



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

LEANDRA FIORI LOPES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA E DA VARIANTE  
POLIMÓRFICA *rs3761548* NO GENE *FOXP3* EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

---

Londrina  
2013

LEANDRA FIORI LOPES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA E DA VARIANTE  
POLIMÓRFICA *rs3761548* NO GENE *FOXP3* EM PACIENTES  
COM CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Maria Angelica Ehara Watanabe

Co-orientador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Roberta Losi Guembarovski

Londrina  
2013

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina.**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

L864a    Lopes, Leandra Fiori.  
Análise da expressão proteica e da variante polimórfica rs3761548 no gene  
FOXP3 em pacientes com câncer de mama triplo negativo/ Leandra Fiori  
Lopes. – Londrina, 2013.  
39 f.: il.

Orientador: Maria Angélica Ehara Watanabe  
Coorientador: Roberta Losi Guembarovski.  
Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de  
Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em  
Patologia Experimental, 2013.  
Inclui bibliografia

1. Mamas – Câncer – Aspectos genéticos – Teses. 2. Polimorfismo (Genética) –  
Teses. 3. Genética – Expressão – Teses. 4. Células cancerosas – Teses. 5. Patologia  
experimental. – Teses. I. Watanabe, Maria Angélica Ehara. II. Guembarovski,  
Roberta Losi. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências  
Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

CDU 616-006.6

LEANDRA FIORI LOPES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO PROTEICA E DA VARIANTE  
POLIMÓRFICA *rs3761548* NO GENE *FOXP3* EM PACIENTES COM  
CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Mestre.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Maria Angelica Ehara Watanabe  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Prof<sup>a</sup>. Dra Sueli Donizete Borelli  
Universidade Estadual de Maringá – UEM

---

Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Carolina Batista Ariza  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 24 de maio de 2013.

## **DEDICO**

Aos meus pais, pela educação que me deram, pela dedicação, e por sempre me apoiarem em tudo, me dando a oportunidade de me especializar cada vez mais! Amo vocês.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que me ilumina e me dá forças para cada dia seguir meu caminho, cada dia aprender mais, ter vontade de viver e principalmente pela minha vida.

A minha orientadora, Maria Angelica, que me recebeu no laboratório, e estava sempre disposta a ensinar, que além de professora, educadora e orientadora, uma mãe científica, com uma sensibilidade indescritível, que ao olhar no meu rosto e no rosto de cada aluno, conseguia perceber se estávamos felizes ou tristes, angustiados ou passando por alguma dificuldade, nos chamando para conversar e fazendo uma sessão de terapia. Sem falar de suas aulas e conhecimentos de imuno, vou levar para sempre no meu coração, com seu seu jeito Angel de ser.

A minha co-orientadora Roberta, que sempre estava disposta a me ajudar em todos os momentos da minha dissertação, desde a coleta das amostras, nos experimentos, e na finalização do artigo. Se tornou uma grande amiga, onde sei que posso contar em todas as horas, que sempre me escutava quando estava feliz ou triste... Vou sentir muito sua falta, a convivência do dia- a dia e as histórias da Laurinha! Mas pode ter certeza que de final de semana vamos tomar uma café na Pandor, se não vou ficar com ciúmes!

Aos meus amigos do Laboratório, Julie, Paty, Bruna, Vânia, Cadu, Gui, Naty, Karen, a todos que convivemos juntos por esses 2 anos! Anos da minha vida que nunca serão esquecidos ao lado de vocês, foram tantas histórias, tantas risadas e cada um de vocês tem um pedaço especial no meu coração!

A minha banca e também amiga Carolina, que logo que chegou no laboratório, toda quieta e tímida tornamos amigas. Tem pessoas que nos identificamos mais, e você é uma delas! Também vou sentir muita sua falta! Mas vamos nos encontrar de sábado para um lanche quando eu estiver em Londrina.

As médicas patologistas Dra. Alda e Dra. Marina, pela parceria e por estarem sempre dispostas a nos ajudar e muito obrigada pela análises de nossas lâminas.

A técnica de laboratório Lucia, que com um coração enorme e sempre querendo nos ajudar, me ensinou uma boa parte da dissertação, a fazer imunohistoquímica! Muito obrigada por me ensinar e com a maior boa vontade do mundo!

A minha família, meus pais, e minhas irmãs Laís e Aílla, por sempre me apoiarem e estarem do meu lado, compartilhando todos os momentos da minha vida.

Uma pessoa muito especial na minha vida, minha avó Isalta, que é a vó perfeita, a melhor amiga, onde em todos os problemas ou momentos de felicidades é para ela que eu corro.

Ao meu amor, namorado, noivo e daqui alguns meses marido. Não tenho palavras para descrever o que sinto por você... Só tenho que agradecer por ser a pessoa maravilhosa que você é, que sempre me apoia MUITO em tudo o que quero fazer, em todas as minhas decisões. Te amo!

LOPES, Leandra Fiori. **Análise da expressão proteica e da variante polimórfica rs3761548 no gene *FOXP3* em pacientes com câncer de mama triplo negativo.** 2013. 39 f. Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina- Londrina, Pr.

## RESUMO

Entre os diversos tipos de câncer, o de mama apresenta-se como um grave problema de saúde pública, sendo o segundo tipo mais frequente no mundo e o primeiro na população feminina. Tem sido demonstrado que o câncer de mama pode ser classificado em subgrupos biologicamente e clinicamente distintos. Um subgrupo que tem recebido muita atenção é o subtipo triplo negativo (TN), que possui fenótipo de receptor de estrógeno (RE) negativo, receptor de progesterona (RP) negativo e não apresenta a superexpressão do oncogene HER2 (fator de crescimento epidérmico humano 2). As células T reguladoras (Tregs) representam uma população de células que estão envolvidas na regulação da ativação de células T, sendo essenciais para a homeostasia imunológica. O marcador comumente utilizado para identificá-las é o gene *FOXP3* (*forkhead transcription factor 3*), um fator de transcrição das Tregs, cuja expressão pode estar aumentada em células tumorais, além das Tregs. Neste contexto, este trabalho teve como objetivo investigar um polimorfismo genético (rs3761548) no gene *FOXP3*, bem como sua expressão proteica, na busca por possíveis envolvimento na patogênese do câncer de mama TN. O polimorfismo genético foi avaliado em 50 pacientes com câncer de mama TN e em 115 controles livre de neoplasia, utilizando-se a técnica de PCR alelo específica. A análise proteica foi realizada por imunohistoquímica com anticorpo monoclonal específico para *FOXP3*. A frequência genotípica para *FOXP3* foi 12 % (6/50) e 4 % (4/115) para o homocigoto AA, 34 % (17/50) e 57 % (66/115) para o heterocigoto CA e 54 % (27/50) e 39 % (45/115) para o homocigoto CC, em pacientes e controles, respectivamente. Quando analisado a mutação de *FOXP3*, as pacientes homocigotas AA apresentaram um risco quase 4 vezes maior, indicando uma associação positiva entre este genótipo e o desenvolvimento do câncer de mama TN (OR = 3,78; IC 95 % = 1,02-14,06). Ao correlacionar os genótipos com os parâmetros clínicos e histopatológicos, não houve significância em relação a: tamanho do tumor ( $p = 0,482$ ;  $\rho = 0,102$ ), comprometimento de linfonodos ( $p = 0,890$ ;  $\rho = -0,023$ ) e grau nuclear ( $p = 0,682$ ;  $\rho = -0,062$ ). Adicionalmente, observou-se que a maioria das pacientes (83 %) apresentou expressão elevada de *FOXP3* por imunohistoquímica e também que esta expressão foi predominantemente citoplasmática. Em relação ao infiltrado de Tregs *FOXP3*-positivo, obtivemos resultado em 38 das 50 pacientes, das quais 47 % e 58 % apresentaram um infiltrado intratumoral e peritumoral moderado ou intenso, respectivamente. Não encontramos resultados significativos quando analisamos este parâmetro em relação a dois dos fatores prognósticos: comprometimento de linfonodos (intratumoral  $p = 0,310$  e peritumoral  $p = 0,679$ ) e grau nuclear (intratumoral  $p = 0,531$  e peritumoral  $p = 0,309$ ). Entretanto, para o parâmetro tamanho do tumor, as pacientes que apresentaram tamanhos entre 1,5-3 cm o infiltrado intratumoral ( $p = 0,026$ ) foi mais intenso. Assim sendo, o gene *FOXP3*, por ter sido positivamente associado ao desenvolvimento do câncer de mama TN e também por ter apresentado uma elevada expressão proteica neste subgrupo tumoral e uma associação positiva entre o infiltrado intratumoral e o tamanho do tumor, parece ser um candidato promissor a futuras investigações em amostras maiores e em outros subtipos de câncer mamário.

**Palavras-chave:** Câncer de mama. Subtipo triplo negativo. *FOXP3*. Polimorfismos genéticos. Expressão proteica.

LOPES, LEANDRA FIORI. **Analysis of protein expression and polymorphic variant rs3761548 in FOXP3 gene in patients with triple negative breast cancer.** 2013. 39 p. Dissertation (Master's Degree Dissertation) – Estadual University Of Londrina, Londrina, Pr.

