

(12) FASCÍCULO DE PATENTE DE INVENÇÃO

(22) Data de pedido: 2010.11.12	(73) Titular(es): INSTITUT CLAUDIUS REGAUD 20/24, RUE PONT ST. PIERRE 31000 TOULOUSE FR
(30) Prioridade(s): 2009.11.13 EP 09306096	UNIVERSITE PAUL SABATIER TOULOUSE III FR
(43) Data de publicação do pedido: 2012.09.19	CENTRE NATIONAL DE LA RECHERCHE SCIENTIFIQUE (CNRS) FR
(45) Data e BPI da concessão: 2014.08.06 212/2014	(72) Inventor(es): CHRISTOPHE CAZAUX FR JEAN-SÉBASTIEN HOFFMANN FR JEAN-CHRISTOPHE BOURDON FR ALICE MACHADO DA SILVA BR HENRI ROCHE FR
	(74) Mandatário: ALBERTO HERMÍNIO MANIQUE CANELAS RUA VÍCTOR CORDON, 14 1249-103 LISBOA PT

(54) Epígrafe: **ASSINATURA PARA A DIAGNOSE DA INSTABILIDADE GENÉTICA E DA AGRESSIVIDADE DO CANCRO DE MAMA**

(57) Resumo:

A PRESENTE INVENÇÃO SE REFERE A UM MÉTODO PARA DIAGNOSTICAR A AGRESSIVIDADE E/OU A INSTABILIDADE GENÉTICA DE UM CANCRO DE MAMA EM UM PACIENTE A PARTIR DE UMA AMOSTRA DE CANCRO DE MAMA DO REFERIDO PACIENTE, COMPREENDENDO: A) MEDIR IN VITRO O NÍVEL DE EXPRESSÃO DO GENE POLQ E O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE UM GENE DE CONTROLO NA REFERIDA AMOSTRA DE CANCRO DE MAMA DO PACIENTE; B) CALCULAR PARA O REFERIDO GENE POLQ UMA RELAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DE POLQ PARA A EXPRESSÃO DO REFERIDO GENE DE CONTROLO NA REFERIDA AMOSTRA DE CANCRO DE MAMA DO PACIENTE; C) COMPARAR A REFERIDA RELAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DA POLQ A UM VALOR LIMIAR CORRESPONDENTE, E D) DIAGNOSTICAR UM CANCRO DE MAMA AGRESSIVIDADE E INSTABILIDADE GENÉTICA SE A REFERIDA RELAÇÃO DO NÍVEL DE EXPRESSÃO DA POLQ É SUPERIOR A UM DOS VALORES LIMIARES CORRESPONDENTES. OS MICROARRANJOS DEDICADOS E OS KITS SÃO TAMBÉM DESCRITOS, ASSIM COMO UM MÉTODO DE SELEÇÃO DE UM TRATAMENTO ADEQUADO.

RESUMO**"ASSINATURA PARA A DIAGNOSE DA INSTABILIDADE GENÉTICA E DA AGRESSIVIDADE DO CANCRO DE MAMA"**

A presente invenção se refere a um método para diagnosticar a agressividade e/ou a instabilidade genética de um cancro de mama em um paciente a partir de uma amostra de cancro de mama do referido paciente, compreendendo: a) medir *in vitro* o nível de expressão do gene POLQ e o nível de expressão de um gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente; b) calcular para o referido gene POLQ uma relação do nível de expressão do nível de expressão de POLQ para a expressão do referido gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente; c) comparar a referida relação do nível de expressão da POLQ a um valor limiar correspondente, e d) diagnosticar um cancro de mama agressividade e instabilidade genética se a referida relação do nível de expressão da POLQ é superior a um dos valores limiares correspondentes. Os microarranjos dedicados e os *kits* são também descritos, assim como um método de seleção de um tratamento adequado.

DESCRIÇÃO**"ASSINATURA PARA A DIAGNOSE DA INSTABILIDADE GENÉTICA E DA AGRESSIVIDADE DO CANCRO DE MAMA"****CAMPO DA INVENÇÃO**

A presente invenção está no campo do controlo de cancro de mama, incluindo a diagnose da agressividade e da instabilidade genética do referido cancro de mama, e seleção de um tratamento apropriado. A invenção é com base na constatação de que a super-expressão de POLQ está altamente relacionada a agressividade de um tumor de mama, e deste modo a sobrevivência do paciente. A mesma super-expressão está também correlacionada à instabilidade genética, que pode então ser empregada para matar as células tumorais. A radioterapia, por exemplo, é mais eficaz no DNA que já está danificado. Da mesma maneira, os inibidores do reparo de DNA pode impedir reparação de quebras de DNA, deste modo, levando à morte da célula do tumor.

TÉCNICA ANTECEDENTE

O cancro de mama é a malignidade mais comum entre mulheres e tem uma das maiores taxas de mortalidade de todos os cancros afetando fêmeas. A maioria dos cancros de

mama aparece como uma massa de crescimento lento, indolor. Existe um número de sinais físicos que podem sugerir a presença de cancro de mama, e estes podem ser descoberto através de um exame de mama. O cancro de mama metastatiza por meio da extensão direta, e através da circulação sanguínea, e dos linfáticos.

Existe um número de métodos empregados atualmente para tratar o cancro de mama, incluindo cirurgia, radioterapia, terapia hormonal, e quimioterapia. A terapia de cancro bem sucedida é direcionada ao tumor primário e a quaisquer metástases, quer clinicamente evidente ou microscópica. Porque os tumores de mama podem ser curados com a modalidade da terapia combinada, cada um dos métodos acima pode ser empregado sozinho, ou em conjunto com uma ou mais outras terapias.

A seleção de um tratamento adequado é crucial para o paciente. É essencial saber quando usar imediatamente um protocolo de tratamento pesado e agressivo a fim de evitar a extensão de um cancro de mama agressivo. De outra forma, a sobrevivência do paciente pode ser altamente comprometida: se bem que muitas técnicas para a detecção, diagnóstico, e tratamento de cancro de mama existem, a doença permanece a maioria dos cancros mais comuns em mulheres, e uma maioria letal (Jemal e outros, Cancer Statistics 59: 225-249, 2009). Em comparação, realizando um tratamento pesado e agressivo quando não é necessário tumor transportado pelo paciente é também desvantajoso para o

paciente. Na verdade, os tratamentos pesados e agressivos sempre levam a toxicidades adversas que podem afetar significativamente a qualidade de vida do paciente. Além disso, tais tratamentos pesados e agressivos são geralmente muito dispendiosos, e devem ser, deste modo, realizados apenas quando é necessário.

Atualmente, a seleção do tratamento é baseada no estadiamento do tumor, que normalmente é realizado através do teste Tumor/ Nódulo/ Metástase (TNM) de American Joint Committee on Cancer (AJCC). O sistema TNM designa um número baseado em três categorias. "T" indica o tamanho do tumor, "N" o grau de envolvimento dos linfonodos, e "M" o grau de metástase. A mais ampla fase de um cancro é geralmente citada como um número I, II, III, IV derivado do valor TNM agrupado por prognóstico; um número mais elevado indica um cancro mais avançado e provavelmente um pior resultado:

- Etapa 0 descreve o cancro de mama não invasivo. Não se espalhou dentro da mama ou para outras partes do corpo.

- Etapa I é uma fase precoce do cancro de mama invasivo em que o tumor mede não mais do que 2 centímetros (cm) de diâmetro de nenhum dos linfonodos estão envolvidos. Nesta etapa, o cancro não se espalhou para fora da mama.

- Etapa II, subdividida em IIA e IIB, descreve os cancros de mama invasivos em que uma das seguintes é verdadeira:

- O tumor mede menos do que 2 cm, mas se espalhou para os linfonodos sob o braço

- Nenhum tumor é encontrado na mama, mas o cancro é encontrado nos linfonodos auxiliares

- O tumor está entre 2 cm e 5 cm (de cerca de 1 a 2 polegadas) e pode ter se espalhado para os linfonodos sob o braço

- O tumor é maior do que 5 cm, mas não se espalhou para quaisquer dos linfonodos

- Etapa III dos cancros de mama é subdividida em três categorias - IIIA, IIIB e IIIC e com base em um número de diferentes critérios. Por definição, a etapa III dos cancros não se espalhou (metástase) para locais distantes

- Uma etapa IIIA do tumor, por exemplo, é maior do que 5 cm e se espalhou para de um a três dos linfonodos sob o braço. Uma etapa IIIA os tumores podem ser de qualquer tamanho e se espalhado para múltiplos linfonodos. Os linfonodos formam grumos juntos e se ligam a um outro ou ao tecido circundante

- Na etapa IIIB do cancro de mama, um tumor de qualquer tamanho se espalhou para tecidos perto da mama - da pele e dos músculos do peito - e pode ter se espalhado

para os linfonodos dentro da mama ou sob o braço. A etapa IIIB também inclui cancro de mama inflamatório, um incomum, mas tipo agressivo de cancro de mama.

- Etapa IIIC do cancro é um tumor de qualquer tamanho que se espalhou:

- Para 10 ou mais linfonodos sob o braço
 - Para os linfonodos acima ou abaixo da clavícula e perto do pescoço

- Para os linfonodos dentro da mama em si e para os linfonodos sob o braço

- Etapa IV do cancro de mama se espalhou para outras partes distantes do corpo, tais como, pulmões, fígado, ossos ou cérebro.

Ao mesmo tempo que este sistema de teste e de estadiamento fornece algumas informações valiosas sobre a etapa em que o cancro de mama foi diagnosticado no paciente, falha ao identificar as etapas iniciais da progressão tumoral. Tem sido mostrado que a instabilidade genética é um dos primeiros eventos de tumorigênese (Bartkova e outros, *Nature*, 434: 864-870, 2005; Gorgoulis e outros, *Nature*, 434: 907-913, 2005). No entanto, este não pode ser detectado com o teste de TNM, mas apenas por ensaios que são difíceis para usar em uma base de rotina na clínica. Além disso, o teste de TNM não dá informação

sobre a agressividade do tumor e sua utilidade para o prognóstico é deste modo limitado. Na verdade, a fim de fazer um prognóstico fiável, é importante ser capaz de distinguir nas primeiras fases entre os tumores agressivos e não agressivos. Ao mesmo tempo em que é claro que os pacientes em etapa IV têm um prognóstico ruim, o fato é que o cancro de mama é diagnosticado em uma fase inicial não exclui a possibilidade de que tumor, embora, em fase inicial, possa ainda se desenvolver muito rapidamente. Em comparação, quando os linfonodos são invadidos por células tumorais, o teste de TNM dá um mau prognóstico e o paciente é geralmente submetido à cirurgia pesada seguida por quimioterapia intensiva. No entanto, se alguns destes pacientes estão realmente sofrendo de um cancro de mama não agressivo, a quimioterapia, que é um tratamento agressivo emutagênico, pode ser evitada sem diminuir o prognóstico de sobrevivência do paciente.

Existe deste modo uma necessidade real de melhores testes do prognóstico de cancro de mama, não só para melhorar a sobrevivência global do paciente, mas também para melhorar a sua qualidade de vida e para manter as quimioterapias agressivas e dispendiosas para os pacientes que realmente vão se beneficiar dela. A descoberta de novos testes prognósticos e confiáveis é, deste modo, um campo de pesquisa mais ativo.

Na proliferação de células normais, a replicação do DNA é realizada por 3 polimerases de DNA conhecidos como

polimerases replicantes (POLA, POLD e POLE). No entanto, 10 outras polimerases de DNA foram identificados em células humanas, que são conhecidas como polimerases especializadas e cujas funções são ainda em grande parte desconhecidas. Estas polimerases especializadas parecem ter sido mantida através da evolução por causa de sua capacidade de processar sua capacidade de processar apesar da lesão de DNA. Também aparece que estas polimerases são muito mutagênicas e que sua atividade é rigorosamente controlada.

POLQ (também conhecido como POL teta ou POLO) é uma destas polimerases especializadas de DNA, e contém um domínio de helicase na sua porção de terminal de N e um domínio polimerase em seu terminal de C. Se bem que a função desta polimerase particular especializada de DNA é ainda em grande parte desconhecida, se aparece estar envolvida na manutenção da estabilidade do genoma e no reparo de DNA (Seki e outros, EMBO J, 23: 4484-4494, 2004; Masuda e outros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 102: 13986-13991, 2005, Yoshimura e outros, Mol Cell, 24 : 115-125, 2006).

Kawamura e outros (Kawamura e outros, Int J Cancer, 109: 9-16, 2004) compararam o nível de expressão de POLQ nos diversos tecidos não tumorais, incluindo na glândula mamaria, e no pulmão (27 pacientes), no cólon (26 pacientes) e no tecido do estômago com cancro (28 pacientes). Foi descoberto que POLQ é apenas dificilmente detectável no tecido com não tumor, mas que é sobre-

expressa em uma proporção significativa de estômago, pulmão e tecidos do cancro. Os autores indicam também que a sobre-expressão de POLQ no tecido tumoral, está correlacionada com o prognóstico sobre sobrevivência. No entanto, eles não testar para o nível de expressão POLQ tanto em mama linhas de células tumorais ou de tumores de mama.

Os inventores analisaram a variação da expressão do gene em POLQ tumorais em relação adjacente a tecidos mamários normais e em comparação destes dados com a progressão da doença e características clínicas. Eles mostraram que POL Q foi significativamente superexpresso em tecidos de tumor de mama. Além disso, eles demonstraram que POLQ expressão desregulada contribuiu activamente para a progressão do tumor. Na verdade, a superexpressão POLQ leva à instabilidade genética e quebras nomeadamente de DNA.

DESCRIÇÃO DA INVENÇÃO

A presente invenção deste modo fornece um método para diagnosticar a agressividade de um cancro de mama em um paciente. De acordo com o método da invenção, os níveis de expressão elevados do gene POLQ indicam agressividade do referido cancro da mama.

Por esse motivo, a presente invenção fornece um método para diagnosticar a agressividade de um cancro de mama em um paciente a partir de uma amostra de cancro de mama do referido paciente, compreendendo:

a) medir *in vitro* o nível de expressão do gene POLQ e o nível de expressão de um gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente,

b) calcular para o referido gene POLQ uma relação do nível de expressão do nível de expressão de POLQ para a expressão do referido gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente,

c) comparar a referida relação de POLQ do nível de expressão a um valor limiar correspondente, e

d) diagnosticar um cancro de mama agressividade se a referida relação de POLQ do nível de expressão é superior a seu valor limiar correspondente.

