast cancer risk in Chinese population via skewed X-chromosome inactivation. *Human Mutation*, 34: 619-628, 2013.
55. Jahan P, Ramachander VR, Maruthi G, Nalini S, Latha KP, Murthy TS. Foxp3 promoter polymorphism (rs3761548) in breast cancer progression: a study from India. *Tumour biology : the journal of the International Society for Oncodevelopmental Biology and Medicine*, 35: 3785-3791, 2014.
56. Douglass S, Meeson AP, Overbeck-Zubrzycka D, Brain JG, Bennett MR, Lamb CA, Lennard TWJ, Browell D, Ali S, Kirby JA. Breast cancer metastasis: demonstration that FOXP3 regulates CXCR4 expression and the response to CXCL12. *The Journal of Pathology*, 234: 74-85, 2014.
57. Zhang C, Xu Y, Hao Q, Wang S, Li H, Li J, Gao Y, Li M, Li W, Xue X, Wu S, Zhang Y, Zhang W. FOXP3 suppresses breast cancer metastasis through downregulation of CD44. *International Journal of Cancer*, 137: 1279-1290, 2015.