## ABSTRACT

Among the various types of cancer, breast cancer presents as a serious public health problem, being the second most common type in the world and first in the female population. It has been shown that breast cancer can be classified into biologically and clinically distinct subgroups. A subgroup that has received much attention is the triple negative breast cancer subtype (TNBC), which presents phenotype of negative estrogen receptor (ER), negative progesterone receptor (PR) and has no overexpression of the oncogene *HER2* (human epidermal growth factor 2). Regulatory T cells (Treg) represent a heterogeneous population involved in the regulation of T cell activation and is essential for immune homeostasis. The most specific marker for identify these cells is the *FOXP3* gene (forkhead transcription factor3), a transcription factor that controls the development and function of Tregs, and its expression may be increased in tumor cells. In this context, this study aimed to investigate genetic polymorphism in gene *FOXP3*, and its protein expression in the search for a possible involvement in pathogenesis of TNBC. Genetic polymorphism of *FOXP3* (*rs3761548*) was evaluated in 50 TNBC patients and 115 controls free of neoplasia by allele specific PCR. The protein analysis was performed by immunohistochemistry with specific monoclonal antibody. The genotype frequency for *FOXP3* was 12 % (6/50) and 4 % (4/115) for AA rare homozygote, 34 % (17/50) and 57 % (66/115) for CA heterozygote and 54 % (27/50) and 39 % (45/115) for CC homozygote, in patients and controls, respectively. When we analyzed the *FOXP3* mutation, patients homozygous AA had a risk almost 4-fold higher, indicating a positive association between these genotype and the development of TNBC (OR = 3.78; 95 % CI = 1.02-14.06). Comparing genotypes with clinical and histopathological parameters, there was no significance with the following: tumor size ( $p = 0.482$ ,  $\rho = 0.102$ ), lymph node involvement ( $p = 0.890$ ,  $\rho = -0.023$ ) and nuclear grade ( $p = 0.682$ ,  $\rho = -0.062$ ). Additionally, it was observed that most patients (83 %) showed a high expression of *FOXP3* by immunohistochemistry and that this expression was predominantly cytoplasmic. In relation to *FOXP3*-positive Treg infiltration, from 50 patients we had the results of 38 and 47 % and 58 % of them had a moderate or intense intratumoral and peritumoral infiltrated, respectively. We did not found any significant results when analyze this parameter in relation to two of prognostic factors: lymph node involvement (intratumoral  $p = 0.310$  and peritumoral  $p = 0.679$ ) and nuclear grade (intratumoral  $p = 0.531$  and peritumoral  $p = 0.309$ ). However, for the parameter tumor size, the patients who had sizes between 1.5-3 cm had more intratumoral infiltration ( $p = 0.026$ ). In conclusion, *FOXP3* gene, because it was positively associated with TNBC development and also demonstrated a high protein expression and a positive association with tumor size in intratumoral *FOXP3*-positive Treg, appears to be a promising candidate for further investigation in larger samples and in other subtypes of breast cancer.

**Keywords:** Breast cancer. Triple negative subtype. *FOXP3*. Genetic polymorphism. Protein expression.

## LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** – Localização cromossômica do gene Forkhead Box P3 (FOXP3) e domínios repressor, ZnF, Zip e altamente conservado (Forkhead). Adaptado de Bottema ET. AL, 2010 e Sakaguchi ET AL., 2008..... 19
- Figure 1** – *FOXP3* genotypic distribution between patients and controls. Amplicons of 334 base pairs for A allele and 333 base pairs for C allele were analyzed by electrophoresis in polyacrilamide gel and detected by a nonradioisotopic technique..... 27
- Figure 2** – High protein expression of FOXP3 in TNBC tissues samples. A) FOXP3 cytoplasmic expression in tumor cells; B) FOXP3 intratumoral infiltrate in Tregs and C) Peritumoral infiltrate of FOXP3 Tregs. Magnification 400X ..... 28

## LISTA DE TABELAS

<b>Table 1</b> – Primers sequences and size of PCR products for genetic variant analyzed in <i>FOXP3</i> gene.....	25
<b>Table 2</b> – Genotype distribution and case control association study for <i>FOXP3</i> gene.....	27

## LISTA DE ABREVIATURAS

TN	Triplo Negativo
RE	Receptor de Estrogênio
RP	Receptor de Progesterona
HER2	<i>Human Epidermal Groth Factor Receptor 2</i> (receptor tipo 2 do fator de crescimento epidermal humano)
RH	Receptor Hormonal
Tregs	Células T reguladoras
FOXP3	<i>Forkhead Transcription Factor 3</i>
TNBC	<i>Triple Negative Breast Cancer</i>
ASO	<i>Allele-specific oligonucleotide</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
TCR	<i>T cell receptor</i>
NFAT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
AP1	<i>Activating protein-1</i>
SMADS	Family of signal transducers
CTLA-4	<i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
GITR	<i>Glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor</i>
PD-1	<i>Programmed death-1</i>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	12
<b>1.1</b>	<b>Câncer de Mama</b> .....	13
<b>1.2</b>	<b>Câncer de Mama Triplo Negativo</b> .....	15
<b>1.3</b>	<b>Células T reguladoras (Tregs)</b> .....	16
<b>1.4</b>	<b>Fator de transcrição FOXP3</b> .....	18
<b>2</b>	<b>OBJETIVO</b> .....	21
<b>2.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	21
<b>2.2</b>	<b>Objetivos Específicos</b> .....	21
<b>3</b>	<b>ARTIGO</b> .....	22
<b>4</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	34
<b>5</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	35
<b>6</b>	<b>ANEXOS</b> .....	39
<b>6.1</b>	<b>Aprovação Comitê de Ética e Consentimento Livre e Esclarecido</b> .....	39

## 1 INTRODUÇÃO

O termo câncer é empregado para designar mais de uma centena de diferentes doenças heterogêneas Hanahan and Weinberg (2000). Constitui uma doença genética que surge como consequência de alterações cumulativas no material genético (DNA) de células normais, as quais sofrem transformações até se tornarem malignas (Dantas 2009), podendo invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes, caracterizando o surgimento de metástases (INCA 2011).

Os cânceres são, na sua maioria, de origem somática, resultantes da interação de fatores genéticos e ambientais, e raramente uma doença hereditária (Guembarovski 2008). As síndromes de câncer hereditário são afecções genéticas nas quais as neoplasias malignas tornam-se mais prevalentes em indivíduos de uma mesma família (Alvarenga, Cotta et al. 2003). De um modo geral, a carcinogênese resulta de múltiplas etapas que podem envolver até centenas de genes, por meio de mutações gênicas, quebras e perdas cromossômicas, ampliações, instabilidade genômica e mecanismos epigenéticos. Os proto-oncogenes, genes supressores de tumor e aqueles relacionados ao reparo do DNA são os principais genes envolvidos nesse processo (Dantas 2009).

No Brasil, as estimativas para os anos de 2012-2013 apontam a ocorrência de 518.510 casos novos de câncer, incluindo os casos de câncer pele não melanoma, reforçando a magnitude do problema do câncer no país. Excluindo os casos de câncer da pele não melanoma, estima-se um total de 385 mil casos novos. Os tipos mais incidentes serão os cânceres de próstata, pulmão, cólon e reto e estômago para o sexo masculino; e os cânceres de mama, colo do útero, cólon e reto e tireoide para o sexo feminino (INCA 2011).

A patogênese do câncer é iniciada e modulada pela interação entre as células malignas transformadas, o estroma circundante e o sistema imune inato e adaptativo. Essas interações são complexas e componentes do sistema imune atuam tanto quanto para a iniciação, crescimento, potencial invasivo e desenvolvimento de metástase (Yaquub and Aandahl 2009). A interação entre os tumores e seu microambiente é complexa e sua compreensão é de fundamental importância para o desenvolvimento de novos marcadores prognósticos e estratégias terapêuticas (Fridman, Galon et al. 2011).

## 1.1 Câncer de Mama

Entre os diversos tipos de câncer, o câncer de mama apresenta-se como um grave problema de saúde pública, sendo o segundo tipo mais frequente no mundo e o primeiro na população feminina (Batiston 2009). No Brasil, o câncer da mama é a doença maligna de maior mortalidade na população feminina (INCA 2011). Tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ainda ser estabelecido, na maioria das vezes, numa fase tardia da doença, o que diminui as possibilidades de cura do paciente.

O câncer de mama é a principal causa de morte por câncer entre as mulheres em todo o mundo (Moura-Gallo, Simão et al. 2004). Dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA 2011) revelam estimativas de 518.510 novos casos de câncer, dos quais 260.640 na população feminina. Espera-se no país, 52.680 novos casos de câncer de mama com incidência de 52 casos para cada 100 mil mulheres. Vale destacar que, sem considerar a neoplasia do tipo não melanoma, o tumor mamário é o mais frequente entre as mulheres das regiões Sudeste, Sul, Centro-Oeste e Nordeste.

A maior incidência de câncer de mama ocorre em mulheres após a menopausa (Boing, Vargas et al. 2007). O câncer de mama acomete mais mulheres na menopausa (>50 anos) comparado a mulheres muito jovens, correspondendo a aproximadamente 80% dos carcinomas mamários. Somente 2 a 5% dos casos incidem em mulheres muito jovens (idade  $\leq 35$  anos). Carcinomas mamários invasores que ocorrem em pacientes jovens, com idade até 40 anos, geralmente apresentam características clínicas e patológicas associadas à doença mais agressiva, com maior risco de recidiva local e morte. Frequentemente em mulheres jovens os tumores são de alto grau, apresentam maior índice de proliferação, maior invasão vascular e mais linfonodos comprometidos, além de não expressarem os receptores hormonais e possuírem elevadas taxas de metástases à distância (Dutra, Rezende et al. 2009).

O câncer de mama é o resultado da interação de fatores genéticos com o estilo de vida, hábitos reprodutivos e fatores ambientais (Johnson-Thompson and Guthrie 2000). Caracterizam-se como neoplasias heterogêneas, com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos, além de apresentações clínicas diferentes com diversas variações de resposta ao tratamento (Sorlie 2004). Acredita-se que 90-95% deles sejam esporádicos (não familiares) e decorram de mutações somáticas, e que 5-10% sejam hereditários (familiares), devido à herança de uma mutação germinativa ao nascimento, que confere a estas mulheres maior predisposição ao seu desenvolvimento (Barros ACS D 2001).

Embora o número de pesquisas já conduzidas sobre o câncer de mama seja elevado, a sua etiologia ainda não está totalmente esclarecida (Pinho and Coutinho 2007). Os fatores de risco determinam os grupos de pessoas com maior probabilidade de desenvolverem o câncer de mama (Godinho and Koch 2004), sendo eles: idade, história familiar, menarca precoce, nuliparidade, menopausa tardia, idade avançada da gravidez do primeiro filho e terapia de reposição hormonal estão bem estabelecidos como fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (McPherson, Steel et al. 2000).

O câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, com alguns casos que são associados com crescimento lento e um excelente prognóstico enquanto outros tumores são altamente agressivos. Na prática clínica, a doença é classificada baseada nas características morfológicas e histológicas, incluindo carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular infiltrante, carcinoma adenoide cístico, carcinoma medular. São ainda classificados conforme seu grau histológico, o qual é baseado no grau de diferenciação celular, pleomorfismo nuclear e atividade mitótica (Elston CW 1998).