Em particular, numa concretização, o método da invenção pode ser utilizado para prognose a sobrevivência de um paciente com um elevado número de linfonodos metastáticos. Nesta forma de realização, um elevado nível de expressão POLQ em um paciente com um elevado número de linfonodos metastáticos indica agressividade do tumor, e resulta em prognóstico pobre sobrevivência, enquanto que baixo nível de expressão POLQ em um paciente com um elevado número de invadido linfa nodos está associado a um diagnóstico muito melhor. Um número baixo de linfonodos metastáticos pode ser definido, por exemplo, como uma contagem invadido nódulo linfático igual a 1 ou menos,

enquanto um grande número de linfonodos metastáticos pode ser definido como uma contagem invadido nódulo linfático igual a 2 ou mais.

Em outra modalidade, o método da invenção pode ser utilizado para prognose a sobrevivência de um paciente que tem um tumor expressando um p53 ⁺ DNAc (a sequência não contém quaisquer mutações por referência a sequência NC 000.017-9 do GenBank). Nesta forma de realização, um elevado nível de expressão POLQ em um paciente com um tumor expressando um p53 ⁺ DNAc indica agressividade do tumor, e resulta em prognóstico pobre sobrevivência, enquanto que baixo nível de expressão POLQ em um paciente com um tumor expressando um p53 ⁺ DNAc está associado a um diagnóstico muito melhor. Com efeito, os inventores demonstraram que um baixo nível de expressão POLQ em um paciente com um tumor expressando um p53 ⁺ DNAc está associado com uma probabilidade de sobrevivência de 98%.

Em outro aspecto, o método da invenção permite a detecção de células cancerígenas visualizar instabilidade genética. Expressão desregulada de POLQ leva a danos no DNA e aumento da instabilidade cromossômica, desencadeando a ativação constitutiva do checkpoint danos γH2AX-ATL-CHK2 DNA.

Por esse motivo, a presente invenção fornece um método para diagnosticar a instabilidade genética em um cancro de mama em um paciente a partir de uma amostra de cancro de mama do referido paciente, compreendendo:

a) medir *in vitro* o nível de expressão do gene POLQ e o nível de expressão de um gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente,

b) calcular para o referido gene POLQ uma relação do nível de expressão do nível de expressão de POLQ para a expressão do referido gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente,

c) comparar a referida relação de POLQ do nível de expressão a um valor limiar correspondente, e

d) diagnosticar uma instabilidade genética do cancro de mama se a referida relação de POLQ do nível de expressão é superior a seu valor limiar correspondente.

Entende-se que ambos os métodos podem ser combinados. Por conseguinte, num aspecto adicional, a invenção refere-se a um método para diagnosticar a agressividade de um cancro da mama num paciente e para a detecção de células cancerígenas visualizar instabilidade genética. O método da invenção, portanto, apresenta a vantagem de permitir a detecção de um evento genético associado com um prognóstico de sobrevivência mau e instabilidade genética.

Tal como aqui utilizado, o termo "POLQ" refere-se ao gene humano que codifica a DNA polimerase de teta (Entrez número de identificação Gene: 10.721; referência

sequência de mRNA: NMJ99420.3; referência sequência de proteína: NP_955452.3). Além disso, a invenção abrange todas as isoformas do gene POLQ disse. Isoforma, tal como aqui utilizado, refere-se a todas as formas diferentes do gene POLQ e pode ser produzido por mutações, ou podem surgir a partir do mesmo gene por splicing alternativo. Um grande número de isoformas é causado por um polimorfismo ou SNPs, pequenas diferenças genéticas entre alelos do mesmo gene. Estes ocorrer em específicas individuais posições de nucleótidos dentro de um gene. Também incluídos dentro desta definição é a situação em que diferentes versões de RNA mensageiro são criadas a partir do mesmo gene, empregando diferentes promotores, o que provoca a transcrição para saltar exões determinados. Assim, compreende-se que os métodos da invenção não estão restritos a POLQ per se, mas também englobam isoformas POLQ um ou vários. De acordo com os métodos da invenção, o nível da expressão do gene POLQ e/ou um ou vários dos seus isoformas são medidos, e as razões de expressão são calculadas.

De acordo com a presente invenção, "agressividade" de um cancro da mama, pretende significar a propensão do referido cancro da mama para invadir a parede intestinal, linfonodos e para gerar metástases e a rapidez com que as ditas invasões podem aparecer. Agressividade do cancro da mama é, obviamente, correlacionada com a sobrevivência, eo método acima pode ser usado para a sobrevivência prognose do paciente, caso em que o diagnóstico dos resultados de agressividade em um prognóstico de sobrevivência mau e

diagnóstico da ausência de resultados de agressividade em um prognóstico de sobrevivência boa.

Tal como aqui utilizado, "instabilidade genética" de um cancro da mama, pretende significar a propensão de células tumorais das ditas cancro da mama a sofrer de danos no DNA. Instabilidade genética é a principal característica do cancro de mama em que o dano ao DNA é mais frequentes. Por "danos no DNA" significa lesão ao DNA que afecta a função normal do DNA, fazendo com que a modificação covalente do DNA ou fazendo com que ele se desvie da sua conformação helicoidal dupla normal. Danos no DNA incluem distorções estruturais que interferem com a replicação e transcrição, bem como mutações pontuais que podem interromper pares de bases e pode alterar a sequência de DNA. Em geral, quando uma célula incorre danos no DNA, o ciclo celular é preso em um de três pontos de controlo (G1/S, intra-S ou G2/M). A paragem do ciclo celular pode conduzir à activação de processos de reparação de DNA (no caso de danos no DNA relativamente menor), ou resultar na indução de apoptose (no caso de danos no DNA catastrófica).

Danos no DNA podem ser causados espontaneamente por processos endógenos, tais como a oxidação de bases e de geração de interrupções cadeia de DNA por oxigénio reactivo e os radicais livres produzidos a partir de metabolismo normal, a metilação de bases, depurinação, depyrimidination desfasamento de bases por polimerases de DNA durante a replicação do DNA, etc. Danos no DNA também pode ser

causada por insultos ambientais tais como a radiação (por exemplo, a radiação ultravioleta, raios-x, raios gama, radiação ionizante), toxinas naturais (por exemplo, as toxinas de plantas), toxinas sintéticas, fármacos (por exemplo, cancro da quimioterapia, radiação terapia), agentes alquilantes, etc danos no DNA pode levar a ou resultar de uma variedade de desordens, incluindo doenças genéticas hereditárias e distúrbios, como resultado da exposição a insultos ambientais.

Os métodos acima são realizados usando uma amostra de cancro da mama do paciente a ser testado. Em alguns casos, os métodos de acordo com a invenção podem ainda compreender um passo preliminar de recolha de uma amostra do cancro da mama a partir do paciente. Por uma "amostra de cancro de mama", é referido a uma amostra de tecido do tumor de mama. Mesmo num paciente canceroso, o tecido da mama ainda compreende tecido de tumor não saudável. A "amostra cancro da mama" deve, portanto, ser limitada ao tecido mamário tumor retirado do paciente. Disse "amostra de cancro de mama" pode ser uma amostra de biópsia ou uma amostra retirada de uma terapia cirúrgica da mama ressecção.

Além disso, os métodos de acordo com a invenção pode compreender mais um passo preliminar, entre a tomada da amostra do paciente e as etapas de a) como definido acima, correspondente à transformação da amostra cancro da mama (e opcionalmente da amostra saudável tecido mamário)

num mRNA (ou a amostra de cDNA) correspondente ou em uma amostra de proteína, que é então pronto a ser usado para medição *in vitro* dos níveis de expressão de genes no passo

a). Preparação ou extracção de RNAm (bem como retrotranscription em cDNA) ou proteínas a partir de uma amostra de tecido é apenas procedimento de rotina bem conhecidas dos peritos na arte.

Uma vez que um pronto-a-usar mRNA do cancro da mama (ou cDNA correspondente) ou amostra de proteína está disponível, a medida dos níveis de expressão POLQ de genes pode ser realizada, dependendo do tipo de transformação ea amostra pronto-a-usar disponível, quer no o RNAm (ie com base no teor de mRNA da amostra) ou ao nível da proteína (ou seja, com base no teor de proteína da amostra). Em algumas concretizações, os níveis de expressão de alguns dos genes pode ser medida no nível de RNAm, enquanto que os níveis de expressão de outros genes são medidos ao nível da proteína. Neste caso, parte da amostra do cancro da mama retirado do paciente, foi transformado em um RNAm (ou cDNA correspondente) da amostra e uma outra parte foi transformada em uma amostra de proteína. Noutras concretizações, os níveis de expressão de todos os genes testados são medidos tanto no RNAm ou ao nível da proteína.

Quando os níveis de expressão são medidos ao nível do mRNA, pode ser realizada nomeadamente usando tecnologias bem conhecidas, tais como PCR quantitativo ou tecnologias

de ácidos nucleicos microarranjo (incluindo microarranjos de cDNA e oligonucleótido). Estas tecnologias são agora utilizadas rotineiramente por aqueles peritos na arte e, portanto, não precisa ser detalhados aqui. Exemplos de formas de realização usando PCR quantitativo são descritos na secção experimental. Alternativamente, qualquer tecnologia conhecida ou futuro permitindo para avaliar os níveis de expressão de genes com base no conteúdo de mRNA pode ser usado. Por exemplo, microarranjos tecido acoplado a hibridização in situ fluorescente pode ser usado. Tissue microarranjos (também conhecido como TMAs) consistem em blocos de parafina em que até 1000 núcleos de tecidos separados são montadas em forma de matriz para permitir a análise histológica multiplex. Na técnica de microarranjo tecido, uma agulha oca é usada para remover fragmentos de tecido tão pequeno como 0,6 mm de diâmetro a partir de regiões de interesse em tecidos embebidos em parafina, como biópsias clínicas ou amostras de tumor. Estes núcleos de tecido são então inseridos num bloco de parafina receptor num padrão matriz precisamente espaçados,. Secções a partir deste bloco são cortadas com um micrótomo, montado sobre uma lâmina de microscópio e, em seguida, analisado por qualquer método de análise histológica padrão. Cada bloco de microarranjo pode ser cortado em secções 100 - 500, que podem ser submetidos a testes independentes. Testes vulgarmente empregues em microarranjo tecido incluem imuno-histoquímica, e hibridização in situ fluorescente. Para a análise ao nível de RNAm, a tecnologia de tecido microarranjo pode ser acoplado a hibridização in situ fluores-

cente.

Quando os níveis de expressão são medidos ao nível da proteína, pode ser realizada nomeadamente utilizando anticorpos específicos, em particular utilizando tecnologias bem conhecidas, tais como Western blot, ELISA ou ELISPOT, microarranjos anticorpos, ou microarranjos tecido acoplados a imuno-histoquímica.

A comparação dos níveis de expressão dos genes medidos na referida amostra do paciente de cancro da mama é feita calculando um rácio nível de expressão do nível de expressão do gene POLQ para o nível de expressão de um gene de controlo na referida amostra do paciente cancro da mama, e por comparação o rácio nível obtido expressão para um valor de limiar correspondente. O referido gene de controlo, de acordo com a presente invenção, é um gene que é expresso em todos os tipos de células. Mais especificamente, o gene de controlo de acordo com a invenção é um gene que é expresso em todas as células que constituem o peito. Em outro aspecto, o nível de expressão do gene de controlo não é afectada pelo estado da célula, isto é, o gene é expresso de controlo para o mesmo nível de uma célula saudável e em uma célula de tumor. Numa concretização específica, o gene de controlo é um gene de limpeza. Um gene de limpeza é um gene expresso em todos os tipos de células, o que proporciona uma função de base necessária para a manutenção de todos os tipos de células. Uma lista de genes humanos de limpeza pode ser encontrada

na Eisenberg et al. (Trends in Genetics 19: 362-365, 2003). Um gene de limpeza preferido de acordo com a invenção é um gene seleccionado no grupo que consiste em B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IP08 e HMBS. Um gene de limpeza mais preferida de acordo com a invenção é IP08 ou HMBS. De acordo com a presente invenção, um "valor de limiar" pretende significar um valor que permite a discriminar amostras em que a relação nível de expressão do gene de interesse corresponde a um nível de expressão do referido gene de interesse no paciente amostra cancro da mama que é baixa ou elevada. Em particular, se um gene rácio nível de expressão é inferior ou igual ao valor limiar, então o nível de expressão deste gene no paciente amostra cancro da mama é considerado baixo, enquanto que se um gene rácio nível de expressão é superior ao valor limiar, então o nível de expressão deste gene em amostra do paciente cancro da mama é considerado elevado. Para cada gene, e, dependendo do método utilizado para medir o nível de expressão dos genes, o valor de limiar óptimo pode variar. No entanto, pode ser facilmente determinada por um perito na arte com base na análise de várias amostras de controlo do cancro da mama em que o nível de expressão (baixa ou alta) é conhecido para este gene em particular, e sobre a sua comparação com a expressão de um gene de controlo, por exemplo, um gene de limpeza. Em particular, os inventores determinaram que um valor limiar única de 15,8 é particularmente útil. Os inventores demonstraram que a sobrevivência do paciente é significativamente diminuída

para os rácios de expressão de nível acima deste valor. Este valor limiar única de 15,8   especificamente útil quando o nível de expressão de todos os genes   medida na mR um nível usando PCR quantitativo.

A presente invenção diz ainda respeito a um microarranjo dedicado à aplicação dos métodos de acordo com a invenção, compreendendo no máximo 500, de preferência, no máximo, 300, no máximo 200, mais preferencialmente no máximo 150, no máximo 100, ainda mais preferencialmente no máximo 75 , no máximo, 50, no máximo, 40, no máximo, 30, no máximo, 20, na maioria das sondas 10 distintos, pelo menos, uma das quais se liga especificamente a POLQ RNAm (ou cDNA correspondente) ou proteína.