Até o final da década passada, o tratamento de pacientes que tinham o diagnóstico deste tipo de neoplasia era semelhante, baseado principalmente numa classificação morfológica que impossibilitava justificar porque casos com o mesmo diagnóstico e estágio podiam ter desfechos clínicos marcadamente diferentes (Vieira, Dufloth et al. 2008).

Com o esclarecimento da estrutura da sequência do DNA humano e com o desenvolvimento paralelo de métodos de alta tecnologia, ocorreram grandes mudanças estratégicas nas pesquisas relacionadas ao câncer (Simon, Mirlacher et al. 2003), tornando possível o conhecimento de alterações específicas para determinados subtipos tumorais.

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 (Vargo-Gogola and Rosen 2007). As pacientes com carcinoma ductal invasivo apresentam maior envolvimento linfático e um pior prognóstico que o verificado nas pacientes com tipos menos frequentes de carcinoma invasivo de mama (Ketterhagen, Quackenbush et al. 1984).

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 (Sobin 2002).

Recentemente, o Consenso Internacional de Especialistas St. Gallen, Suíça, propôs um novo sistema de classificação biológico, com base na expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), HER2 (fator de crescimento epidérmico humano 2) e Ki-67 (Goldhirsch, Wood et al. 2011). Estudos do perfil de expressão gênica permitiram a classificação os tumores de mama em cinco subclasses: Luminal A (receptores hormonais de estrogênio e /ou progesterona positivos, HER2 negativo), Luminal B (receptores hormonais de estrogênio e / ou progesterona positivo, HER2 positivo), Superexpressão HER2 (Receptores de estrogênio negativo, receptores de progesterona negativos, HER2 positivo), *basal-like* (Receptor de estrogênio negativo, receptor de progesterona negativo, HER2 negativo, citoqueratina 5/6 positiva e /ou receptor do fator de crescimento epidermal positivo) e tumores semelhantes à mama normal (não classificada) (Sorlie, Perou et al. 2001; Carey, Perou et al. 2006). Os tumores de mama *basal-like* e os semelhantes à mama normal têm um fenótipo triplo negativo.

## 1.2 Câncer de Mama Triplo Negativo

Tem sido demonstrado que o câncer de mama pode ser classificado em subgrupos biologicamente e clinicamente significativos. Um subgrupo que tem recebido muita atenção possui fenótipo de receptor de estrogênio negativo (RE-), receptor de progesterona negativo (RP-) e fator de crescimento epidérmico humano 2-negativo (HER2), sendo denominado de triplo negativo (TN) (Kurebayashi 2009).

Os tumores triplos negativos são responsáveis por 10-20% de todos os cânceres de mama, e são biologicamente mais agressivos do que outros subgrupos (Kurebayashi 2009). Normalmente demonstram alto grau histológico e são o subtipo de câncer de mama mais comum em portadores de mutação em *BRCA-1* (Dawson, Provenzano et al. 2009). Estão também associados ao gene *TP53* e estudos epidemiológicos mostram uma alta prevalência entre as mulheres mais jovens e de descendência Africana (Carotenuto, Roma et al. 2010). Caracteristicamente, possuem um comportamento mais agressivo e predileção por metástase visceral, favorecendo mal prognóstico (Maegawa and Tang 2010).

Desta forma, estudos envolvendo cânceres de mama triplo negativos são de fundamental importância clínica frente à falta de opções terapêuticas. O significado

prognóstico destes tumores permanece incerto uma vez que o grupo é heterogêneo e o pior prognóstico parece estar confinado àqueles que expressam citoqueratinas basais ou o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (Dawson, Provenzano et al. 2009). Terapias personalizadas, como a terapia endócrina e anti-HER2 não são aplicáveis ao câncer de mama triplo negativo (Kurebayashi 2009). Apesar da falta de terapias específicas, é sensível a antraciclinas e taxanos (Maegawa and Tang 2010), mas a recidiva precoce é comum (Carotenuto, Roma et al. 2010). Portanto, para desenvolver novas estratégias contra o câncer de mama triplo negativo, é essencial entender as vias específicas que levam este subgrupo ao comportamento agressivo (Kurebayashi 2009).

Em meio as populações ocidentais mais estudadas, os tumores triplo negativos representam cerca de 15% do total dos tumores de mama (Perou, Sorlie et al. 2000; Sorlie, Perou et al. 2001; Jones, Ford et al. 2004; Jones, Virtanen et al. 2004; Potemski, Kusinska et al. 2005). Epidemiologicamente, esses tumores acometem em maior frequência pacientes jovens, habitualmente antes da menopausa, e de descendência africana (Sleeman, Kendrick et al. 2006).

Devido à expressão diminuída dos receptores hormonais e do receptor do fator de crescimento ser negativo, o tratamento não cirúrgico para pacientes com câncer de mama TN tem sido confinado à quimioterapia e radioterapia (Carey, Winer et al. 2010).

Atualmente, as pacientes portadoras de câncer de mama triplo negativo apresentam um conjunto de fatores que levam a considerar que esse tipo de doença seja mais grave do que aquela manifestada nas demais pacientes. Além de serem portadoras de subtipo de neoplasia intrinsecamente mais agressiva, essas pacientes também não se beneficiam de alguns tratamentos direcionados aos alvos moleculares altamente efetivos, como o trastuzumabe, para os tumores HER-2 positivos, ou as terapêuticas hormonais utilizadas no tratamento dos tumores que expressam receptores hormonais (Fernandes 2009).

### **1.3 Células T reguladoras (Tregs)**

As células T reguladoras (Tregs) são uma população de células T que atuam na tolerância imunológica e são moduladoras essenciais na resposta imune a patógenos, alérgenos, células cancerígenas e antígenos próprios, uma vez que estas induzem a supressão das células T efectoras e auto-reativas, bloqueando sua ativação e função (Sakaguchi 2005; Sakaguchi, Yamaguchi et al. 2008; Melo 2009).

Tregs podem suprimir a função de células T convencionais e assim limitar respostas imunes excessivas ou inapropriadas (Workman, Szymczak-Workman et al. 2009). Algumas

células T são induzidas a terem o fenótipo Treg durante um episódio de infecção e são denominados Tregs induzidas. Outra população de Treg existe antes da exposição do hospedeiro ao patógeno e são referidas como Tregs naturais (Belkaid 2007).

As células Tregs são CD4+ e expressam constitutivamente a molécula CD25 (cadeia  $\alpha$  do receptor de IL-2). São produzidas normalmente pelo timo como uma subpopulação de células T funcionalmente distintas e maduras, e constituem aproximadamente 2-10% da população de células T CD4+ (Sakaguchi 2004). Além da geração tímica de células Tregs CD4+CD25+, células T periféricas não Treg podem adquirir a expressão de *FOXP3* (forkhead transcription factor 3) e converter-se em células Tregs *in vivo* após estimulação antigênica crônica ou em condições de linfopenia (Apostolou and von Boehmer 2004; Curotto de Lafaille, Lino et al. 2004). As células Tregs CD4+CD25+ produzem citocinas reguladoras tais como IL-10, IL-4 e TGF- $\beta$ , e também expressam preferencialmente as moléculas CTLA-4 (*cytotoxic T lymphocyte antigen-4*, regulador negativo da ativação de células T; receptor para CD80 e CD86), GITR (*glucocorticoid-induced TNFR-family related receptor*) e PD-1 (*programmed death-1*). Entretanto, a identificação de Tregs durante respostas imunes ou em tecidos inflamados é complicada porque a maioria desses marcadores, inclusive o CD25, são também expressos em células T recém ativadas não reguladoras (Sakaguchi 2004). A depleção ou alteração da função dessas células T CD4+CD25+ leva ao desenvolvimento de doenças autoimunes em uma grande variedade de animais normais (Sakaguchi 2004; Sakaguchi 2005).

As células T reguladoras naturais CD4+CD25+ atuam na supressão da ativação imune, funcionando como mediadores críticos da homeostasia imune e da auto-tolerância (Fontenot and Rudensky 2005). Entretanto, vários estudos têm demonstrado que a função das células Tregs não é limitada à prevenção de autoimunidade, mas são importantes no controle todas as formas de respostas imunes no contexto de inflamação, infecção, alergia, transplantes e imunidade tumoral (Hori and Sakaguchi 2004).

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 as células Tregs CD4+CD25+ expressam o gene regulador *FOXP3*, que codifica um fator de transcrição, o *forkhead transcription factor 3*, que controla seu desenvolvimento e função (Fontenot, Gavin et al. 2003; Hori, Nomura et al. 2003; Khattri, Cox et al. 2003). A expressão retroviral do gene *FOXP3* em células T periféricas CD4+CD25+ de camundongos ou humanos resultou na aquisição da função supressora por essas células. Portanto, a expressão de *FOXP3* pode ser usada como um

marcador molecular específico para células Tregs CD4+CD25+ (Kronenberg and Rudensky 2005). Alguns anos antes da identificação do *FOXP3* como marcador específico de células Tregs, mutações no gene *FOXP3* (localizado no cromossomo X) tinham sido identificadas como causa de uma desordem autoimune fatal observada em pacientes (denominada IPEX, *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome*) e em camundongos mutantes que desenvolvem espontaneamente esta doença autoimune (denominados *scurfy mice*) (Bennett, Christie et al. 2001; Brunkow, Jeffery et al. 2001).

Embora as Tregs compreendam a maior porcentagem de células T CD4+CD25+ circulantes em pacientes com câncer de mama metastático e pacientes com recidiva após completa quimioterapia adjuvante, o *pool* sistêmico de Tregs parece ser independente do estágio da doença ou do tipo de tratamento (Rech, Mick et al. 2010).

Células T CD4+CD25+ que expressam *FOXP3* são reconhecidos como células T reguladoras profissionais e são instrumentos na indução e manutenção da tolerância imune (Waldmann, Adams et al. 2006; Hill, Benoist et al. 2007; Chen and Konkel 2010).

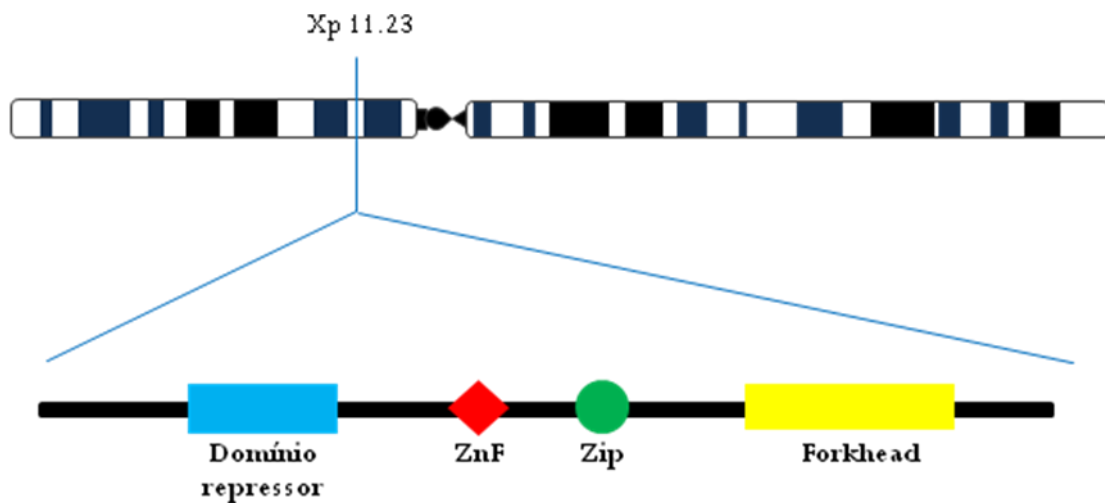
#### **1.4 Fator de transcrição *FOXP3***

O gene *FOXP3* é principalmente expresso em células Tregs CD4+CD25+ em condições fisiológicas normais. Este gene codifica a proteína FOXP3 que regula a ativação de células T e suas funções atuando como repressora transcricional e diminui a produção de citocinas em células T (Read, Malmstrom et al. 2000; Takahashi, Tagami et al. 2000; Schubert, Jeffery et al. 2001; McHugh, Whitters et al. 2002; Hori, Nomura et al. 2003).

Este gene está localizado no braço curto do cromossomo X (chr X) Xp11.23 e está sujeito à inativação (Bennett, Brunkow et al. 2001; Wang, Liu et al. 2009). Contém 11 exons codificantes (exons de 1 a 11) (Bennett, Brunkow et al. 2001).

A proteína FOXP3 exerce sua função sobre regiões reguladoras específicas dentro do DNA, aumentando ou suprimindo a transcrição de genes específicos. As proteínas FOX (*forkhead box*) são componentes de uma família de fatores de transcrição que possuem um domínio ligante de DNA altamente preservado denominado *forkhead/winged-helix*. É altamente expressa não só em células T reguladoras, mas também nas células tumorais, agindo como um repressor transcricional de oncogenes do câncer de mama, incluindo o HER2. Células tumorais *FOXP3* positivas foram detectados por imunohistoquímica em pacientes com tumores primários invasivos, HER2 positivos. A expressão de *FOXP3* em células de câncer de mama foi também associada a uma maior taxa de recidiva. Esses dados

indicam que a presença de *FOXP3* em células tumorais representa um novo fator prognóstico independente (Ladoire, Arnould et al. 2011).



**Figura 1:** Localização cromossômica do gene *Forkhead Box P3* (*FOXP3*) e domínios repressor, ZnF, Zip e altamente conservado (*Forkhead*). Adaptado de Bottema et. al, 2010 e Sakaguchi et al., 2008.

Foram descritos polimorfismos de base única (SNP – *Single Nucleotide Polymorphism*) em várias regiões do gene *FOXP3*, tais como região promotora, intrônica ou não codificante e exônica ou codificante. A primeira região altamente conservada é o promotor *FOXP3*, que está localizado 6,5 Kb a upstream do primeiro exon codificante, e é um clássico CAAT e TATA-box que é ativado em resposta a TCR sinalização através de ligação de NFAT e AP1 (Mantel, Ouaked et al. 2006). A segunda região foi identificada como um elemento TGF- $\beta$  sensível que contém sítios de ligação para NFAT e SMADS (Tone, Furuuchi et al. 2008). As diferenças mais marcantes em relação ao padrão de metilação no *locus FOXP3* têm sido observadas em um terço em região estabilizadora altamente conservada rica em CpG. Esta região parece ser totalmente demetilada em células Tregs e metilada em células T convencionais (Baron, Floess et al. 2007; Floess, Freyer et al. 2007; Kim and Leonard 2007; Nagar, Vernitsky et al. 2008), e normalmente é referida como região demetilada específica de células Treg (TSDR).

Regiões promotoras são potenciais candidatas para a presença de polimorfismos funcionais de base única (SNPs), uma vez que estão envolvidos na iniciação da transcrição e em muitos dos elementos cis que regulam a expressão gênica (Hoogendoorn, Coleman et al. 2003). Investigação de polimorfismos humanos na região promotora de genes imuno relevantes podem possivelmente refletir o nível de expressão de Tregs (Belkaid and Rouse 2005).

Conforme o que foi apresentado, um dos genes de grande interesse que possuem papel chave na função das Tregs é *FOXP3* (Hanel, Velavan et al. 2011) e polimorfismos neste gene podem modificar a funcionalidade e a quantidade da proteína correspondente, levando assim à falta de funcionalidade destas células (Wildin, Smyk-Pearson et al. 2002). Vários autores têm descritos inúmeros SNPs para a região promotora: -6054 TAATA/(*rs3060515*); -5906 T/A (*rs2869211*); -3499 A/G (*rs3761547*); -3279 A/C (*rs3761548*); -2383 C/T (*rs3761549*); -1383 C/T (*rs2232364*); -924 A/G (*rs2232365*), SNPs para a região intrônica: IVS1 +87 G/T (*rs2232366*); IVS5 -20 G/A (*rs2232368*); IVS9 +459 A/G (*rs2280883*) e SNPs nas regiões exônicas 1, 2, 3-4, 5-6, 7-8, 9, 10, 11 e 12 (Bassuny, Ihara et al. 2003; Zhang, Zhang et al. 2009). O estudo destas variantes alélicas pode resultar em importantes informações sobre a regulação das Tregs em diversas patologias, incluindo o câncer de mama.

## 2 OBJETIVO

### 2.1 Objetivo Geral

- ❖ Analisar um polimorfismo genético no gene *FOXP3*, bem como sua expressão proteica em pacientes com câncer de mama triplo negativo e em controles livres de neoplasia.

### 2.2 Objetivos Específicos

- ❖ Analisar o polimorfismo genético (*rs3761548*) do gene *FOXP3* em pacientes com câncer de mama triplo negativo e em controles livres de neoplasia;
- ❖ Realizar um estudo de associação do tipo caso-controle para comparar a presença da variante genética entre pacientes e controles, na busca por marcadores de suscetibilidade ao desenvolvimento do câncer de mama triplo negativo;
- ❖ Analisar a expressão proteica de FOXP3 (infiltrado peritumoral e intratumoral e das células tumorais) por imunohistoquímica em amostras de tecidos tumorais embebidas em parafina;
- ❖ Correlacionar as características clínicas das pacientes com os dados genéticos e de imunohistoquímica, na busca por marcadores ligados ao prognóstico e evolução dos tumores mamários triplo negativos.

### 3 ARTIGO

#### ***Transcription factor FOXP3: a candidate for susceptibility and prognosis marker in triple negative breast cancer***

##### **Abstract**

A subgroup of malignant tumor that has received much attention is the triple negative breast cancer (TNBC), which presents phenotype of negative estrogen receptor (ER), negative progesterone receptor (PR) and has no overexpression of the oncogene *HER2* (human epidermal growth factor 2). The marker for identify regulatory T cells (Treg) is *FOXP3* gene (forkhead transcription factor 3), a transcription factor that controls the development and function of Tregs, whose expression may be increased in tumor cells. This study aimed to investigate genetic polymorphism and the protein expression of *FOXP3* (*rs3761548*) gene for a possible involvement in TNBC pathogenesis and prognosis. Genetic polymorphism and protein expression were evaluated in 50 TNBC patients and in 115 controls individuals neoplasia free by allele specific PCR and immunohistochemistry. Patients homozygous AA had a risk almost 4-fold higher for TNBC development, indicating a positive association for these genotype (OR = 3.78; 95 % CI = 1.02-14.06). When comparing the genotypes with clinical and histopathological parameters, there was no significance with tumor size, lymph node involvement and nuclear grade. Additionally, it was observed that most of the patients (83 %) showed a high expression of FOXP3 in tumor cells and this expression was predominantly cytoplasmic. In relation to tumor FOXP3 Treg infiltration, 47 % and 58 % of patients had a moderate or intense intratumoral and peritumoral infiltrated, respectively. We did not found any significant results when analyze this parameters in relation to lymph node involvement and nuclear grade. Therefore, when we analyzed the tumor size parameter, we observed a significant result with intratumoral infiltrate ( $p = 0.026$ ). In conclusion, *FOXP3* gene, because it was associated with susceptibility to TNBC development and also demonstrated a high *FOXP3*-positive infiltrate correlated with a prognostic parameter, appears to be a promising candidate for further investigation in larger samples of TNBC.

**Keywords:** TNBC, *FOXP3*, genetic polymorphism, protein expression

## Introduction

Estimate data from National Cancer Institute reveal that is expected in Brazil 52,680 new cases of breast cancer (BC) for the years 2012-2013. It is worth noting that, regardless the type of non-melanoma cancer, the mammary tumor is the most common among women in the most regions of Brazil, account for a high rate of morbidity and mortality among Brazilian women (INCA 2011).

Breast cancer represents a complex and heterogeneous disease that comprises distinct pathologies, histological features, and clinical outcome. The status of estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), and human epidermal growth factor receptor type 2 (HER2) has been used as predictive markers to identify a high-risk phenotype and for selection of the most efficient therapies (Weigelt and Reis-Filho 2010; Presson, Yoon et al. 2011)

Triple-negative breast cancer (TNBC) is a subtype characterized by the lack of ER, PR, and HER2 expression and is associated with younger age at diagnosis and occurs with greater frequency in African-American, premenopausal women and those who are overweight (particularly with abdominal obesity) (Dent, Trudeau et al. 2007). It represents approximately 12–17% of all breast cancers (Foulkes, Smith et al. 2010) and encompasses a heterogeneous group of tumors including, but not limited to, those classified as basal-like. This subtype of cancer is aggressive, showing a tendency towards early metastasis and having a poor overall outcome despite being highly responsive to conventional chemotherapy. The aggressive clinical course, poor prognosis, and lack of specific therapeutic options for this subtype of tumor have intensified current interest in this patient group (Cho, Chang et al. 2011).