Em uma modalidade preferida, o referido microarranjo   uma micromatriz de ácido nucleico, compreendendo no máximo 500, de preferência, no máximo, 300, no máximo 200, mais preferencialmente no máximo 150, no máximo 100, ainda mais preferencialmente no máximo 75, no máximo, 50, no máximo 40, no máximo, 30, no máximo, 20, no máximo 10 sondas distintas (excluindo assim, por exemplo, microarranjos pangen micos), pelo menos, um dos quais especificamente hibrida com POLQ RNAm (ou cDNA correspondente). Disse microarranjo pode também conter pelo menos uma sonda que hibride especificamente a um gene de limpeza para além da sonda hibridizar especificamente para POLQ. Em uma modalidade, disse gene housekeeping é selecionado no grupo constituído por B2M, TFRC, YWHAZ, RPL0, 18S, GUSB, UBC,

TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IP08 e HMBS. Mais preferencialmente, o gene de limpeza está a IP08 ou o gene HMBS. De acordo com a invenção, um "microarranjo nucleico" consiste em diferentes sondas de ácido nucleico que estão ligados a um substrato, que pode ser um circuito integrado, uma lâmina de vidro ou um grânulo de microsferas de tamanho. Um microchip pode ser constituída por polímeros, plásticos, resinas, polissacarídeos, sílica ou à base de sílica materiais, de carbono, metais, vidros inorgânicos, ou nitrocelulose. Sondas podem ser ácidos nucleicos, tais como cDNAs ("cDNA microarranjo") ou oligonucleótidos ("microarranjo oligonucleótido", os oligonucleótidos que são cerca de 25 a cerca de 60 pares de bases ou menos de comprimento).

Alternativamente, numa outra forma de realização, disse microarranjo pode ser um microarranjo anticorpos, que compreende, no máximo, 500, de preferência, no máximo, 300, no máximo 200, mais preferencialmente no máximo 150, no máximo 100, ainda mais preferencialmente no máximo 75, no máximo, 50, no mais de 40 anos, no máximo, 30, no máximo, 20, na maioria dos 10 anticorpos distintos, pelo menos, um dos quais se ligam especificamente à proteína POLQ. Disse microarranjo pode também conter pelo menos um anticorpo que se liga especificamente a uma proteína de limpeza, em adição ao anticorpo se ligar especificamente à proteína POLQ. Em uma forma de realização, a referida proteína de limpeza é seleccionado no grupo que consiste no B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A,

ACTB, PGK1, HPRT1, IP08 e proteínas BLHs. Em uma modalidade preferida, a referida proteína de limpeza está a proteína IP08 ou HMBS.

Como alternativa para o ácido nucleico ou tecnologia de anticorpos microarranjo, PCR quantitativo pode ser utilizado e iniciadores de amplificação específicos para os genes a serem testadas são, assim, também é muito útil para a realização dos métodos de acordo com a invenção. A presente invenção portanto refere-se ainda a um kit para o diagnóstico de agressividade e instabilidade genética de um cancro da mama num paciente a partir de uma amostra de cancro da mama do referido paciente, compreendendo uma micromatriz dedicado, tal como descrito acima ou iniciadores de amplificação específica para POLQ. Aqui também, quando o kit compreende iniciadores de amplificação, enquanto o referido kit pode compreender iniciadores de amplificação específica para outros genes, o referido kit compreende de preferência no máximo 100, no máximo, 75, 50, no máximo, 40, no máximo 30, de preferência, no máximo, 25, no mais 20, no máximo, 15, mais preferivelmente no máximo 10, no máximo 8, no máximo, 6, ainda mais preferencialmente, no máximo, 5, no máximo 4, no máximo 3 ou mesmo 2 ou um ou mesmo nulo pares de iniciadores de amplificação específica para a outra genes que POLQ. Por exemplo, o referido kit pode compreender pelo menos um par de iniciadores de amplificação por pelo menos um gene de limpeza, para além dos iniciadores para POLQ. Em uma modalidade, disse gene housekeeping é selecionado no grupo

constituído por B2M, TFRC, YWHAZ, RPL0, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IP08 e HMBS. Em uma modalidade preferida, o referido gene de limpeza está o gene IP08 ou HMBS.

Como mencionado acima, a capacidade de prognose evolução do cancro da mama, que está ligado à sua agressividade, é muito importante para a seleção de um tratamento adequado, uma vez que os tratamentos pesados e dispendiosos com potencialmente graves efeitos adversos deve ser utilizado, em adição ao tratamento cirúrgico tradicional, cada vez que são necessárias, mas apenas quando eles são necessários. A presente invenção, portanto, também diz respeito a um método para a escolha de um tratamento adequado de cancro da mama num paciente, compreendendo:

a) diagnosticar ou não a agressividade do referido cancro de mama no referido paciente empregando o método de acordo com a invenção como descrito acima, e

b) adicionar a radioterapia ou a quimioterapia adjuvante ao tratamento cirúrgico se o referido cancro de mama é diagnosticado como agressivo na etapa a).

Em adição ao seu valor prognóstico para a agressividade de cancro da mama, os inventores também descobriram que o mesmo teste com base na análise dos níveis de expressão de POLQ também permite o diagnóstico da presença ou ausência de instabilidade genética, resultando assim no

método acima descrito para o diagnóstico de instabilidade genética. Em particular, os presentes inventores demonstraram que a expressão desregulada de POLQ está associada com um aumento da frequência de quebras de DNA. Em uma forma de realização preferida, o método da invenção é assim utilizado para diagnosticar as quebras de DNA. Instabilidade genética tal, e nomeadamente a frequência aumentada de quebras de DNA, podem ter consequências sobre a seleção de uma terapia adjuvante. Em particular, enquanto que a instabilidade genética pode favorecer mutações células tumorais e, assim, desregulação da proliferação e adesão, a presença de quebras de DNA pode também ser usado contra as células tumorais. Com efeito, para a proliferação contínua, as quebras de DNA têm de ser reparado, e as células com um elevado número de quebras de DNA são geralmente propensas à morte celular. Como resultado, enquanto que a radioterapia pode não ser eficaz em todas as circunstâncias, a sua eficiência em células tumorais que já apresentem um aumento da frequência de quebras de DNA podem ser melhoradas. Por exemplo, a radioterapia pode ser altamente eficaz contra as POLQ-superexpressando células de mama tumoral identificadas pelo método da invenção, porque estas células contêm altos níveis de quebra do DNA cromossômico e instabilidade. Da mesma forma, o uso de inibidores de reparação do DNA pode permitir para congelar as quebras de DNA e levar à morte das células tumorais.

Mais geralmente, os inventores demonstraram que a inibição do ponto de verificação danos no DNA (DDC) ou o

metabolismo do DNA leva a uma diminuição da viabilidade de POLQ-superexpressando células. Por exemplo, as células afectadas na actividade de quinase Chk2 são incapazes de detectar as POLQ lesões induzidas por sobre-expressão de DNA e/ou parar o ciclo celular em resposta à referida lesões. Da mesma forma, POLQ-superexpressando células mostram um aumento da sensibilidade à inibição do metabolismo DDC ou nucleótidos.

A presente invenção deste modo também diz respeito a um método para prognóstico da eficiência de radioterapia ou reparo de DNA DNA lesão sinalização or inibidores do metabolismo de nucleotídeo no tratamento do cancro de mama em um paciente, compreendendo:

a) diagnosticar ou não a instabilidade genética no referido cancro de mama no referido paciente empregando o método de acordo com a invenção como descrito acima, e

b) eficiência prognóstica de radioterapia ou reparo de DNA, sinalização da lesão de DNA or inibidores do metabolismo de nucleotídeo se a instabilidade genética foi diagnóstica na etapa a).

De acordo com a invenção, um "inibidor de reparação do DNA" pretende significar uma molécula que é capaz de inibir a reparação de quebras de DNA, em particular duplas quebras de DNA de cadeia. Embora esta expressão não deve ser entendido como limitativo, exemplos de inibidores de reparação de DNA incluem inibidores de

proteína de reparação de DNA PARP (ver por exemplo, WO 2004080976, WO 2005/053662, WO 2009/046205), os inibidores de histona desacetilase, tais como os descritos em PCT WO 2008/082856, e os inibidores de β Polimerase de DNA (ver WO2007001684). Um "inibidor de DDC" é uma molécula que é capaz de bloquear a actividade de qualquer das proteínas envolvidas no ponto de verificação danos no DNA. Exemplos de tais proteínas incluem ATM/ATR, Chk2 e Chk1. "Inibidores do metabolismo Nucleotide", tal como aqui utilizado, inclui todos os compostos, que resultam em um desequilíbrio das piscinas de nucleótidos, porque referidos inibidores de metabolismo de nucleótidos são, por exemplo, nucleótidos (ex: 6TG) ou porque eles inibem as enzimas de biossíntese de nucleotídeos (ex: HU).

Em outra modalidade, a presente invenção deste modo também abrange um método para o isolamento dos novos compostos capazes de inibir o reparo de DNA, sinalização da lesão de DNA ou metabolismo de nucleotídeo, o referido método compreendendo as etapas que seguem:

a) contatar um composto com uma POLQ super-expressando a célula ou com uma célula que não faz superexpressam POLQ, e

b) ensaio se o composto afecta a viabilidade da célula POLQ-superexpressão mais do que a viabilidade da célula não superexpressão POLQ.

A célula superexpressão POLQ pode ser qualquer tipo de célula em que a expressão de POLQ é desregulamentada, enquanto que a célula que não superexpressam POLQ é uma célula em que a regulação da expressão POLQ é mantida. Por exemplo, a referida célula superexpressão POLQ podem ser obtidas por transfecção de uma célula hospedeira com um vector de coluna vertebral que transporta o gene POLQ ou cDNA sob o controlo de um promotor forte ubíquo. Neste caso, a referida célula é vantajosamente a referida célula hospedeira transfectada com o vector de espinha dorsal mesmo, em que o referido vector não contém a inserção POLQ.

Em ainda outro aspecto, a invenção também se relaciona com a utilização de um ou mais de reparação do DNA, a sinalização de danos ao DNA ou inibidores metabólicos de nucleótidos para a preparação de um medicamento destinado ao tratamento de cancro da mama em pacientes cuja mama tumor sobre-expressa POLQ. De acordo com a presente invenção, um gene é considerado como "superexpresso" em uma amostra de cancro da mama se a razão entre o nível de expressão do referido gene para o nível de expressão de um gene de controlo na referida amostra cancro da mama é superior a um valor de limiar, tal como definido acima. Numa forma de realização particular, o referido valor de limiar pode ser 15,8.

A presente invenção também se refere a um método para tratar um paciente que sofre de um cancro da mama superexpressão POLQ, compreendendo sujeitar o referido

paciente a radioterapia e/ou a administração ao referido paciente uma quantidade eficaz de inibidores de reparação um minério de mais de DNA.

LEGENDAS DAS FIGURAS

Figura 1. A expressão relativa de genes do Polimerase de DNA em tumores de mama do conjunto 1 (França, n = 105). rácios de mRNA de expressão para tumor (T) e normais amostras (n) mama (T/N) foram calculados (níveis de expressão foram previamente normalizados em relação ao controlo genes). $T/N > 1$ e < 1 indicam os níveis de expressão superiores e inferiores em comparação com tumores agrupados tecidos normais, respectivamente. Os valores de p do teste exacto bilateral binomial são dadas não corrigidos; o nível de significância é avaliado usando o procedimento Benjamini 2001 para uma FDR global de 0,05. As amostras de doentes indicados pelo eixo x são classificadas na mesma ordem para cada painel. + E - repousar durante expressão mais elevada e mais baixa no tumor (T) em relação aos normais (N) os tecidos, respectivamente. Para o gráfico de representação T/N valores inferiores a 1 foram transformados nos inversas N/T valores.

Figura 2. A expressão relativa de genes do Polimerase de DNA em tumores de mama do conjunto 2 (França, n = 101). rácios de mRNA de expressão para tumor (T) e normais amostras (n) mama (T/N) foram calculados (níveis de expressão foram previamente normalizados em relação ao controlo genes). $T/N > 1$ e < 1 indicam os níveis de expressão

superiores e inferiores em comparação com tumores agrupados tecidos normais, respectivamente. Os valores de p do teste exacto bilateral binomial são dadas não corrigido; o nível de significância é avaliada usando o procedimento Benjamini 2001 para uma FDR global de 0,05. As amostras de doentes indicados pelo eixo x são classificadas na mesma ordem para cada painel. + E - repousar durante expressão mais elevada e mais baixa no tumor (T) em relação aos normais (N) os tecidos, respectivamente. Para o gráfico de representação T/N valores inferiores a 1 foram transformados nos inversas N/T valores.

Figura 3. Gene para comparação gene da expressão do gene relativa em tumores. Visualização gráfica de todas as correlações entre pares de sábios a expressão das polimerases de DNA em tumores de mama franceses (correlação não paramétrico de Spearman; (A) conjunto 1 ($n = 105$), (B) conjunto de 2 ($n = 101$)). Quanto mais próximo de 1 o coeficiente de Spearman ρ é (ilustrado por uma zona de vermelho ou amarelo, na intersecção do eixo horizontal e vertical), a maior associação entre a expressão dos dois genes considerados. Inversamente, ρ valores inferiores a 1 (ilustrado por uma zona verde) indica que as expressões sob comparação são independentes um do outro.

Figura 4. Efeito da POLQ nível de expressão gênica em cancro específico sobrevida dos pacientes. (A) de sobrevivência de Kaplan-Meier de pacientes com cancro da mama, de acordo com o nível de expressão de DNA POLQ no tumor primário. Os pacientes da coorte francês ($n = 203$ em

vez de 206, 3 amostras sem determinação POLQ de ser descartado), valores de p colhidas em cada teste log-rank são indicados. (B) de sobrevivência de Kaplan-Meier de comparação par de matrizes entre POLQ a expressão do gene no tumor da mama primário e do número de linfonodos positivos. Os pacientes da coorte francês (n = 203)). Log-rank qui-quadrado (X²) e valores de p são dadas. Pq significa POLQ e Ln para linfonodo positivo

Figura 5. Homeostase celular de POLQ excesso de expressar clones (A) Validação de clones estavelmente sobre-expressar POLQ. Extractos de células (100 ug) de células de controlo transfectadas estavelmente com um vector vazio (CTL2), bem como a partir de clones estavelmente transfectadas com cDNA POLQ (Q1, Q2 e Q3) foram separados em 5% de SDS-PAGE, electro-transferidas para membranas de PVDF e analisados por imunotransferência com anticorpos purificados por afinidade anti-POLQ (15) e anti-vinculina como um controlo interno de carregamento. Purificada POLQ (50 ng) é usado como um controlo do tamanho; (B) Consequências no ciclo celular. O número de células em cada fase do ciclo celular foi determinado por citometria de fluxo, após coloração de DNA por iodeto de propídio. Pelo menos 3 experiências independentes foram analisadas. A média e o erro padrão foram determinados e p-valores foram calculados pelo teste t de Student.

Figura 6. ATM-CHEK2 checkpoint danos no DNA das POLQ sobre-expressar clones. Quantificação do número médio de células positivas para γ -H2AX (A) e PT68-CHEK2 (B)

coloração. Controlo (CTL) clones tratados com UV (10 Jm⁻²) foram utilizados como controlos positivos. Para a quantificação, um mínimo de 100 células foi analisado em pelo menos 3 experiências independentes. A média e o erro padrão foram determinados e p-valores foram calculados por teste t de Student; (C) representativas imagens de microscopia confocal de células sobre-expressando POLQ (Q1, Q2, Q3).

Figura 7. γ -H2AX detecção. 250.000 sub-confluentes células foram colhidas em seguida sonicada. Extracto de proteína total foram resolvidos por electroforese num gel de 15% de poliacrilamida SDS. O gel foi transferido para uma membrana Hybond-P (Amersham, Arlington Heights, IL), que foi sondado com anticorpo anti-H2AX monoclonal (Upstate, Lake Placid, NY) durante a noite a 4°C. A peroxidase de rábano-cabra anticorpo anti-rato foi usado como o anticorpo secundário (Sigma, St. Louis, MO). A membrana foi então incubada com o reagente de quimioluminescência amplificada (Amersham). Quantidades equivalentes de extractos carregadas foram avaliados por imunotransferência da membrana com um anticorpo anti-actina.

Figura 8. Quebras de DNA e anomalias cromossómicas em POLQ sobre-expressar clones (A) Quantificação de metafases aberrantes em clones de controlo (CTL2 e CTL9) e em clones sobre-expressando POLQ (Q1, Q2 e Q3). As células foram recolhidas 3 horas após o tratamento Colcemid e espalha-se em metafase foram preparados. Para a quantificação, um mínimo de 100 células em metafase foi

analisado em 3 experiências independentes. A média e o erro padrão foram determinados e p-valores foram calculados pelo teste t de Student; (B) Imagens de microscopia de representação de metáfase de CTL9 e Q3 clones. As setas indicam anormalidades cromossômicas.

Figura 9. Sensibilidade a agentes alquilantes.

Sensibilidade ao fármaco foi determinada por ensaio clonogénico. A sensibilidade da POLQ superexpressão (Q1, Q2, Q3) e de controlo isogénica (CTL2, CTL5) para células de metilo metanossulfonato (MMS) e N-metil-N-nitrosourea (MNU). Sobrevivência é expressa como a eficiência de plaqueamento relativa de células tratadas com os controlos. As doses de MMS e MNU são mostradas no eixo dos x em uma escala linear, enquanto que as fracções de colónias sobreviventes estão no eixo y em escala logarítmica. Os resultados são a média +/- SD de pelo menos três experiências separadas realizadas em duplicado.

Figura 10. DNA velocidade forquilha de replicação em células sobre-expressando POLQ (A) Imagens representativas de uma fibra de DNA penteado e imunocoradas em células de controlo ou de células sobre-expressam POLQ; (B) Histogramas mostrando a replicação distribuição de velocidade garfo em um clone de controlo (CTL2) e em dois clones excesso de expressar POLQ (Q2 e Q3); (C) Comprimento total é a soma de todas as fibras Mb de DNA que foram estudadas para cada clone, "n" é o número de faixas do UDI e CldU marcados em cada clone. O valor da mediana da população é dada em kb/min. A incerteza da velocidade média

de replicação garfo é dado em unidades de desvio absoluto mediano. Mann-Whitney foi aplicado para comparar Q2 e Q3 conjuntos de dados com o controlo do experimento, CTL2.

Figura 11. Efeito da POLQ nível de expressão do gene da p53 específico de sobrevivência de pacientes. (A) Sobrevivência de Kaplan-Meier de pacientes com cancro da mama (n = 150), de acordo com o estado do gene p53 (de tipo selvagem vs mutado sequência de DNAc). Para comparar estas curvas de sobrevida, o teste de log-rank foi usado. Este teste calcula um valor de p testar a hipótese nula de que as curvas de sobrevida são idênticas nas duas populações, p valor retirado do teste log-rank é indicado. (B) Sobrevivência de Kaplan-Meier de pacientes com cancro da mama com p53 ^ tumores (n = 84) de acordo com o nível de expressão do POLQ. Para comparar estas curvas de sobrevida, o teste de log-rank foi usado. Este teste calcula um valor de p testar a hipótese nula de que as curvas de sobrevida são idênticas nas duas populações. O valor p é dado.

Figura 12. Efeito do nível de expressão do gene POLQ sobre a sensibilidade a um inibidor de Chk2. (A) Células MCF7 mostram uma maior sensibilidade a Chk2 Hidrato II inibidor (Sigma RefC3742) do que de MDA-MB231 células. A sobrevivência é determinada num ensaio clonogénico. MCF7: quadrados; MDA-MB231: diamantes (B) Expressão POLQ é maior em MCF7 que no MDA-MB231. Os níveis de expressão de genes são ensaiadas por RT-PCR. C51 é uma linha de células normais da mama.

EXEMPLOS

1. Material e métodos

1.1. Desenho do estudo, pacientes e amostras de tumor, expressão gênica diferencial

Os pacientes incluídos consistiram em um subconjunto de pacientes a partir de uma fase multicêntrica adjuvante III ensaio clínico (ensaio PACS01). Os resultados de este ensaio clínico têm sido publicados anteriormente (Roche et al J Clin Oncol 24: 5664-5671, 2006). Amostras de tumores desta coorte (n = 206) foram divididos em dois conjuntos de genotipagem (n = 101 e n = 105). Tecidos mamários normais foram obtidos na Regaud Claudius Institute (Toulouse, França) e retirados da peça cirúrgica, em mais de 3 cm do cancro da mama. Características dos pacientes e tumores da coorte estão descritos na Tabela 1.

Tabela 1: As características de linhas de base dos pacientes e tumores

Coorte Francês				
Características	Conjunto 1 (n = 101)		Conjunto 2 (n = 105)	
	n. de pacientes %		n de pacientes %	
Idade (anos)				
Média	49		50,8	
Faixa	29-64		31-64	
Cirurgia Pré-menopausal	70	69,31	58	55,24
Excisão local	60	59,41	54	51,43
Mastectomia	41	40,59	51	48,57

(continuação)

Coorte Francês				
	Conjunto 1 (n = 101)		Conjunto 2 (n = 105)	
Características	n. de pacientes %		n de pacientes %	
Tamanho do tumor patológico (mm)				
Média	23		25	
Faixa	6-70		10-150	
Tipo histológico				
Carcinoma ductal	82	81,19	80	76,19
Carcinoma lobular	12	11,88	11	10,48
Outros	7	6,96	14	13,33
Grau				
I	22	1,78	9	8,57
II	34	33,66	39	37,14
III	42	41,58	54	51,43
Não graduado	2	1,98	2	1,9
Ausente	1	0,99	1	0,95
Número de Nódulos Positivos				
≤ 1	43	42,57	30	28,57
≥ 1	58	57,42	75	71,42
Receptores estrogénicos				
Positivo	68	67,33	74	
Negativo	30	29,7	29	
Ausente	3	2,97	2	
Receptores de progesterona				
Positivo	42	1,58	41	39,05
Negativo	56	55,45	62	59,05
Ausente	3	2,97	2	1,9
HER2				
Positivo	16	15,84	13	12,38
Negativo	66	65,35	87	82,86
Ausente	19	18,81	5	4,76
Tratamento				
FEC (apenas)	49	48,51	57	54,29
FEC + TXT (apenas)	52	51,49	48	45,71
Outros	0	0	0	0
Tamoxifeno	57	56,43	67	63,8

Todas as amostras de tecido de tumor foram recolhidas e cirurgicamente snap-imediatamente congelado em azoto líquido e armazenado até extracção de RNA. RNA tumor francesas foi preparada com a mesma plataforma (IPSOGEN, Marselha, França) por meio da técnica de CsCl-almofada como descrito (Chirgwin J. et al Biochemistry 18:5294-5299, 1979). Durante o processo de extracção, todas as amostras de tumor foram controladas para celularidade tumoral suficiente (células tumorais ou seja, superiores a 50%) através da realização de hematoxilina e eosina. RA extracção a partir de 7 tecidos mamários normais foi realizada em trinta 10 µm de espessura do tecido congelado. Este método permitiu o controlo da morfologia do tecido processado para extração de RNA. As lâminas para cada amostra foram coradas com hematoxilina-eosina lâminas e analisadas por um patologista. Cada amostra de mama normal foi revisto de modo a (i) a ausência do saber de qualquer lesão neoplásica; (ii) quantificar o percentual de componentes normais do epitélio, fibroso e adiposo .. A qualidade ea quantidade de todas as amostras de RNA francesas foram avaliados utilizando o Bioanalyzer Agilent 2100 e apenas RNA apresentando um 28S/18S proporção adequada (> 1,5) foi seleccionado para análise.

Para a coorte francês, o RNA total foi transcrito inverso utilizando o Kit de alta capacidade Arquivo DNAC (Applied Biosystems). O nível de transcritos foi medido em triplicado usando o TaqMan matriz de baixa densidade (Applied Biosystems). Todos os genes estudados foram

amplificados em triplicado a partir de amostras tumorais e normais utilizando o TaqMan Universal PCR Master Mix eo TaqMan tecnologia de matriz de Baixa Densidade (Applied Biosystems). As amplificações por PCR foram realizadas com a tecnologia de matriz TaqMan de Baixa Densidade e, ou o 7900HT rápido PCR em tempo real do sistema (Toulouse, lote 1). Para a coorte francês, que a expressão do gene normalizada entre as amostras usando dois controlos (BLHs, IPOs), que foram amplificados a partir de cada DNAC. Estes dois genes de controlo foram selecionados usando o programa Genorm como o mais estável entre os 16 testados (B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IP08, HMBS) sobre a Baixa Densidade matriz de controlo TaqMan humana endógena (Applied Biosystems). As sequências de DNA de iniciadores de contexto, bem como as referências da Applied Biosystems usados para a análise de cada Polimerase de DNA e os genes de controlo estão listados (Tabela 2). Para analisar a variação de expressão, T/N razões entre valores normalizados foram calculados onde T e N correspondem, respectivamente, para o valor do tumor e mediana dos valores normais. Caso contrário, para análises relativas expressão POLQ e sobrevivência do paciente, IP08 foi escolhido como um normalizador como era o gene mais estável dos três genes de controlo escolhidos. Na verdade, os desvios calculados relacionados para definir $1/n = 101$ e set $2/n = 105$ foram os mesmos (0,0033 para 0,0031 SETL e para o conjunto 2, o teste T valor p estar de 0,6510, dados não mostrados).

Tabela 2: D Um sequências de contexto e referências AB

SEQ ID N°	ID do Ensaio	Sequência do Contexto	Símbolo do Gene	Seq Ref	Localização
1	Hs00183533_m1	AGGGGAATTGATCAGTGCAITTCAC	IP08	NM_006390,2	exon 20-21
2	Hs00609297_m1	GCGGCTGCAACGGCGGAAGAAACA	HMBS	NM_000190,3	exon 1-2
3	Hs00213524_m1	TACAACAACAGGTGTGGTATTTTC	POLA	NM_016937,1	exon 30-31
4	Hs00172491_m1	CTGTTTGAAGCGGGATGGATGGCAA	POLDI	NM_002691,1	Exon 1-2
5	Hs00173030_m1	CTTTGAAGAGGTGTGTGATGAGATT	POLE	NM_006231,2	exon 16-17
6	Hs00249411_m1	GGGAAACATGGGGTGGGTATATGGC	REVIL	NM_016316,1	exon 2-3
7	Hs00197814_m1	TCACACAATAAGGTCTCGGCAAAAC	POLH	NM_006502,1	exon 5-6
8	Hs00958495_m1	GCAGAAAGCGGGCTCCAGCACCAC	POLM	NM_013284,1	exon 6-7
9	Hs00211963_m1	GCCACGAAGGGGTCCAGATTTTATG	POLK	NM_016218,1	exon 2-3
10	Hs00161301_M1	AAAAGCCCAGGGAGATTGGTGGACG	REV3L	NM_002912,1	exon 13-14
11	Hs00203191_m1	GATTGAGCAGACAGTCCAGAAAGCA	POLL	NM_013274,2	exon 7-8
12	Hs00160263_m1	GAGTTAGTGGCATTTGGTCCATCTGC	POLB	NM_002690,1	exon 7-8
13	Hs00394916_m1	TGGAGCAGGGAAGGAGCGGCTGGCT	POLN	NM_181808,1	exon 18-19
14	Hs00200488_m1	CCAGCTGCGAGGGAGTTTCATGATCA	POLI	NM_007195,1	exon 1-2
15	Hs00198196_m1	GCCTTTCCAGGTGGTTCAATACTG	POLQ	NM_006596,3	exon 26-27

1.2. Análise Estatística

Na coorte francês, os principais parâmetros de análise, quando comparando as expressões em tecidos cancerosos foram os individuais T/N rácios normalizados para a expressão dos controlos e HMBS IPOS. Caso contrário, nas análises de expressão POLQ em relação à sobrevivência, T/N rácios de POLQ foram normalizados para IP08 só. As correlações entre genes foram avaliadas com uma correlação não paramétrico de Spearman (rho de Spearman). Além destas análises, os dados de expressão foram transformados em dados binomiais (mais ou menos do que 1): assim, pode-se

usar testes binominais exatos para avaliar a significância do gene sobre e sub-expressão definidas como grupos desequilibradas cerca de 1. Quantidades relativas de níveis de mRNA POLQ foram transformados em dados binomiais. Na coorte francês todos os tumores com níveis de expressão inferiores ou iguais a 0,063 foram definidos como a baixa expressão. Este fora corte foi definido em relação à sobrevivência de modo a identificar duas populações estatisticamente diferentes de pacientes. Disse cortado corresponde a uma relação de níveis de mRNA POLQ de 15,8. Um número baixo de linfonodos metastáticos foi definida como um nó de linfa conta igual a 1 ou menos, distinto de pacientes com 2 ou mais nós axilares metastáticos. A sobrevida cancro específica foi definido como o intervalo entre a data da cirurgia de mama ea data da morte ou último follow-up de notícias (dados censurados). Pacientes que morreram de outra causa são considerados como uma observação censurada. As taxas de sobrevivência foram estimadas de acordo com o método de Kaplan-Meier e do teste log rank foi utilizado para avaliar as diferenças entre os grupos. O modelo de Cox de regressão de riscos proporcionais usando um procedimento de seleção para trás e teste da razão de verossimilhança foi aplicado para investigar o impacto de fatores prognósticos na sobrevida cancro específica. Todas as variáveis associadas com $p < 0,05$ na análise univariada foram incluídas no modelo inicial. Todos os valores de p foram de dois lados. Para todos os testes estatísticos, as diferenças foram consideradas significativas ao nível de 5%.