Regulatory T cells (Treg) represent a heterogeneous population of cells composed of discrete subsets with different phenotypes and functions (Menetrier-Caux, Curiel et al. 2012). The most specific marker to identify Tregs is *FOXP3*, a member of the forkhead or winged helix family of transcription factors (Hori, Nomura et al. 2003; Roncador, Brown et al. 2005), that play a role in various cellular processes. *FOXP3* expression in tumors was associated with worse overall survival and this gene was also considered a strong prognostic factor for distant metastases – free survival but not for local recurrence risk (Merlo, Casalini et al. 2009). Promoter regions are potential candidates for the presence of functional single nucleotide polymorphism (SNPs), as they are involved in transcription initiation and many of the cis-acting elements that regulate gene expression possibly harbors functional polymorphisms (Hoogendoorn, Coleman et al. 2003). It is known that SNPs in the promoter region of *FOXP3* gene may affect its expression (Bassuny, Ihara et al. 2003). Since it has been previously shown that *FOXP3* is involved in breast cancer development (Zuo, Wang et

al. 2007), several studies have been conducted to investigate the *rs3761548* polymorphism in promoter region of *FOXP3* in patients with this neoplasia (Liu and Zheng 2007; Raskin, Rennert et al. 2009), but its exact role is not yet well understood.

In this context, the present report attempts to investigate if there is an association between genetic polymorphism and protein expression in *FOXP3* gene, in a search for its involvement in pathogenesis of TNBC, since we did not find any other research regarding this gene and this molecular subtype of neoplasia in a Brazilian population.

## **MATERIAL AND METHODS**

### **Human Subjects**

It was obtained paraffin embedded tissues from 50 TNBC retrospectively from 10 years diagnosed at MICROPAR Laboratory of Pathology, Londrina, PR and Cancer Hospital of Londrina (HCL), Paraná State, Brazil. Clinical staging was determined according to the Union of International Control of Cancer (UICC) classification criteria. Clinic pathological information (tumor size, lymph node involvement and nuclear grade) was obtained for breast cancer patients along with informed consent.

For comparison, blood samples from 115 women neoplasia free (the control group) were collected in the Blood Center of North Parana, Brazil. The protocol was approved by the institutional Human Research Ethics Committee of the State University of Londrina, Paraná, Brazil (CAAE N<sup>o</sup>. 0179.0.268-09- CONEP 268).

### **DNA Extraction**

For polymorphism analyses, the genomic DNA was either isolated from formalin-fixed paraffin embedded samples according to Isola, DeVries et al. (1994) protocol, for patients, or extracted from whole blood using the specific Kit Biopur (Biometrix, Curitiba, PR, Brazil), for controls. After precipitation with ethanol, all pellets were dried and resuspended in 50 µL of milli Q water and quantitated by NanoDrop 2000c® Spectrophotometer (NanoDrop Technologies, Wilmington, DE, EUA) at a wavelength of 260/280 nm.

### **Genetic Polymorphism of *FOXP3* *rs3761548***

DNA (100 ng) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) with specific primers for *FOXP3* following the GenBank accession number NT\_079573.4. The samples

were amplified using the buffer kit plus 1.25 units Taq polymerase (Invitrogen<sup>TM</sup>, Carlsbad, California, USA).

PCR conditions were: 10 min denaturation at 94 °C, 35 cycles of 45 s at 94 °C, 1 min at 67 °C and 1 min at 72 °C, and 10 min elongation at 72 °C in a thermocycler (PCR-Sprint Hybaid - Guelph, Ontario, Canada). Amplicons of 334 base pairs for *FOXP3* -3279 (A) and 333 base pairs for *FOXP3* -3279 (C) were analyzed by electrophoresis on acrylamide gel (10 %) and detected by a nonradioisotopic technique using a commercially available silver staining method (Table 1).

**Table 1:** Primers sequences and size of PCR products for genetic variant analyzed in *FOXP3* gene

Gene	Allele	Primer sequence	PCR product
<i>FOXP3</i> -3279 (C/A, rs3761548)	A	5'- CTG GCT CTC TCC CCA ACT GA -3'	334 bp
		5'- ACA GAG CCC ATC ATC AGA CTC TCT A -3'	
	C	5'- TGG CTC TCT CCC CAA CTG C -3'	333 bp
		5'- ACA GAG CCC ATC ATC AGA CTC TCT A -3'	

### Immunohistochemical Staining

For immunohistochemical analysis, it was used 5µ histological sections of breast tumor tissue embedded in paraffin. After, the samples were heated at 56 °C, and were deparaffinized in xylene and rehydrated in a graded alcohol series. Afterwards, antigen retrieval was performed with citrate buffer and were added a specific monoclonal antibody *FOXP3* in appropriate specific dilution (1/25). The slides were stabilized at room temperature for 30 minutes and washed with PBS (phosphate buffered saline) caps prior to the secondary anti-rabbit biotinylated IgG (Bio SB Inc. Santa Barbara, CA, USA). After, were added the streptavidin-peroxidase conjugate and the solution (DAB Chromogen + / + DAB Substrate buffer) (Sigma-Aldrich, USA). Counter staining were performed with Gill's hematoxylin and slide mounts in Canada balsam. Controls were performed to verify the specificity of primary antibody and normal breast tissue was analyzed in all experiments. Analysis were made with at least two pathologists in independent analysis.

## Statistical Analysis

The association study between patients and controls was performed using contingency tables to calculate the odds ratios (OR) with a confidence interval (CI) of 95 %. For *FOXP3* gene, in which the three genotypes were identified, a 3x2 contingency table was constructed, with the considered wild type genotype as reference (OR = 1.0), to determine the OR value for heterozygotes and rare genotypes, using DPP Braille Biomedical (<http://www.braile.com.br>). Also, the rare and heterozygotes for *FOXP3* gene were grouped for the presence of at least one allelic variant, considering a small number of mutants homozygous individuals in the population.

Spearman correlation and Chi square statistical tests were used to analyze immunohistochemistry, clinical histopathological and parameters using SPSS Statistics 17.0 software (SPSS inc., Chicago, Illinois, USA). A  $p$  value < 0.05 was considered statistically significant.

## Results

The median age of the patients was  $54 \pm 13$  years old. Although for some patients specific clinic pathological characteristics were not available, we observed that 83 % of the patients had nuclear grade in stages II or III, 51 % had lymph node involvement and the mean tumor size was 3.5 cm.

### Genetic polymorphisms and clinic pathological characteristics analyses

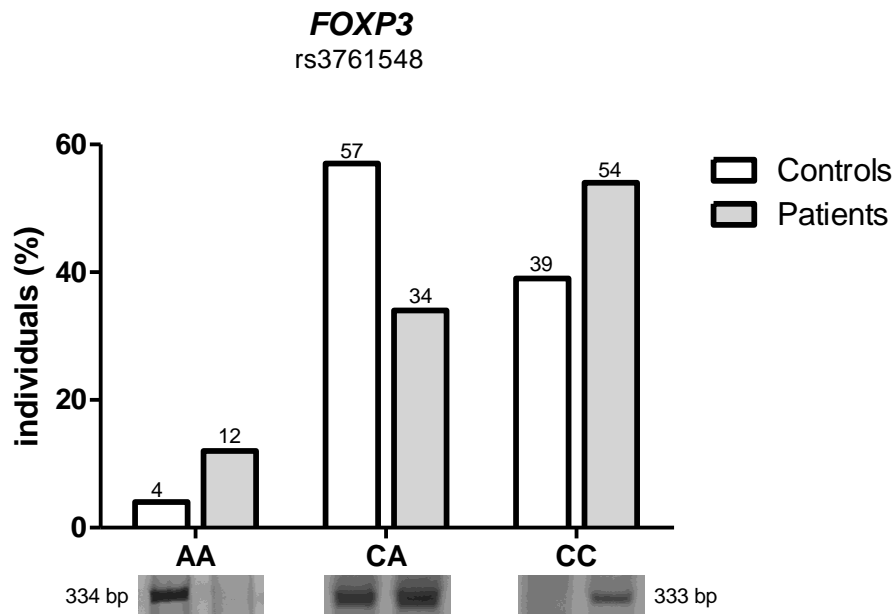
It was analyzed *FOXP3* (*rs3761548*) polymorphism in 50 TNBC patients and in 115 controls individuals free of neoplasia. The genotype frequency for *FOXP3* gene was 12 % (6/50) and 3.48 % (4/115) for AA homozygote, 34% (17/50) and 57.39 % (66/115) for CA heterozygote and 54 % (27/50) and 39.13 % (45/115) for CC homozygote, in patients and controls, respectively (Table 2 and Figure 1). In relation to allelic frequency, allele A was detected in 46 % of patients and in 61 % of controls and allele C was detected in 88 % of patients and in 96 % of controls.

The case control study for *FOXP3* gene indicated that patients with AA homozygous genotype showed a positive association with TNBC susceptibility (OR = 3.78, 95 % CI = 1.02 to 14.06).

When comparing the genotypes of *FOXP3* gene and the three clinical parameters, there was no significance with the following: tumor size ( $p = 0.482$ ;  $\rho = 0.102$ ), lymph node involvement ( $p = 0.890$ ;  $\rho = -0.023$ ) and nuclear grade ( $p = 0.682$ ;  $\rho = -0.062$ ).