1.3. Subclonagem oiPOLQ

O POLQ cDNA humano foi transferido para o vector pcDNA 3,1 (Invitrogen) em duas etapas. Primeiro, o pFast Bac HTC POLQ contendo POLQ DNAC (Seki et al. Nucleic Acids Res. 31:6117-6126, 2003) foi digerido com XhoI e RsrII para dar o N-terminal da peça de POLQ DNAC (1,2 kb). Este produto foi subsequentemente inserido em pcDNA 3,1 (Invitrogen), previamente digerido com EcoRV e XhoI. A parte C-terminal de POLQ DNAC (6,7 kb) foi então isolada por digestão do Bac pFast HTC POLQ com XhoI e SacII e inserido no vector pcDNA 3,1 já contendo a parte N-terminal da POLQ DNAC após digestão deste vector com XhoI. A sequência completa do cDNA POLQ foi então confirmada.

1.4. Engenharia celular

MRC5-SV células (ATCC) foram cultivadas e transfectadas como descrito (Pillaire et al. Ciclocelular 6: 471-7, 2007). Superexpressão imuno-POLQ foi detectada como publicado (Seki et al. Nucleic Acids Res 31: 6117-6126., 2003), utilizando proteína purificada como um controlo de tamanho.

Estudos celulares de análise de ciclo foram realizados como também publicada (Bergoglio et al. J Cell Science 115: 4413-4418, 2002). A análise do ciclocelular e estudos de citotoxicidade foram realizados como previamente

publicado (Bergoglio et al J Cell Science 115:. 4413-4418, 2002). O tratamento foi lh a 37°C durante metil metanosulfonato (MMS) e contínuo para a N-metil-N-nitrosourea (MNU). Imunodeteção de γ -H2AX e PT68-CBK2 foi realizada de acordo com Rao et al. (Rao et al. Mol Cancro Res. 5:713-24, 2007). Para cada clone, um mínimo de 100 células em metafase foram analisados em 3 experiências independentes (Bergoglio et al, Cancro Res. 62:. 3511-3514, 2002).

1.5. A análise do DNA de pentear e estatística

As experiências foram realizadas como descrito anteriormente (Pillaire et al Ciclocelular 6:. 471-477, 2007). Basicamente, o DNA é replicado primeiro marcado com dois impulsos consecutivos de nucleósidos halogenados, iododeoxyuridine (IDU) e chlorodeoxyuridine (CldU) durante 20 min cada, e, em seguida, isolado e esticado como descrito recentemente (Pillaire et al Ciclocelular 6:. 471-477, 2007). Regiões recentemente replicadas ("faixas de replicação") nas moléculas de DNA esticados pode então ser visualizado e medido por imuno coloração com anticorpos que são específicos para CldU ou CDI. No presente caso, as células foram sucessivamente rotulados durante 20 minutos com 100 μ M IDU e CldU (Sigma-Aldrich).

1.6. A sequenciação de p53 e análise de mutações

Exões 4 a 9 da p53 foram amplificados numa reação de PCR semi-nested realizada de acordo com as recomendações

do fabricante: 2 ul de cDNA foi adicionado a uma mistura contendo 45 da PCR Supermix (Invitrogen) e Gil iniciadores (5'TGA TGC TGT CCC ACG CGG ATA TTG AAC3 ') e Rev10 (5'CTT CCC AGC GGC ATC CTG CTT G3'). 1 ul do presente produto de PCR foi então adicionada a uma segunda reação de PCR com iniciadores Gil e Rev9 (5'CTT CTT TGG CTG GGG AAG GGA3 '). A reação de amplificação consistiram em um ciclo de 94°C durante 3min, seguido por 35 ciclos de 94°C durante 30 seg, 60°C durante 45sec e 72°C durante 1min30sec e um passo final de 72°C durante 8 min.

Os produtos amplificados foram purificados a partir de 1% gel de agarose com QIAquick Gel Extração Kit (Qiagen) e apresentado para sequenciamento em Ninewells instalação de análise de DNA hospitalar (Abi Analyser 3730 Genética), utilizando iniciadores Gil e MP9ER (GGA 5'CTC CCA CAG GCA CAA ACA CG3'). Sequências obtidas foram alinhadas para sequenciar p53 NC 000.017-9 do GenBank utilizando o programa Multalin (alinhamento de sequências múltiplas com agrupamento hierárquico) (Corpet F; Ácidos Nucleicos Res. 16 (22): 10881-90, 1988). As mutações foram confirmadas por re-amplificando a amostra e re-sequenciação. Somente exons 4 a 8 foram analisados (de nucleotídeo 11407-14067 em sequência NC 000017-9) Mutações foram ainda validados usando as ferramentas de validação de mutação do p53 IARC banco de dados (<http://www-p53.iarc.fr/MutationValidationCriteria.asp>) (Petitjean et al Hum Mutat 28 (6..):622-9, 2007) As sequências foram então classificados

de acordo com o tipo de mutação que continham: WT ou silencioso (0), missense (1) e Nonsense (2).

2. Resultados

2.1. POLQ é o gene da polimerase de DNA mais sobre-regulada em tumores da mama.

PCR em tempo real foi realizada para gerar perfis de expressão de genes a partir de uma série de carcinomas da mama (n = 101, Tabela 1). Os níveis de expressão relativa da polimerases de DNA de cada tumor, normalizada para o nível de expressão mediana de 7 tecidos não-tumor de mama, são mostrados na Figura 1. Os dados indicam claramente que o gene POLQ é mais altamente expresso em tecidos tumorais de quase todos os pacientes em comparação com os tecidos normais, provavelmente porque a expressão em tecidos não-tumorais é excepcionalmente baixa (Tabela 3).

Entre todos os genes da polimerase analisados, para a replicação (POLA, POLD e POLE) ou especializado (POLH, POLL, POLM, POLN, POLK, POLB, POLI, POLZ/REV3L e REV1) enzimas, POLQ apresentou o maior nível de T em relação/N expressão. A expressão de POLQ foi sobre-regulada por 3 a 26-vezes em amostras de tumor em comparação com tecidos normais. Em 70 dos 101 tumores (69,3%) expressão POLQ foi sobre-regulada por 5 vezes ou mais.

Tabela 3: valores Ct em tecidos tumorais e normais para cada gene da polimerase de DNA, tal como derivados de Q-PCR

ET1	POLA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POLM	POLK	REV3L	POLL	POLB	POLN	POLI	POLQ	IPQ 8	HMS
Tumores															
PACS01-BEG-BR001	26,89	26,95	26,50	26,96	26,83	27,76	25,42	26,55	27,88	27,33	30,85	28,36	28,89	25,44	27,30
PACS01 -AVA- BR-003	26,94	27,93	26,56	26,79	27,47	27,32	25,93	26,94	27,60	26,42	29,79	27,85	30,82	25,94	27,53
PACS01 -AVA- BR004	27,09	27,93	26,95	26,43	26,90	27,93	25,67	26,77	27,85	27,89	29,81	28,01	31,75	25,66	27,94
PACS01 -AVA- BR-005	27,87	27,96	26,93	27,30	27,82	27,73	25,99	27,41	27,87	25,93	31,59	28,74	29,21	25,90	26,95
PACS01 -AVA- BR006	27,29	27,91	27,46	26,96	27,82	28,06	26,10	26,93	27,91	27,93	30,99	28,79	30,82	26,33	28,61
PACS01 -AVA- BR009	27,22	27,07	26,90	27,82	27,89	27,91	26,81	26,63	28,49	27,93	30,84	28,99	29,85	26,71	28,34
PACS01 -BEG- BR002	27,64	27,63	26,93	26,90	26,88	27,94	25,74	26,83	27,75	27,78	28,87	27,97	32,64	25,92	27,88
PACS01 -CRJ- BR108	27,30	26,59	26,72	27,58	27,88	28,03	26,06	26,94	28,09	27,00	30,66	27,92	29,62	25,81	28,50
PACS01 -CRJ- BR109	26,92	26,92	26,93	26,98	27,58	28,25	25,82	27,32	28,37	27,83	31,87	28,87	29,01	26,11	28,94
PACS01 -CJP- BR110	26,62	26,95	26,41	26,89	26,96	27,97	25,83	27,88	27,15	27,33	29,71	27,15	30,68	25,88	28,69
PACS01 -CJP- BR111	26,98	26,55	26,92	27,22	26,05	28,71	26,96	26,69	28,78	27,89	30,95	28,91	30,96	26,15	26,88
PACS01 -CJP- BR112	27,92	27,85	27,47	27,07	27,59	27,97	25,86	26,81	27,95	27,34	29,87	27,91	32,17	26,30	28,40
PACS01 -CJP- BR114	27,63	27,68	26,90	26,80	26,91	26,83	25,20	26,66	27,54	27,11	29,79	27,99	31,63	26,05	27,94
PACS01 -CJP- BR115	26,89	26,97	26,42	26,88	26,89	26,94	25,68	27,01	27,94	26,93	28,97	28,02	30,45	25,78	28,01
PACS01 -CJP- BR116	27,50	27,75	26,89	26,73	27,61	28,31	25,89	26,58	27,52	27,57	30,63	28,02	31,77	25,92	27,90
PACS01 -CJP- BR117	26,91	27,12	26,20	26,91	27,90	26,89	25,18	26,18	27,52	27,88	30,96	26,92	31,95	25,93	29,15
PACS01 -FBA- BR092	27,65	27,12	26,88	26,89	25,92	27,97	26,60	26,75	28,49	27,79	29,15	27,00	30,94	26,82	28,88

(continuação)

ET1	POLA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO 8	HMS
<i>Tumores</i>															
PACS01 -FBA- BR094	26,95	26,96	26,67	26,79	26,89	26,92	25,44	25,85	27,95	29,30	29,12	27,72	30,76	25,58	27,91
PACS01 -FBA- BR097	27,23	27,72	26,92	26,91	26,86	27,33	25,86	26,78	27,82	28,79	29,96	27,94	30,83	25,86	27,83
PACS01 -FBA- BR101	26,83	26,93	26,59	26,89	26,85	27,86	26,62	26,92	27,83	27,49	29,32	28,25	29,47	25,83	26,88
PACS01 -FBA- BR103	27,40	27,84	26,93	27,27	27,83	27,67	26,93	27,14	27,84	28,77	30,20	27,90	30,86	26,28	27,86
PACS01 -FBA- BR105	26,67	25,60	26,29	26,70	26,91	27,06	24,79	26,23	27,35	27,80	29,03	27,84	29,44	25,16	27,85
PACS01 -FBA- BR106	27,90	27,95	27,91	26,84	26,93	27,43	25,80	26,82	27,97	29,80	26,59	27,80	31,05	25,87	27,90
PACS01 -HCL- BR119	27,93	27,87	26,91	26,81	27,76	27,48	25,87	26,87	27,94	26,93	28,78	27,73	33,69	26,43	28,84
PACS01 -HCL- BR122	26,94	25,16	25,78	27,88	27,94	28,70	26,51	26,65	27,97	26,81	30,03	29,59	28,84	25,83	27,42
PACS01 -HCL- BR123	26,68	27,02	25,30	26,27	26,89	27,32	25,90	25,79	27,56	25,89	28,88	27,19	29,51	25,37	28,04
PACS01 -HCL- BR126	26,94	26,88	25,90	26,91	27,83	27,93	25,89	26,87	27,39	27,03	31,26	28,76	28,79	25,95	27,78
PACS01 -HCL- BR127	27,63	27,75	26,89	26,64	27,36	27,86	26,15	26,88	27,95	28,84	29,86	28,94	31,50	26,83	28,87
PACS01 -HTE- BR154	27,01	26,92	25,90	26,74	27,56	26,89	25,80	26,58	27,87	26,92	29,39	27,89	31,30	25,73	28,32
PACS01 -IGR- BR132	27,21	26,97	26,85	26,78	26,92	27,81	25,56	26,86	27,25	27,56	29,01	27,93	30,69	25,90	28,50
PACS01 -IGR- BR133	26,92	27,18	26,57	26,81	27,18	27,98	25,87	27,83	27,91	28,80	29,89	28,94	29,80	25,94	27,89
PACS01 -IGR- BR135	25,75	26,36	25,49	26,71	26,88	26,95	24,85	25,95	26,91	25,94	26,86	25,98	29,81	24,96	27,00
PACS01 -IGR- BR138	25,94	25,96	24,91	26,86	26,47	26,87	25,47	26,88	27,57	27,55	28,41	26,59	27,96	25,65	26,93
PACS01 -IGR- BR139	27,83	27,83	26,92	26,90	27,88	27,64	25,91	27,78	27,73	26,89	29,31	27,63	31,06	25,87	26,91
PACS01 -IGR- BR141	27,92	27,40	26,90	26,55	27,80	27,94	26,56	26,55	28,86	28,26	30,93	29,80	29,85	25,94	28,57
PACS01 -IGR- BR142	27,84	27,96	26,94	27,68	27,47	28,02	26,39	26,94	27,92	27,98	29,47	28,37	33,91	26,81	28,84