**Table 2. Genotype distribution and case control association study for *FOXP3* gene**

	Controls (n=115)	Patients (n=50)	OR	IC	<i>p</i> value ( $\chi^2$ )	
<i>FOXP3</i> rs3761548	CC	45 (39%)	27 (54%)	1.00	—	—
	CA	66 (57%)	17 (34%)	0.38	0.19-0.76	0.006
	AA	4 (4%)	6 (12%)	3.78	1.02-14.06	0.035
	CA+AA	70 (61%)	23 (46%)	0.55	0.28-1.07	0.077



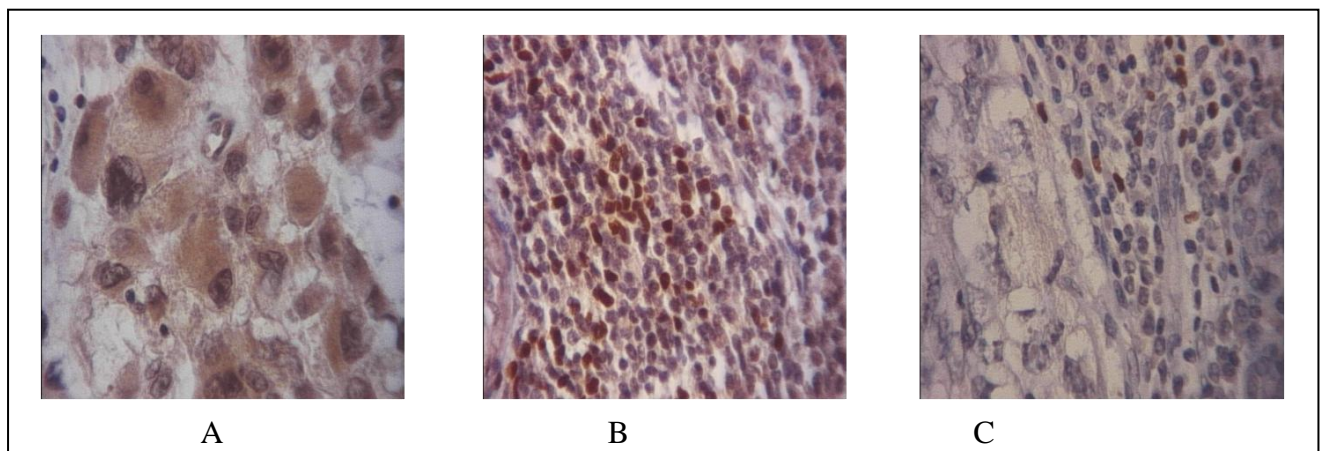
**Figure 1: *FOXP3* genotypic distribution between patients and controls.** Amplicons of 334 base pairs for A allele and 333 base pairs for C allele were analyzed by electrophoresis in polyacrilamide gel and detected by a nonradioisotopic technique.

### Immunohistochemistry and clinicopathological characteristics analysis

In our sample, we observed a markup for the tumoral FOXP3 protein expression, predominantly cytoplasmic in all patients analyzed (FIGURE 2A). A relevant fact is that most of TNBC patients (83 %) had high expression of tumoral FOXP3 protein (two or three crosses); in patients who were lymph node free of neoplasia, we also observed a strong expression, being most of them with a strength signal (three crosses), besides not significant ( $p = 0.14$ ).

The tumors size's and the nuclear degrees are equally distributed among the patients according to the signal of FOXP3 protein by immunohistochemistry ( $p = 0.42$  and  $p = 0.12$ ), respectively. In analysis correlating the presence of allelic variants and immunohistochemistry of *FOXP3* gene, we found that there was no correlation between these two parameters ( $p = 0.792$ ,  $\rho = -0.046$ ). Therefore, although not significant, we observed that carriers of allele A for *FOXP3* gene have higher expression of this protein by immunohistochemistry ( $p = 0.078$ ).

For Treg infiltration in tumor microenvironment, we had the results from 38 patients: 53 % and 42 % of them had little or none intratumoral/peritumoral infiltrate and 47 % and 58 % had a moderate or intense intratumoral/peritumoral infiltrated, respectively (FIGURE 2B,C). We did not found any significant result when analyze this parameter in relation to two of prognostic factors: lymph node involvement (intratumoral  $p = 0.310$  and peritumoral  $p = 0.679$ ) and nuclear grade (intratumoral  $p = 0.531$  and peritumoral  $p = 0.309$ ). Therefore, when we analyzed the tumor size parameter, the result indicated a significant association with intratumoral infiltrate ( $p = 0.026$ ), but not with peritumoral infiltrate ( $p = 0.598$ ).



**Figure 2. High protein expression of FOXP3 in TNBC tissues samples.** A) FOXP3 cytoplasmic expression in tumor cells; B) FOXP3 intratumoral infiltrate in Tregs and C) Peritumoral infiltrate of FOXP3 Tregs. Magnification 400X.

## Discussion

Breast cancer is a complex disease with high clinical morphological and biological heterogeneity. It is known that mammary tumors with similar clinical histology and different prognoses had different therapeutic responses (Cianfrocca and Gradishar 2009; Geyer, Marchio et al. 2009; Weigelt and Reis-Filho 2009).

The *FOXP3* gene is expressed in CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Tregs in normal physiological conditions and encodes the FOXP3 protein, which regulates the activation of T cell, and works as a transcriptional repressor and down-regulates some cytokines production in T cells (McHugh, Whitters et al. 2002; Hori, Nomura et al. 2003).

The autoimmune disease observed in both humans and mice, that lack functional *FOXP3*, indicate that this transcription factor has a crucial role in the regulation of T-cell function (Coffer and Burgering 2004). Additionally, it has been suggested that *FOXP3*-positive cells in tumors could be a novel therapeutic target that could improve outcomes for such patients (Watanabe, Oda et al. 2010). So, the high rate of somatic mutations in breast tumors, its conserved sequence in humans and the regulation of important pathways make *FOXP3* a very plausible candidate for a susceptibility gene in cancer (Raskin, Rennert et al. 2009).

In this study, we analyzed a *FOXP3* (rs3761548) polymorphism in 50 TNBC patients and in 115 controls free of neoplasia (Table 2). The results indicated a significant positive association between homozygous AA for *FOXP3* gene and TNBC development (OR = 3.78, 95 % CI = 1.02 to 14.06). Therefore, we suggested that individuals that had inherited both copies of this allelic variation had a higher susceptibility of developing this subtype of breast cancer than individuals with other genotypes. As far as we researched, there is no articles relating genetic polymorphism in *FOXP3* gene and TNBC development in a Brazilian population, but it has been proposed positive associations with other diseases such as psoriasis (Gao, Li et al. 2010) and allergic rhinitis (Zhang, Zhang et al. 2009). Raskin, Rennert et al. (2009) investigated three genetic polymorphisms in the *FOXP3* gene in patients with breast cancer, but not triple negative, and found none significant associations. Additionally, these authors postulated that the *FOXP3* gene may be involved with the hereditary breast cancer form, with high penetrance mutations. Our results are not in accordance with these authors, since we found a positive association between a specific *FOXP3* gene mutation and TNBC susceptibility (Table 2). Despite the low number of homozygotes observed in both groups, we found 12 % of AA homozygotes in TNBC group versus only 4 % in the control group, although the last one is composed of a much larger number of individuals. Thus, besides our results deserve caution by the sample size, they seems to indicate a role for *FOXP3* gene in TNBC molecular subtype.

Initially, it was postulated that *FOXP3* expression was thought to be restricted to hematopoietic tissues. However, although data are scant, *FOXP3* expression in other tissues has also been observed, including human tumor cells (Karanikas, Speletas et al. 2008).

Therefore, biological functions of *FOXP3* in tumor cells and its significance presently remain unclear. Recent data suggest that *FOXP3* expression in tumor cells could be a poor prognostic factor in breast cancer (Merlo, Casalini et al. 2009), but in contrast with these data, *FOXP3* was also recently demonstrated to be a tumor suppressor gene, acting as a transcriptional repressor of *SKP2* and *HER2*, the two breast cancer important oncogenes (Zuo, Liu et al. 2007; Zuo, Wang et al. 2007).

In the present work, additionally, we analyzed the tumoral protein expression of FOXP3 by immunohistochemistry and found that 83% of the patients analyzed had a strong expression of this gene in the tumor cells. Another study found that cancer cells were FOXP3 positive in 57 % of HER2+ breast tumors (Ladoire, Arnould et al. 2011), indicating that our sample of TNBC demonstrated high expression of this protein and that FOXP3 may have different expression levels in molecular subtypes of breast cancer, with specific prognostic implications. In our sample we did not observe associations between the expression of FOXP3 protein and the prognostic parameters: tumor size, lymph node involvement and nuclear grade. Ladoire, Arnould et al. (2011) also found no association with tumor size and lymph node involvement, however, the authors observed a significant result between the protein expression and tumor grade ( $p = 0.046$ ), which strengthens prognostic differences for the expression of FOXP3 in mammary tumor subgroups.

Another relevant point is that FOXP3 protein expression observed in our TNBC sample was predominantly cytoplasmic. According to literature data, a cytoplasmic localization of FOXP3 protein was observed in human cancer cells in various tissues (Hinz, Pagerols-Raluy et al. 2007; Karanikas, Speletas et al. 2008), including breast carcinoma (Ladoire, Arnould et al. 2011). Also, in a study concerning the *FOXP3* expression in prostate cancer cells, (Wang, Liu et al. 2009), the authors demonstrated that genetic mutations in this gene could be detected in cancer cells and restrained its expression in the cytoplasm.

It is noteworthy that experimental evidences show that *FOXP3* downregulates the oncogene *HER2* and other genes in this signaling pathway. Within this context, our results concerning FOXP3 protein expression are in accordance, since we observed a high expression in tumor cells of TNBC patients, who are exactly negative for *HER2* high expression by immunohistochemistry. Therefore, Karanikas, Speletas et al. (2008) that found a high expression of FOXP3 in MCF7 and other cell lines said that whether FOXP3 expression by tumor cells is directly related to carcinogenesis or results indirectly by activation of its normally silent gene is questionable.

Although T cells present the most important immunological response in tumor growth in early stages of cancer, they become Tregs after chronic stimulation and interactions with tumor cells, promoting rather than inhibiting cancer development and progression (Lee, Cho et al. 2013). Concerning to tumor *FOXP3* Treg infiltration, we had the results of 38 patients and observed that 47 % and 58 % of patients had a moderate or intense intratumoral and peritumoral infiltrated, respectively. Ladoire, Arnould et al. (2011) in their series of HER2+ overexpressing breast carcinoma, found that the presence of *FOXP3* Treg infiltration had no prognostic behavior. Unfortunately, we did not find any significant results when analyze this parameter in relation to the prognostic factors lymph node involvement and nuclear grade, but observed a significant association with tumor size ( $p = 0.026$ ).

When analyzed in detail, the results of tumor size and infiltration of *FOXP3* positive Tregs, we observed that the significance was attributed to tumor sizes between 1.5 to 3 cm, since we classify them in three categories (less than 1.5 cm, 1.5 to 3 cm and above 3 cm). On a multivariate analysis, Lee, Cho et al. (2013) showed that *FOXP3*-positive Tregs was an independent prognostic factor for overall survival and progression free survival with hazard ratios of 2.4 (95 % CI 1.0 – 5.6;  $p = 0.049$ ) and 2.0 (95% CI 1.1 – 3.6;  $p = 0.032$ ), respectively. So, these authors concluded that in TNBC patients *FOXP3*-positive Tregs had stronger prognostic significance. The finding of improved survival associated with highly infiltrating *FOXP3*-positive Tregs in TNBC contrasted with several other types of solid cancers, but according to them, TNBC may be differently driven by *FOXP3* via an immune mechanism. In this context, we hypothesized that Tregs *FOXP3* positive, which were present in the tumor secreting TGF- $\beta$ , could act as stimulator of growing in this intermediates tumors (1.5 to 3 cm), in relation to tumors of less than 1.5 cm. Likewise, we suggest that another mechanism could stimulate even larger sizes of tumors TNBC above 3 cm, since in our sample, the intratumoral infiltrate do not appear to be positively associated with larger tumors.

Since we found a significant association between an specific genetic variant in *FOXP3* gene and a high expression of this protein in tumor cells, which would agree with the fact that TNBC patients do not present the over-expression of *HER2* oncogene, and also a positive correlation between *FOXP3*-positive infiltrate and tumor size, we might suggest that this gene should be a promising marker of susceptibility and prognosis in human breast cancer prognosis.

## References

- Bassuny, W. M., K. Ihara, et al. (2003). "A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes." *Immunogenetics* 55(3): 149-156.
- Cho, E. Y., M. H. Chang, et al. (2011). "Potential candidate biomarkers for heterogeneity in triple-negative breast cancer (TNBC)." *Cancer Chemother Pharmacol* 68(3): 753-761.
- Cianfrocca, M. and W. Gradishar (2009). "New molecular classifications of breast cancer." *CA Cancer J Clin* 59(5): 303-313.
- Coffer, P. J. and B. M. Burgering (2004). "Forkhead-box transcription factors and their role in the immune system." *Nat Rev Immunol* 4(11): 889-899.
- Dent, R., M. Trudeau, et al. (2007). "Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence." *Clin Cancer Res* 13(15 Pt 1): 4429-4434.
- Foulkes, W. D., I. E. Smith, et al. (2010). "Triple-negative breast cancer." *N Engl J Med* 363(20): 1938-1948.
- Gao, L., K. Li, et al. (2010). "Polymorphisms in the FOXP3 gene in Han Chinese psoriasis patients." *J Dermatol Sci* 57(1): 51-56.
- Geyer, F. C., C. Marchio, et al. (2009). "The role of molecular analysis in breast cancer." *Pathology* 41(1): 77-88.
- Hinz, S., L. Pagerols-Raluy, et al. (2007). "Foxp3 expression in pancreatic carcinoma cells as a novel mechanism of immune evasion in cancer." *Cancer Res* 67(17): 8344-8350.
- Hoogendoorn, B., S. L. Coleman, et al. (2003). "Functional analysis of human promoter polymorphisms." *Hum Mol Genet* 12(18): 2249-2254.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." *Science* 299(5609): 1057-1061.
- INCA (2011). *Estimate 2012: Cancer Incidence in Brazil*. Rio de Janeiro: 118.
- Isola, J., S. DeVries, et al. (1994). "Analysis of changes in DNA sequence copy number by comparative genomic hybridization in archival paraffin-embedded tumor samples." *Am J Pathol* 145(6): 1301-1308.
- Karanikas, V., M. Speletas, et al. (2008). "Foxp3 expression in human cancer cells." *J Transl Med* 6: 19.
- Ladoire, S., L. Arnould, et al. (2011). "Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy." *Breast Cancer Res Treat* 125(1): 65-72.
- Lee, S., E. Y. Cho, et al. (2013). "Prognostic impact of FOXP3 expression in triple-negative breast cancer." *Acta Oncol* 52(1): 73-81.
- Liu, Y. and P. Zheng (2007). "FOXP3 and breast cancer: implications for therapy and diagnosis." *Pharmacogenomics* 8(11): 1485-1487.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." *Immunity* 16(2): 311-323.
- Menetrier-Caux, C., T. Curiel, et al. (2012). "Targeting regulatory T cells." *Target Oncol* 7(1): 15-28.
- Merlo, A., P. Casalini, et al. (2009). "FOXP3 Expression and Overall Survival in Breast Cancer." *Journal of Clinical Oncology* 27(11): 1746-1752.
- Presson, A. P., N. K. Yoon, et al. (2011). "Protein expression based multimarker analysis of breast cancer samples." *BMC Cancer* 11: 230.
- Raskin, L., G. Rennert, et al. (2009). "FOXP3 germline polymorphisms are not associated with risk of breast cancer." *Cancer Genet Cytogenet* 190(1): 40-42.

- Roncador, G., P. J. Brown, et al. (2005). "Analysis of FOXP3 protein expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells at the single-cell level." Eur J Immunol 35(6): 1681-1691.
- Wang, L., R. Liu, et al. (2009). "Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate." Cancer Cell 16(4): 336-346.
- Watanabe, M. A., J. M. Oda, et al. (2010). "Regulatory T cells and breast cancer: implications for immunopathogenesis." Cancer Metastasis Rev 29(4): 569-579.
- Weigelt, B. and J. S. Reis-Filho (2009). "Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy?" Nat Rev Clin Oncol 6(12): 718-730.
- Weigelt, B. and J. S. Reis-Filho (2010). "Molecular profiling currently offers no more than tumour morphology and basic immunohistochemistry." Breast Cancer Res 12 Suppl 4: S5.
- Zhang, L., Y. Zhang, et al. (2009). "Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population." Hum Immunol 70(11): 930-934.
- Zuo, T., R. Liu, et al. (2007). "FOXP3 is a novel transcriptional repressor for the breast cancer oncogene SKP2." J Clin Invest 117(12): 3765-3773.
- Zuo, T., L. Wang, et al. (2007). "FOXP3 is an X-linked breast cancer suppressor gene and an important repressor of the HER-2/ErbB2 oncogene." Cell 129(7): 1275-1286.

#### 4 CONCLUSÕES

- As pacientes com genótipo homozigoto AA para o gene *FOXP3*, apresentaram um risco aumentado de quase 4 vezes para o desenvolvimento do câncer de mama TN.
- Os diferentes genótipos de *FOXP3* não se mostraram positivamente associados aos parâmetros prognósticos: tamanho tumoral, comprometimento de linfonodos e grau nuclear do tumor.
- A maioria das pacientes apresentou expressão elevada da proteína FOXP3 nas células tumorais e esta expressão foi predominantemente citoplasmática.
- Não houve diferença significativa entre a expressão de FOXP3 tumoral por imunohistoquímica e os parâmetros tamanho de tumor, comprometimento de linfonodos e grau nuclear.
- Também não se observou nenhuma significância entre a presença da variante alélica e a expressão proteica de FOXP3 por imunohistoquímica.
- Entretanto, os infiltrados linfocitários peritumoral e intratumoral FOXP3-positivos foram elevados na maior parte das pacientes TN e especificamente o infiltrado intratumoral se mostrou positivamente associado aos tumores de tamanho 1,5-3 cm.

## 5 REFERÊNCIAS

- Alvarenga, M., A. C. Cotta, et al. (2003). "Contribuição do patologista cirúrgico para o diagnóstico das síndromes do câncer hereditário e avaliação dos tratamentos cirúrgicos profiláticos." Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial **39**: 167-177.
- Apostolou, I. and H. von Boehmer (2004). "In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells." J Exp Med **199**(10): 1401-1408.
- Baron, U., S. Floess, et al. (2007). "DNA demethylation in the human FOXP3 locus discriminates regulatory T cells from activated FOXP3(+) conventional T cells." Eur J Immunol **37**(9): 2378-2389.
- Barros ACSD, B. E., Gebrim LH, (2001). "Diagnóstico e Tratamento do Câncer de Mama " Projeto Diretrizes – Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina.
- Bassuny, W. M., K. Ihara, et al. (2003). "A functional polymorphism in the promoter/enhancer region of the FOXP3/Scurfin gene associated with type 1 diabetes." Immunogenetics **55**(3): 149-156.
- Batiston, A. P. T., Edson Mamoru; dos Santos, Mara Lisiane de Moraes; Cazola, Luiza Helena de Oliveira (2009). "MÉTODO DE DETECÇÃO DO CÂNCER DE MAMA E SUAS IMPLICAÇÕES." Cogitare Enferm **14**(1): 59-64.
- Belkaid, Y. (2007). "Regulatory T cells and infection: a dangerous necessity." Nat Rev Immunol **7**(11): 875-888.
- Belkaid, Y. and B. T. Rouse (2005). "Natural regulatory T cells in infectious disease." Nat Immunol **6**(4): 353-360.
- Bennett, C. L., M. E. Brunkow, et al. (2001). "A rare polyadenylation signal mutation of the FOXP3 gene (AAUAAA-->AAUGAA) leads to the IPEX syndrome." Immunogenetics **53**(6): 435-439.
- Bennett, C. L., J. Christie, et al. (2001). "The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3." Nat Genet **27**(1): 20-21.
- Boing, A. F., S. A. L. Vargas, et al. (2007). "A carga das neoplasias no Brasil: mortalidade e morbidade hospitalar entre 2002-2004." Revista da Associação Médica Brasileira **53**: 317-322.
- Brunkow, M. E., E. W. Jeffery, et al. (2001). "Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse." Nat Genet **27**(1): 68-73.
- Carey, L., E. Winer, et al. (2010). "Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience?" Nat Rev Clin Oncol **7**(12): 683-692.
- Carey, L. A., C. M. Perou, et al. (2006). "Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study." JAMA **295**(21): 2492-2502.
- Carotenuto, P., C. Roma, et al. (2010). "Triple negative breast cancer: from molecular portrait to therapeutic intervention." Crit Rev Eukaryot Gene Expr **20**(1): 17-34.
- Chen, W. and J. E. Konkel (2010). "TGF-beta and 'adaptive' Foxp3(+) regulatory T cells." J Mol Cell Biol **2**(1): 30-36.
- Curotto de Lafaille, M. A., A. C. Lino, et al. (2004). "CD25- T cells generate CD25+Foxp3+ regulatory T cells by peripheral expansion." J Immunol **173**(12): 7259-7268.
- Dantas, É. L. R. S., Fernando Henrique de Lima; de Carvalho, Sionara Melo de Figueiredo; Arruda, Anderson Pontes; Ribeiro, Evelane Marques; Ribeiro, Erlane Marques (2009). "Genética do Câncer Hereditário." REVISTA BRASILEIRA DE CANCEROLOGIA **55**(3): 263-269.
- Dawson, S. J., E. Provenzano, et al. (2009). "Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications." Eur J Cancer **45 Suppl 1**: 27-40.