(continuação)

ET1	POLA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO 8	HMS
<i>Tumores</i>															
PACS01 -IGR- BR143	26,81	27,44	26,31	26,77	26,88	27,46	25,88	25,87	27,42	27,06	28,89	27,89	30,71	25,93	27,68
PACS01 -IGR- BR144	27,19	27,25	26,96	26,93	27,90	27,85	26,43	26,58	27,92	27,61	30,84	28,93	31,94	26,23	28,88
PACS01 -IGR- BR145	26,97	26,99	26,86	26,84	26,84	27,76	25,82	26,88	27,42	27,89	28,73	28,01	29,92	25,90	27,68
PACS01 -IGR- BR146	26,97	26,88	26,59	26,85	26,89	27,68	26,07	26,91	27,09	26,90	30,83	28,80	29,60	26,27	27,93
PACS01 -IGR- BR147	28,26	27,59	27,95	27,89	28,56	29,84	27,42	28,18	29,66	27,69	32,58	30,56	28,89	27,01	27,65
PACS01-IGR-BR148	27,66	28,60	26,96	27,89	27,86	28,06	26,69	27,59	28,01	28,94	30,88	28,63	33,06	26,49	29,39
PACS01-IGR-BR149	27,87	27,90	27,03	27,94	27,72	28,40	26,95	27,97	28,39	27,93	30,96	30,11	30,21	26,62	27,94
PACS01-IGR-BR150	27,91	27,90	26,63	26,93	27,78	27,81	25,92	26,90	27,89	27,95	29,08	28,05	31,21	26,08	27,77
PACS01-IGR-BR151	27,88	27,74	26,92	26,85	27,85	27,91	26,16	27,42	27,80	27,22	30,73	27,82	31,85	25,91	27,93
PACS01 -IGR- BR152	25,41	26,86	25,95	25,94	25,92	26,70	24,64	25,87	26,83	25,83	26,87	27,31	29,86	24,69	27,45
PACS01 -IGR- BR153	26,90	27,43	26,20	27,41	27,23	27,90	26,84	27,84	28,56	27,66	29,84	28,89	29,96	25,94	27,96
PACS01 -JGO- BR011	27,95	27,88	27,84	27,92	27,83	27,49	26,81	27,86	28,01	27,83	30,78	28,61	31,13	26,89	28,89
PACS01 -JGO- BR015	26,95	26,62	26,39	27,26	28,37	28,85	26,91	26,81	28,94	27,89	28,97	28,78	30,10	26,92	27,56
PACS01 T-FEE- BR259	26,84	27,43	26,18	26,83	27,61	27,93	25,88	27,78	27,49	27,94	29,75	28,83	29,99	25,87	28,09
PACS01 T-HCL- BR307	27,80	27,61	26,74	26,87	26,88	27,84	26,67	26,95	28,18	28,26	29,46	27,84	31,12	25,81	28,31
PACS01 T-HCL- BR306	27,44	28,08	26,81	27,36	27,01	28,06	26,91	27,69	28,53	27,98	29,93	28,91	30,86	26,78	28,80
PACS01 T-HCL- BR309	28,74	27,92	26,80	27,51	27,09	27,86	27,95	27,87	28,70	28,74	30,00	28,55	32,52	26,74	28,91
PACS01 T-HCL- BR310	27,84	27,93	26,94	26,79	27,25	27,06	25,81	26,41	27,86	27,90	29,94	27,76	30,75	25,77	28,60
PACS01 T-HCL- BR313	27,97	28,35	27,52	27,86	27,85	28,08	26,80	27,85	28,87	28,01	30,18	28,88	31,95	26,93	29,00

(continuação)

ET1	POLA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO 8	HMS
<i>Tumores</i>															
PACS01 T-HCL- BR314	26,91	27,79	26,79	26,94	26,83	27,13	25,20	26,10	27,87	26,96	28,93	27,75	31,77	25,96	27,67
PACS01 T-HCL- BR317	27,55	28,76	26,60	27,32	27,40	27,89	25,80	26,88	27,97	28,70	29,80	27,94	32,96	26,56	28,88
PACS01 T-HCL- BR318	26,92	26,89	26,85	26,92	26,91	27,29	25,91	26,65	28,51	29,70	29,34	27,93	29,96	25,91	28,86
PACS01 T-HCL- BR310	27,56	27,61	27,44	27,09	26,66	27,86	25,55	26,88	28,88	28,77	29,25	27,68	30,73	25,92	27,95
PACS01 T-HTE- BR256	26,12	26,86	25,35	26,58	26,72	27,43	25,85	27,82	27,83	26,16	28,08	27,69	28,93	25,41	27,85
PACS01 T-IGR- BR260	27,35	28,10	27,00	27,17	27,93	27,84	26,87	27,80	28,41	28,51	30,87	28,76	33,78	26,24	28,93
PACS01 T-IGR- BR261	26,73	27,35	25,84	27,68	27,29	27,78	26,80	26,58	28,76	25,74	31,81	27,60	29,70	26,97	27,90
PACS01 T-IGR- BR262	26,93	26,86	26,57	27,89	26,92	28,19	27, 2	27,87	27,96	27,87	31,02	27,87	30,00	26,19	26,92
PACS01 T-IGR- BR265	27,60	27,97	26,88	27,21	27,32	27,87	26,31	26,85	27,93	27,93	29,89	27,82	32,28	25,92	27,97
PACS01 T-IGR- BR266	26,92	27,39	26,63	26,92	27,91	27,56	26,81	27,26	27,73	27,81	30,76	28,75	28,85	26,64	27,79
PACS01 T-IGR- BR267	27,64	27,84	27,65	27,90	27,67	27,93	26,07	26,71	28,48	26,91	30,28	27,39	31,57	26,48	28,42
PACS01 T-IGR- BR268	26,95	27,00	26,94	27,97	27,86	27,88	26,42	27, 5	27,92	26,90	30,90	27,02	29,90	25,96	27,87
PACS01 T-IGR- BR270	26,90	27,65	26,86	27,64	26,69	27,92	26,55	26,74	28,70	26,00	28,66	27,88	31,89	25,86	27,84
PACS01 T-IGR BR272	27,54	27,89	26,82	27,85	26,94	27,74	26,96	26,88	28,94	27,61	29,83	29,78		26,45	28,85
PACS01 T-IGR- BR273	26,72	27,31	26,04	27,87	26,91	27,41	26,22	27,39	27,89	27,91	29,53	27,63	29,86	25,91	27,89
PACS01 T-IGR- BR274	27,96	27,82	26,81	27,49	27,25	27,89	26,68	26,82	28,18	28,57	30,83	28,97	31,87	26,22	28,85
PACS01 T-IGR- BR275	26,95	26,90	25,90	27,84	26,91	28,08	26,71	27,91	29,84	27,85	31,87	29,24	28,92	26,84	27,17
PACS01 T-IGR- BR277	27,11	27,43	26,65	27,60	27,17	26,60	26,4 8	27,97	28,60	27,81	30, 8	27,97	30,82	25,90	27,91
PACS01 T-IGR- BR278	27,87	27,82	27,76	27,92	27,66	28,63	27,07	28,68	27,91	27,90	31,87	28,86	30,74	26,58	27,83

(continuação)

ET1	POLA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO 8	HMS
<i>Tumores</i>															
PACS01 T-IGR- BR280	27,27	28,94	27,05	27, 71	26,92	27,87	25, 79	26,85	27,85	27,78	29,02	28,84	30,92	25,94	27,94
PACS01 T-IGR- BR282	27,81	27,66	26,99	26, 09	27,86	27,86	26,37	26,62	28,58	27,94	29,81	28,44	29,84	25,87	27,72
PACS01 T-IGR- BR283	28,94	27,98	27,59	28,26	27,94	28, 27	27, 85	28,85	28,90	29,65	31,04	28,92	31,84	26,85	28,94
PACS01 T-IGR- BR284	27,93	27,92	27,03	27,80	27,86	27,86	25,74	28,46	28,93	28,56	30,94	28,71	30,60	26,93	26,99
PACS01 T-IGR- BR286	27,54	28,82	27,89	26,69	27,19	28, 67	26,81	27, 77	28, 7 6	28,94	26, 78	28,89	31,93	26,60	28,88
PACS01 T-IGR- BR288	26,81	27,05	26,56	27,95	26,96	26,91	25,90	27, 09	27,92	29,95	31,97	27,94	30,09	25,90	27,95
PACS01 T-IGR- BR289	26,91	27,41	26,93	27,48	26,80	27,06	25,80	26,66	28,50	29,43	29,08	28,79	30,67	25,94	27,94
PACS01 T-IGR- BR290	27,49	27,83	26,86	27,87	27,83	27,74	27, 46	26,94	28, 86	29,02	30,97	28,63	29,78	25,89	28,54
PACS01 T-IGR- BR291	26,96	26,71	26,86	28,02	26,89	28,40	26,88	26,89	29,74	27,06	33,02	28,95	30,54	25,88	26,89
PACS01 T-BEG- BR294	27,46	27,50	26,34	27,95	27,62	27,81	26,43	27,87	28,48	27,90	30,73	28,89	31,39	26,91	28,63
PACS01 T-IPC- BR-298	27,96	28,16	26,93	27,82	27,93	27,58	26,83	27,86	28,92	27,92	31,90	28,63	32,88	26,83	28,86
PACS01 T-IPC- BR299	26,80	26,50	26,22	27,90	27,91	27,88	26,68	26,81	28,16	29,90	30,72	28,88	29,88	26,63	27,04
PACS01 T-IPC- BR300	27,28	27,83	26, 19	27,74	27,47	27,94	26,87	26, 68	27,88	28,39	29,89	26,96	32,52	25,92	27,82
PACS01 T-IPC- BR301	27,67	27,44	27,21	27,81	27,74	27,87	26,20	26,73	28,77	27,90	31,04	29,24	30,62	25,85	27,34
PACS01 T-IPC- BR303	26,50	25,99	25,28	26,95	26,59	27,75	25,68	26,25	28, 89	26, 94	29,55	28,83	27,95	25,26	26,71
PACS01 T-IPC- BR304	27,89	28,29	26,88	27,42	26,93	28,13	26,41	26,87	28,61	27,45	29,90	27,84	31,90	25,95	27,86
PACS01 T-IPC- BR305	26,88	27,12	25,85	26,89	26,91	27,85	25,59	26,43	27,90	28,27	28,37	27,60	31,53	25,93	28,93
PACS01 T-PPA- BR237	26,09	26,57	25,82	26,95	26,88	27,89	25,85	26,85	27,89	26, 84	28,95	28,59	28,99	25,65	27,94
PACS01 T-PPA- BR241	27,11	27,27	25,85	26,87	27,78	27,94	25,89	26,42	27,91	27,95	29,88	28,43	30,06	26,89	27,86

(continuação)

[illegible]

(continuação)

SET2	POIA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L/P OLZ	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO8	HMBS
Tumores															
PACS01 -AVA- BR007	27,81	27,89	26,89	27,88	27,90	27,68	26,53	27,88	28,51	27,82	28,70	28,66	30,93	26,75	28,93
PACS01 -AVA- BR008	26,82	27,77	26,93	27,35	27,75	28,01	26,93	28,81	28,17	27,45	30,61	28,95	29,72	26,24	28,72
PACS01 -FBA- BR085	26,60	26,89	25,93	27,02	26,97	27,44	25,88	26,63	27,92	26,89	29,75	28,79	28,75	25,88	28,54
PACS01 -FBA- BR087	27,87	27,58	26,51	26,90	27,33	27,77	25,74	26,91	27,48	28,30	29,85	28,83	33,07	26,08	27,88
PACS01 -FBA- BR089	27,92	28,85	27,50	26,78	27,50	26,87	26,84	26,96	27,88	27,46	29,04	27,91	33,24	26,51	29,30
PACS01 -FBA- BR091	27,96	27,90	26,88	26,91	27,77	27,24	26,53	27,37	28,13	25,91	30,93	28,47	29,93	25,87	27,89
PACS01 -FLE- BR024	27,26	27,19	26,07	26,91	27,54	26,98	25,86	26,58	27,87	26,86	28,90	28,34	31,95	26,82	28,87
PACS01 -FLE- BR025	26,93	27,00	25,97	26,51	26,88	26,82	25,07	25,83	27,93	27,03	28,60	27,94	30,86	25,75	27,36
PACS01 -FLE- BR027	26,93	26,94	26,53	25,47	26,81	26,90	25,37	25,90	27,88	26,52	29,79	27,81	29,35	24,99	27,55
PACS01 -FLE- BR028	27,46	26,89	26,78	25,96	27,89	26,48	25,91	26,72	27,98	27,87	28,91	28,59	29,86	25,55	26,91
PACS01 -FLE- BR029	26,84	26,93	25,83	26,83	26,85	26,86	25,90	27,89	27,83	27,85	28,78	27,59	29,54	25,82	27,57
PACS01 -FLE- BR030	26,75	26,84	25,45	26,77	26,78	26,70	25,81	27,87	27,29	26,23	28,78	27,87	29,84	25,19	27,96
PACS01 -FLE- BR031	27,42	28,03	27,48	26,82	27,37	27,78	25,87	26,73	27,73	27,76	29,96	27,82	31,74	25,93	28,83
PACS01 -FLE- BR032	26,88	27,20	26,91	26,66	26,94	27,89	25,69	26,85	26,95	26,83	29,82	28,92	29,94	25,78	28,58
PACS01 -FLE- BR033	27,65	27,84	26,79	26,83	26,72	27,01	25,38	26,77	27,86	27,84	28,87	27,71	29,76	26,04	28,64
PACS01 -FLE- BR034	27,90	27,74	26,76	26,66	26,92	27,53	25,88	26,91	28,24	28,36	29,57	27,94	30,72	25,86	27,97
PACS01 -FLE- BR035	26,93	27,82	25,84	26,91	27,80	26,38	25,88	26,91	27,88	27,81	29,98	27,50	31,36	25,80	28,61
PACS01 -FLW- BR036	26,95	26,94	26,31	26,72	26,70	26,90	25,80	26,64	27,85	26,88	29,71	27,94	30,21	25,36	28,86