- Dutra, M. C., M. A. Rezende, et al. (2009). "Imunofenótipo e evolução de câncer de mama: comparação entre mulheres muito jovens e mulheres na pós-menopausa." Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia **31**: 54-60.
- Elston CW, E. I. (1998). "Assessment of histologic grade. In: Elston CW, Ellis IO, editors." Systemic pathology **13**: 365-384.
- Fernandes, G. S. C., A.; Katz, A. (2009). "Câncer de mama triplo-negativo: aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos." Rev Bras Masto **19(2)**: 76-82.
- Floess, S., J. Freyer, et al. (2007). "Epigenetic control of the foxp3 locus in regulatory T cells." PLoS Biol **5(2)**: e38.
- Fontenot, J. D., M. A. Gavin, et al. (2003). "Foxp3 programs the development and function of CD4+CD25+ regulatory T cells." Nat Immunol **4(4)**: 330-336.
- Fontenot, J. D. and A. Y. Rudensky (2005). "A well adapted regulatory contrivance: regulatory T cell development and the forkhead family transcription factor Foxp3." Nat Immunol **6(4)**: 331-337.
- Fridman, W. H., J. Galon, et al. (2011). "Immune infiltration in human cancer: prognostic significance and disease control." Curr Top Microbiol Immunol **344**: 1-24.
- Godinho, E. R. and H. A. Koch (2004). "Rastreamento do câncer de mama: aspectos relacionados ao médico." Radiologia Brasileira **37**: 91-99.
- Goldhirsch, A., W. C. Wood, et al. (2011). "Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011." Ann Oncol **22(8)**: 1736-1747.
- Guembarovski, R. L. C., I.M.S. (2008). "Câncer: Uma Doença Hereditária." Genética na Escola **03.01**: 03.01.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell **100(1)**: 57-70.
- Hanel, S. A., T. P. Velavan, et al. (2011). "Novel and functional regulatory SNPs in the promoter region of FOXP3 gene in a Gabonese population." Immunogenetics **63(7)**: 409-415.
- Hill, J. A., C. Benoist, et al. (2007). "Treg cells: guardians for life." Nat Immunol **8(2)**: 124-125.
- Hoogendoorn, B., S. L. Coleman, et al. (2003). "Functional analysis of human promoter polymorphisms." Hum Mol Genet **12(18)**: 2249-2254.
- Hori, S., T. Nomura, et al. (2003). "Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3." Science **299(5609)**: 1057-1061.
- Hori, S. and S. Sakaguchi (2004). "Foxp3: a critical regulator of the development and function of regulatory T cells." Microbes Infect **6(8)**: 745-751.
- INCA (2011). Estimate 2012: Cancer Incidence in Brazil. Rio de Janeiro: 118.
- Johnson-Thompson, M. C. and J. Guthrie (2000). "Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma." Cancer **88(5 Suppl)**: 1224-1229.
- Jones, C., E. Ford, et al. (2004). "Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes." Clin Cancer Res **10(18 Pt 1)**: 5988-5997.
- Jones, M. H., C. Virtanen, et al. (2004). "Two prognostically significant subtypes of high-grade lung neuroendocrine tumours independent of small-cell and large-cell neuroendocrine carcinomas identified by gene expression profiles." Lancet **363(9411)**: 775-781.
- Ketterhagen, J. P., S. R. Quackenbush, et al. (1984). "Tumor histology as a prognostic determinant in carcinoma of the breast." Surg Gynecol Obstet **158(2)**: 120-123.
- Khattari, R., T. Cox, et al. (2003). "An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells." Nat Immunol **4(4)**: 337-342.

- Kim, H. P. and W. J. Leonard (2007). "CREB/ATF-dependent T cell receptor-induced FoxP3 gene expression: a role for DNA methylation." *J Exp Med* **204**(7): 1543-1551.
- Kronenberg, M. and A. Rudensky (2005). "Regulation of immunity by self-reactive T cells." *Nature* **435**(7042): 598-604.
- Kurebayashi, J. (2009). "Possible treatment strategies for triple-negative breast cancer on the basis of molecular characteristics." *Breast Cancer* **16**(4): 275-280.
- Ladoire, S., L. Arnould, et al. (2011). "Presence of Foxp3 expression in tumor cells predicts better survival in HER2-overexpressing breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy." *Breast Cancer Res Treat* **125**(1): 65-72.
- Maegawa, R. O. and S. C. Tang (2010). "Triple-negative breast cancer: unique biology and its management." *Cancer Invest* **28**(8): 878-883.
- Mantel, P. Y., N. Ouaked, et al. (2006). "Molecular mechanisms underlying FOXP3 induction in human T cells." *J Immunol* **176**(6): 3593-3602.
- McHugh, R. S., M. J. Whitters, et al. (2002). "CD4(+)CD25(+) immunoregulatory T cells: gene expression analysis reveals a functional role for the glucocorticoid-induced TNF receptor." *Immunity* **16**(2): 311-323.
- McPherson, K., C. M. Steel, et al. (2000). "ABC of breast diseases. Breast cancer-epidemiology, risk factors, and genetics." *BMJ* **321**(7261): 624-628.
- Melo, K. M. C., B.T.C. (2009). "Células T regulatórias: mecanismos de ação e função nas doenças humanas." *Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia* **32**: 184-188.
- Moura-Gallo, C. V. d., T. d. A. Simão, et al. (2004). "Mutações no gene TP53 em tumores malignos de mama: associação com fatores de risco e características clínico-patológicas, inclusive risco de óbito, em pacientes residentes no Rio de Janeiro." *Revista Brasileira de Epidemiologia* **7**: 167-175.
- Nagar, M., H. Vernitsky, et al. (2008). "Epigenetic inheritance of DNA methylation limits activation-induced expression of FOXP3 in conventional human CD25-CD4+ T cells." *Int Immunol* **20**(8): 1041-1055.
- Perou, C. M., T. Sorlie, et al. (2000). "Molecular portraits of human breast tumours." *Nature* **406**(6797): 747-752.
- Pinho, V. F. d. S. and E. S. F. Coutinho (2007). "Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde." *Cadernos de Saúde Pública* **23**: 1061-1069.
- Potemski, P., R. Kusinska, et al. (2005). "Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer." *Oncology* **69**(6): 478-485.
- Read, S., V. Malmstrom, et al. (2000). "Cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4 plays an essential role in the function of CD25(+)CD4(+) regulatory cells that control intestinal inflammation." *J Exp Med* **192**(2): 295-302.
- Rech, A. J., R. Mick, et al. (2010). "Homeostasis of peripheral FoxP3(+) CD4 (+) regulatory T cells in patients with early and late stage breast cancer." *Cancer Immunol Immunother* **59**(4): 599-607.
- Sakaguchi, S. (2004). "Naturally arising CD4+ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses." *Annu Rev Immunol* **22**: 531-562.
- Sakaguchi, S. (2005). "Naturally arising Foxp3-expressing CD25+CD4+ regulatory T cells in immunological tolerance to self and non-self." *Nat Immunol* **6**(4): 345-352.
- Sakaguchi, S., T. Yamaguchi, et al. (2008). "Regulatory T cells and immune tolerance." *Cell* **133**(5): 775-787.
- Schubert, L. A., E. Jeffery, et al. (2001). "Scurfin (FOXP3) Acts as a Repressor of Transcription and Regulates T Cell Activation." *Journal of Biological Chemistry* **276**(40): 37672-37679.

- Simon, R., M. Mirlacher, et al. (2003). "Tissue microarrays in cancer diagnosis." Expert Rev Mol Diagn **3**(4): 421-430.
- Sleeman, K. E., H. Kendrick, et al. (2006). "CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells." Breast Cancer Res **8**(1): R7.
- Sobin, L. H. W., CH. (2002). "TNM: classification of malignant tumours." Instituto Nacional de Câncer **6 ed.**
- Sorlie, T. (2004). "Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities." Eur J Cancer **40**(18): 2667-2675.
- Sorlie, T., C. M. Perou, et al. (2001). "Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(19): 10869-10874.
- Takahashi, T., T. Tagami, et al. (2000). "Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4." J Exp Med **192**(2): 303-310.
- Tone, Y., K. Furuuchi, et al. (2008). "Smad3 and NFAT cooperate to induce Foxp3 expression through its enhancer." Nat Immunol **9**(2): 194-202.
- Vargo-Gogola, T. and J. M. Rosen (2007). "Modelling breast cancer: one size does not fit all." Nat Rev Cancer **7**(9): 659-672.
- Vieira, D. S. C., R. M. Dufloth, et al. (2008). "Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação." Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia **30**: 42-47.
- Waldmann, H., E. Adams, et al. (2006). "Infectious tolerance and the long-term acceptance of transplanted tissue." Immunol Rev **212**: 301-313.
- Wang, L., R. Liu, et al. (2009). "Somatic single hits inactivate the X-linked tumor suppressor FOXP3 in the prostate." Cancer Cell **16**(4): 336-346.
- Wildin, R. S., S. Smyk-Pearson, et al. (2002). "Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome." J Med Genet **39**(8): 537-545.
- Workman, C. J., A. L. Szymczak-Workman, et al. (2009). "The development and function of regulatory T cells." Cell Mol Life Sci **66**(16): 2603-2622.
- Yaquub, S. and E. M. Aandahl (2009). "Inflammation versus adaptive immunity in cancer pathogenesis." Crit Rev Oncog **15**(1-2): 43-63.
- Zhang, L., Y. Zhang, et al. (2009). "Genetic association study of FOXP3 polymorphisms in allergic rhinitis in a Chinese population." Hum Immunol **70**(11): 930-934.

## **6 ANEXOS**

### 6.1 Aprovação Comitê de Ética e Consentimento Livre e Esclarecido