(continuação)

SET2	POIA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L/P OLZ	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO8	HMBS
Tumores															
PACS01 -FLE- BR037	25,97	24,68	24,95	26,28	25,81	27,71	25,75	25,91	28,06	26,95	30,20	28,12	27,54	25,30	27,48
PACS01 -FLE- BR038	26,96	26,92	25,38	26,95	26,78	27,05	25,79	27,80	27,57	27,68	29,92	27,94	29,95	25,80	27,89
PACS01 -HBE- BR045	26,91	26,77	24, 92	26,84	26,10	26, 7 8	25,90	26, 48	27,88	26,38	28,40	27,38	27,64	25,94	26,85
PACS01 -IPC- BR018	27,68	27,82	26,89	26,70	26,79	27,85	25,84	26,86	27,86	28,86	28,91	27,79		25,93	28,82
PACS01 -IPC- BR021	26,97	26,90	26,24	26,83	26,87	27,69	25,44	25,96	27,78	28,93	29,95	27,72	30,00	25,47	27,9 4
PACS01 -IPC- BR022	27,19	27,96	26,89	26,85	27,55	27,92	25,95	26,47	27,83	27,84	30,85	27,81	33,40	25,95	28,33
PACS01 -JGO- BR012	27,50	26,83	25,86	27,71	26,00	27, 36	25,88	26,86	27,85	26,86	29,45	27,66	28,92	26,66	27,88
PACS01 -JGO- BR014	27,92	27,10	26,82	27,97	25, 91	27,88	25,93	26,99	28,92	27,69	30,70	28,92	29,83	25,86	27,80
PACS01 -JGO- BR016	26,93	27,81	26,40	26,74	26,89	27,91	25,43	26,83	27,69	26,47	29,90	27,89	29,94	25,82	28,71
PACS01 -OLA- BR041	25,95	26,68	25,83	26,91	25,99	26,90	24,37	26,71	27,43	25,43	28,87	27,50	28,52	25,19	26,91
PACS01 -OLA- BR042	26,93	26,84	26,81	27,61	26,88	27,78	26,03	27,95	28,04	25,92	30,64	27,95	29,91	25,93	27,86
PACS01 -OLA- BR043	26,97	27,03	26,40	26,98	26,84	27,30	25,79	26,77	26,86	27,47	29,25	27,49	30,92	25,84	27,89
PACS01 -OLA- BR044	27,95	27,37	26,92	28,24	27,81	28,07	28,90	27,76	27,48	27,76	30,96	27,90	30,73	26,02	26,87
PACS01 -PPA- BR047	27,10	25,88	25,93	27,51	27,93	28,97	26,89	26,04	28,83	26,83	31,75	27,64	29,04	25,79	27,30
PACS01 -PPA- BR048	28,03	27,88	26,50	26,94	27,54	27,04	26,31	26,76	28,67	26,93	31,80	27,89	29,31	26,41	28,08
PACS01 -PPA- BR049	27,33	27,91	27,71	26,89	27,30	27,91	25,93	26, 24	27,16	27,82	29,10	27,49	32,49	25,86	27,69
PACS01 -PPA- BR050	27,00	27,07	26,91	26,78	25,89	28,83	26,65	26,88	28,86	26,12	32,58	27,95	29,89	26,02	26,90
PACS01 -PPA- BR053	26,90	27,72	26,57	26,79	26,79	27,59	26,84	26,56	27,90	27,94	30,85	26,95	29,86	26,92	27,46

(continuação)

SET2	POIA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L/P OLZ	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO8	HMBS
Tumores															
PACS01 -PPA- BR057	27,77	27,89	26,94	26,98	27,02	27,87	26,83	26,91	28,90	27,19	29,82	27,59	30,97	26,35	28,89
PACS01 -PPA- BR057	26,95	26,92	26,72	26,80	27,00	26,67	26,29	26,38	27,90	26,81	29,88	27,82	31,02	25,77	27,99
PACS01 -RGA- BR061	26,73	26,90	25,95	25,89	26,39	26,86	24, 39	25, 88	26,87	26,90	28,74	26,92	30,96	24,74	26,95
PACS01 -RGA- BR062	27,07	27,78	27,73	26,95	26,95	26,90	25,93	26,91	27,46	27,63	29,51	27,57	31,11	25,93	28,80
PACS01 -RGA- BR063	26,96	27,87	26,90	26,76	27,10	27,04	26, 36	26,46	27,84	25,95	30,92	27,94	28,89	26,17	28,90
PACS01 -RGA- BR065	27,91	27,95	26,93	27,02	27,61	27,95	25,95	27,70	27,90	27,74	29,20	28,38	30,07	26,17	28,78
PACS01 -RGA- BR066	27,89	27,69	26,76	26,32	27,84	27,82	25,72	26,96	27,81	27,82	28,93	27,93	31,77	25,88	27,88
PACS01 -RGA- BR067	27,99	28,93	27,56	27,79	28, 58	27,93	26,55	27,82	28,72	28,94	29,81	29,36	31,54	26,75	29,27
PACS01 -RGA- BR069	27,41	28,89	26,90	26,44	27,73	26, 75	25,91	26,84	27,90	27,58	29,91	28,87	33,89	25,90	28,89
PACS01 -RGA- BR070	27,24	27,24	26,71	26,89	26,86	26,92	25,87	26,90	27,84	27,88	27,55	27,51	30,50	25,91	27,80
PACS01 -RGA- BR071	26,22	26,35	25,81	26,64	25,92	26,92	24,53	25, 57	26, 78	26,07	28,30	26,22	29,95	24,90	26,50
PACS01 -RGA- BR072	26,91	27,03	26,83	26,91	26,79	27,87	25,89	26,99	26,99	26,90	29,01	26,90	30,79	25,54	26,92
PACS01 -RGA- BR073	28,96	28,71	28,54	27,70	28, 53	28,80	28,59	29,95	28,44	28,93	31,69	29,81		27,94	29,86
PACS01 -RGA- BR074	26,85	27,85	26,84	25,91	26,83	27,44	25,90	27,35	26,86	26,61	29,01	27,96	32,05	25,62	27,87
PACS01 -RGA- BR075	26,66	26,93	25,61	25,74	26,40	26, 62	24, 39	25,93	26,96	26,96	28,44	27,64	28,85	25,66	27,53
PACS01 -RGA- BR076	26,82	27,77	26,86	27,81	26,85	27,87	26,62	27,93	27,94	28,89	30,73	28,55	29,85	26,40	27,44
PACS01 -RGA- BR077	26,95	27,93	26,22	26,85	27,01	27, 38	25,91	26,67	27,20	27,54	29,30	26,98	32,50	25,96	28,06
PACS01 -RGA- BR078	26,97	26,94	27,80	28,17	26,92	28,80	26,62	27,92	29,08	27,51	31,93	29,33	29,62	26,92	27,82

(continuação)

SET2	POIA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L/P OLZ	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO8	HMBS
Tumores															
PACS01 -RGA- BR079	27,56	27,80	26,89	27,07	27,66	27,95	26,07	27,47	27,56	26,95	29,67	27,91	31,19	26,77	28,64
PACS01 -RGA- BR080	26,75	26,95	25,79	26,64	26,54	26,69	24,80	26, 72	27,17	27,00	28,89	26,96	30,45	25,93	28,77
PACS01 -RGA- BR081	26,90	26,32	25,63	26,94	25,87	26,92	25,02	26,89	27,88	27,78	29,53	28,73	29,06	25,82	27,91
PACS01 T-AVA- BR167	27,95	27,64	26,90	26,97	26,93	27,12	25,52	26,64	27,87	27,96	28,61	27,98	33,00	25,76	28,70
PACS01 T-AVA- BR168	27,57	27,04	26,97	27,26	27,02	27,60	25,93	27,92	28,64	26,91	30,84	27,93	30,96	25,92	27,82
PACS01 T-AVA- BR170	27,62	26,96	26,56	26,85	27,57	27,89	25,95	26,88	27,95	27,91	29,80	27,69	30,32	26,90	28,80
PACS01 T-AVA- BR172	29,90	28,39	28,80	28,24	28,84	28,87	27,41	28, 78	28,64	28,82	32,89	28,85	33,08	27,90	28,89
PACS01 T-AVA- BR173	27,50	26,87	26, 20	27,61	26,91	27, 39	26,34	27,88	28,40	27, 84	29,92	28,90	29,26	25,86	28,47
PACS01 T-CJP- BR156	27,61	27,96	26, 13	26,69	26,87	27,58	26, 63	26,82	27,76	27,88	27,93	27,90	30,78	26,46	29,04
PACS01 T-CJP- BR159	27,63	27,40	26,85	26, 19	27,03	27,92	26,23	26,93	28,33	27,92	29,89	28,65	30,81	26,06	28,64
PACS01 T-CJP- BR160	27,91	27,84	26,78	26,80	26,78	27,73	25,92	26,44	27,82	27,72	29,80	27,95	32,67	25,90	28,90
PACS01 T-CJP- BR164	27,43	27,69	26,94	27,23	27,86	27,87	26,85	27,91	28,15	27,99	30,88	28,73	30,28	26,74	28,67
PACS01 T-CJP- BR166	27,99	27,91	26,46	26,99	27, 57	27,18	26,80	27,87	27,95	27,75	28,78	27,97	32,97	25,95	27,90
PACS01 T-FBA- BR187	26,92	27,38	25,92	26,85	26,64	27,29	25,79	26,76	27,30	25,75	28,55	26,99	29,92	25,77	28,23
PACS01 T-FBA- BR188	27,81	27,95	26,79	27,49	27, 1 8	27,89	26,73	27,94	27,89	27,90	29,75	28,15	33,85	26,94	28,96
PACS01 T-FBA- BR189	27,98	27,63	26,76	26,97	27,75	27,26	26,80	27,83	28, 86	27, 49	30, 9 9	28, 66	30,71	25,98	27,11
PACS01 T-FBA- BR190	28,60	27,80	27,88	27,42	27,84	27,96	26,82	27,85	28,88	27,53	30, 47	27,96	32,88	26,43	27,99
PACS01 T-FBA- BR192	27,34	27,55	25,88	26,88	26,93	27,29	25,64	27,92	27,51	28,92	29,45	27,30	31,19	25,94	28,73

(continuação)

SET2	POIA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L/P OLZ	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO8	HMBS
Tumores															
PACS01 T-FBA- BR193	26,91	26, 59	25,90	26,34	26,40	27,05	25,85	26, 88	26,91	26,57	28,91	27,93	28,88	25,54	26,91
PACS01 T-FBA- BR194	27,42	27,60	26,85	27,38	26, 69	26,87	25,87	28, 69	27,37	28,78	31,09	26,09	31,23	25,94	26,91
PACS01 T-FBA- BR195	24,94	26,90	25,74	24,92	25,59	25,84	24,39	25,93	26,01	26,83	29,17	27,01	29,71	23,91	27,22
PACS01 T-FBA- BR197	27,88	27,75	26,90	26,85	27,13	28,04	26,59	26,90	28,66	27,76	29,98	28,88	32,03	26,84	28,91
PACS01 T-FBA- BR198	27,52	26,91	26,72	27,25	26,77	27,40	26, 2 9	27, 41	27,60	27,70	30,28	26,92	30,85	25,95	26,29
PACS01 T-FBA- BR199	26,89	27,10	26,81	27,08	27,51	27,35	25,88	26,92	28,62	25,05	28,80	27,66	31,76	26,55	28,40
PACS01 T-FBA- BR200	28,97	27,86	26,90	27,99	27,86	28, 08	28,00	28,54	29,79	28,85	31,84	28,89	30,92	26,87	27,92
PACS01 T-FBA- BR201	27,32	27,85	25,89	27,16	27,75	26,97	26,40	26,91	27,81	27,89	28,97	27,92	29,96	25,94	27,27
PACS01 T-FBA- BR202	26,91	26,69	25,64	26,16	26,92	26,26	25,87	25,92	27, 29	28, 21	28,94	27,81	29,69	25,31	26,87
PACS01 T-FBA- BR203	27,92	27,91	26,14	27,53	26,41	27, 88	26,81	27,64	27,83	26,96	30,73	27,96	30,96	26,95	27,93
PACS01 T-FBA- BR204	27,78	26,52	25,78	27,93	26,83	27,87	26, 06	26,93	27,94	26,93	31,24	28,15	30,57	24,94	26,12
PACS01 T-FBA- BR205	27,53	26,27	26,66	27,73	26,70	27,92	26,80	27,39	28,70	26,89	29,58	28,15	28,52	26,92	27,60
PACS01 T-FBA- BR206	27,87	27,91	26,89	27,97	27, 0 8	27,81	27,56	27,90	28,93	28,78	30,93	29,90	33,01	27,61	28,78
PACS01 T-FBA- BR207	27,81	27,32	27,75	27,77	27,85	27, 55	26, 33	27, 88	27,62	27,00	31,00	27,00	31,10	25,88	28,56
PACS01 T-FBA-BR208	26,93	26,88	26,66	26,88	26,62	26,92	25,80	26,85	27, 92	25,88	30,83	27,97	29,87	25,55	27,87
PACS01 T-FLE- BR174	27,95	27, 9 8	27,38	27,91	27,52	28,73	26,93	27, 53	28,92	28,84	30,88	29,67	30,87	26,44	28,90
PACS01 T-FLE-BR179	27,89	27,60	27,80	27,81	27, 92	27, 75	26,96	26,84	28,76	27,39	30,28	28,19	31,45	26,63	28,74
PACS01 T-FLE- BR180	28,04	28,04	27,72	27,40	27,79	28,83	26,56	27,96	28,91	27,88	30,00	28,83	32,85	26,90	28,90

(continuação)

SET2	POIA1	POLD1	POLE	REV1	POLH	POIM	POLK	REV3L/P OLZ	POLL	POLB	POIN	POLI	POLQ	IPO8	HMB5
Tumores															
PACS01 T-FLE- BR181	27,21	27,77	26,99	26,89	26,90	27,59	25,94	27,54	27,86	27,89	30,31	27,43	30,50	26,86	28,54
PACS01 T-FLE- BR184	26,88	27,86	25,78	26,51	26,74	26,96	25,69	26,94	27,22	27,94	28,91	27,90	32,87	26,60	28,88
PACS01 T-FLE- BR185	26,64	26,64	26,89	26,93	27,91	24,95	26,89	27,00	27, 93	26,88	28, 47	26,97	30,02	25,86	29,15
PACS01 T-FLE-BR186	27,93	27,81	26, 84	27,16	27,85	27,89	26,69	27,37	28,69	27,76	30,82	28,97	30,72	26,20	27,98
PACS01 T-JGO- BR231	26,56	26,89	26, 42	26,94	26,38	26,95	25,80	26,90	27,90	27,57	28, 93	27,57	29, 85	25,89	27,15
PACS01 T-JGO- BR234	26,92	27,73	25,88	26,88	25,88	26,49	25,89	26,87	27,87	26,90	27,81	27,93	30,85	25,93	28,02
PACS01 T-PPA- BR235	26,94	26, 6 9	25,94	26,89	26,49	27,08	25,91	26,91	27,52	28,41	29,37	27,90	29,64	25,83	28,51
PACS01 T-PPA-BR236	26,66	26,82	25,28	26,86	26,81	27,85	26, 48	27,42	27,96	26,92	30, 86	28,44	28,86	25,94	27,91
PACS01 T-RGA- BR209	27,95	27,33	26, 17	26,97	26,85	26,97	25,75	27, 07	27,53	27,56	30,13	27,09	32,79	25,89	27,95
PACS01 T-RGA- BR211	28,84	27,98	27,89	27,72	27,79	28,23	26,94	27,85	28,96	29,86	29,82	28,91	31,96	26,72	28,85
PACS01 T-RGA- BR212	25,80	25,12	24,80	25,72	27,13	26,83	25,81	25,51	27,15	26,99	27,68	27,81	27,88	25,61	26,44
PACS01 T-RGA- BR214	27,93	26,93	26, 0 6	26,64	26, 8 8	27,05	25, 92	26,94	27,89	27, 74	30,90	27,86	32,63	25,93	27,91
PACS01 T-RGA- BR215	27,81	26,99	26,91	27,91	27,71	27,93	26,84	27, 88	28,80	27,60	29,73	28,82	30,79	26,95	27,68
PACS01 T-RGA- BR219	27,65	27,76	26,85	27,47	27,27	27,90	26,84	27,25	28,76	27,94	29,86	28,85	30,97	26,52	28,26
PACS01 T-RGA- BR220	26,95	27,00	26,74	26,96	26,87	26,89	25,79	26,92	27,87	27,34	29,86	27,60	30,98	25,82	27,86

(continuação)

<i>Tecidos Normais</i>															
G51	26,89	27,65	26,92	25,80	27,93	27,96	24,74	25,91	27,25	27,76	29,04	27,92	32,83	25,92	227,78
PORL1	29,11	29,57	29,35	27,78	28,83	29,82	27,24	28,14	29,20	28,80	32,45	29,14	33,24	27,31	28,89
GAR2	29,75	30,87	29,94	28,37	29,63	30,28	27,78	28,69	29,75	29,91	32,84	29,78	33,87	28,08	30,77
MISL3	28,92	28,92	28,78	26,94	28,78	29,32	26,44	27,90	28,95	27,84	31,75	28,66	33,89	26,91	28,91
FAV6	29,88	30,89	29,82	28,87	29,48	30,59	27,94	29,00	29,93	28,89	32,55	29,81	35,94	27,92	29,86
ROV3	29,74	29,46	29,77	27,87	29,74	29,98	26,94	28,84	29,85	28,62	32,11	28,88	34,71	27,89	29,88
ZIT5	29,31	29,75	29,46	28,77	28,88	29,67	27,61	28,92	29,88	27,99	31,95	28,78		27,67	229,64

Curiosamente, o POLN polimerase mais recentemente descoberto DNA, que é o mais estreitamente relacionados com POLQ (Marini et al J Biol Chem 278:. 32.014-32.019, 2003), também foi significativamente sobre-expressos em tumores. Observou-se também uma significativa sob-expressão de transcritos de tumor para o especializado Polimerase de DNA POLB gene (Fig. 1). Dados muito semelhantes foram encontrados quando uma análise de genotipagem independente (isto é, utilizando um lote independente de matrizes de Baixa Densidade) foi realizada em um segundo conjunto de tumores (n = 105, Tabela 1 e Fig. 2.), Exceto que, para além POLB, REV I e Polk T/N rácios eram principalmente inferior a 1 nesta série. Ao utilizar um visor de correlação não paramétrico de Spearman gráfica, verificou-se que no conjunto de tumor primeiro (n = 101), os defeitos de expressão de genes que codificam as polimerases especializados POLN, POLM, Polk, poll e POLI foram significativamente correlacionados (Fig. 3), todos Spearman > 0,5). Em contraste, o perfil de expressão específica que encontramos para POLQ não foi agrupado neste padrão, mostrando que POLQ upregulation gene em tumores era independente da regulação de outras polimerases especializados.

2.2. Intra-tumoral-regulação de POLQ está associada com um prognóstico clínico

Para investigar se os níveis de expressão de polimerases de DNA em tumores poderiam estar relacionados com a sobrevivência do paciente, um teste log-rank foi

realizado (Fig. 4). Para a coorte francês, a alta expressão do gene POLQ foi significativamente associado com pior sobrevida ($p = 0,0001$) (Fig. 4A), sugerindo fortemente que POLQ gene-regulação está associada com pior sobrevida em pacientes com cancro de mama.

Metástase linfonodal está associada a uma pior sobrevida no cancro de mama, como confirmado em ambas as nossas coortes (dados não mostrados). Resultados da coorte francês (Fig. 4B) indicam que os pacientes com elevado número de linfonodos positivos (2 ou mais nós envolvidos com cancro da mama metastático), mas a expressão POLQ baixo tinha uma taxa de sobrevivência significativamente melhor do que os pacientes com uma elevada expressão de POLQ e um elevado número de linfonodos (análise comparativa, de coorte francês, $p = 0,0001$). Deve-se ressaltar que os pacientes com um elevado número de linfonodos e um baixo nível de expressão POLQ teve uma sobrevida comparável aos pacientes com baixo número de linfonodos e alto nível de expressão POLQ (análise comparativa, de coorte francês, $p = 0,793$). Apenas o grupo de pacientes com um número elevado de linfonodos positivos e um elevado nível de expressão POLQ tinha uma sobrevivência pobre.

A associação estatisticamente significativa foi demonstrada entre POLQ expressão eo número de linfonodos positivos ($p = 0,0172$), grau histológico III ($p < 0,0001$), tamanho do tumor (Spearman $0,1611$, $p = 0,0237$), receptor de estrógeno (ER) status ($p < 0,0001$), receptor de progesterona status (PGR) ($p = 0,0034$), Ki67 expressão ($p < 0,0001$) e

HER2 status ($p = 0,0032$) (Tabela 4). Curiosamente, os pacientes exibindo "triplo-negativos" os tumores (ou seja, ER negativo, PgR negativo, negativo HER2) apresentaram maiores níveis de expressão POLQ ($p = 0,0422$). A análise multivariada foi realizado incluindo o número de linfonodos envolvidos, grau histológico, receptores hormonais, invasão vascular e de expressão POLQ. (Tabela 5). Muito interessante os modelos finais contêm envolvimento linfonodal ($HR = 2,78$, $IC95\% = [1,29; 6,01]$) e POLQ expressão ($HR = 3,33$, $IC95\% = [1,56; 7,12]$).

Tabela 4: Correlação entre POLQ expressão e estado clínico

	Baixo Pol Q (N = 138)		Elevado Pol Q (N = 65)		p
	n	%	n	%	
Idade (cl)					$p = 0,5589$ (chi -2)
< 50	64	(46,4)	33	(50,8)	
≥ 50	74	(53,6)	32	(49,2)	
Nódulos positivos					$p = 0,0172$ (chi -2)
1-3	94	(68,1)	33	(50,8)	
≥ 3	44	(31,9)	32	(49,2)	
Tipo histológico					$p = 0,0003$ (chi -2)
Carcinoma ductal	97	(70,3)	62	(95,4)	
Carcinoma Lobular	21	(15,2)	2	(3,1)	
Outros	20	(14,5)	1	(1,5)	
Grau Histológico					$p < 0,0001$ (chi -2)
I-II	89	(67,4)	12	(18,5)	
III	43	(32,6)	53	(81,5)	
Ausente	6		0		
Tamanho do tumor					$p = 0,0432$ (chi -2)
< 2 cm	40	(29,6)	10	(16,1)	
≥ 2 cm	95	(70,4)	52	(83,9)	
Ausente	3		3		

(continuação)

	Baixo Pol Q (N = 138)		Elevado Pol Q (N = 65)		p
	n	%	n	%	
Receptor estrogénico					p < 0,0001 (chi -2)
Negativo	28	(20,9)	31	(48,4)	
Positivo	106	(79,1)	33	(51,6)	
Ausente	4		1		
Receptor de Progesterona					p = 0,0034 (chi -2)
Negative	69	(51,5)	47	(73,4)	
Positive	65	(48,5)	17	(26,6)	
Ausente	4		1		
Ki 67					p < 0,0001 (chi -2)
<20 %	72	(66,1)	19	(33,9)	
>20 %	37	(33,9)	37	(66,1)	
Ausente	29		9		
Estado de HER2					p = 0,0032 (chi -2)
Negativo	109	(89,3)	41	(71,9)	
Positivo	13	(10,7)	16	(28,1)	
Ausente	16		8		
Sub-tipo molecular					p = 0,0422 (chi -2)
Triplo negativo	15	(12,7)	14	(25,0)	
Outros	103	(87,3)	42	(75,0)	
Ausente	20		9		

Tabela 5: Análise multivariada - sobrevivência a cancro específico (n = 192)

Modelo Inicial ^a				Modelo Final ^b		
HR	CI95%	p (Wald)		HR	CI95%	p (Wald)
Nº de linfonodos envolvidos						
1-3	1			1		
> 3	2,80	[1,29; 6,07]	0,009	2,78	[1,29; 6,01]	0,009
Grau histológico						
I - II	1					
III	2,33	[0,91; 6,01]		0,079	NS ^c	

(continuação)

Modelo Inicial ^a			Modelo Final ^b			
HR	CI95%	p (Wald)	HR	CI95%	p (Wald)	
Receptores de hormonas						
Negativo	1,54	[0,71; 3,36]		0,274	NS	
Positivo	1					
Invasão Vascular						
Ausência		1				
Presença	1,71	[0,81; 3,63]		0,161	NS	
Expressão de POLQ						
Baixa	1					
Elevada	1,99	[0,86; 4,61]	0,109	3,33	[1,56; 7,12]	0,002

a. Modelo inicial: incluindo todas as variáveis com p < 0.05 em análise univariada.

b. Modelo final: mesmo modelo depois algoritmo por passos retrógrado.

c. NS, não significativo após algoritmo por passos.

HR. relação hazard; CI intervalo de confiança.

2.3. Expressão ectópica de POLQ afecta ciclo-celular e proliferação

Os dados sugerem que, ou POLQ é apenas um marcador prognóstico espectador ou que poderia contribuir activamente para a progressão do tumor. Para avaliar o impacto específico da superexpressão POLQ sobre a estabilidade genética e proliferação celular geramos três recombinante POLQ clones (Q1, Q2 e Q3), que de forma estável sobre-expresso quantidades crescentes de proteína POLQ em comparação com os níveis endógenos apresentados por controlos isogênicos (Fig. 5 A). A expressão de transcritos sobre-POLQ nestes clones (variando de 10 a 15 vezes) foi comparável à observada em tumores (dados não mostrados). Análise FACS quantitativa após coloração do DNA (Fig. 5 B)

revelou que Q1, Q2 e Q3 a um maior extensão, de forma significativa acumulado na fase S em comparação com os controlos. Também foi observado um acúmulo significativo de células Q3, que expressa a maior quantidade de POLQ, na fase G2/M. Consistente com retardo em fase S e G2/M de transição, verificou-se que as células proliferaram Q3 mais lentamente em cultura exponencial, com um tempo de duplicação aumento (25,2 h) em comparação com células de controlo (22,5 h para CTL1 e 20,2 h para CTL2) ou para os clones que expressam a POLQ (20,0 h para Q1 e 22,7 h para Q2) (dados não mostrados). Tomados em conjunto, estes resultados indicam que a sobre-regulação de POLQ em células humanas afecta progressão do ciclo celular na ausência de stress externo.

2.4. Expressão ectópica POLQ induz danos no DNA ruptura sinalização mediada

Para investigar o impacto da sobre-expressão POLQ na estabilidade genômica, foi realizado a seguir uma ensaio de imunofluorescência para detectar γ -H2AX, a forma fosforilada da H2AX histonas que se acumula no DSB. Foi observado que a sobre-expressa de célula POLQ que mostram claramente um aumento significativo de 2-3 vezes na formação de focos γ -H2AX comparados aos controlos isogênicos (Fig. 6A, Q1 p <0,002; Q2, p <0,001; Q3 p <0,003). A análise por immunoblotting com-H2AX anticorpos (Fig. 7) confirmou estes dados. O nível de ativação de duas quinases transdutoras centrais na sinalização de danos ao DNA e CHK1 e CHK2, foi

então determinada. O nível de CHK1 fosforilada permaneceu inalterada na presença de elevado nível de POLQ (dados não mostrados). Em contraste, as experiências de imunodeteção analisando focos formação da forma fosforilada da CHK2 revelou uma activação significativa da quinase CHK2 em todas as três linhas de células (QL $p < 0,0018$; Q2, $p < 0,002$; Q3 $p < 0,01$) em comparação com células de controlo isogénicas (Fig. 6B). Estes dados foram confirmados por immunoblotting (dados não mostrados). Curiosamente, a análise indicou que a maioria confocal de PT68-CHK2 focos em todas as linhas POLQ sobre-expressor de células colocados com γ -H2AX focos (Fig. 6C), mostrando que quinase CHK2 activado foi localizado para sítios de danos no DNA. Isto sugere que a sobre-expressão de POLQ induz a activação do ponto de verificação danos γ H2AX-ATM-CHK2 DNA.

2.5. POLQ excesso de células que expressam exibido anormalidades cromossômicas espontâneas

Para investigar as consequências de POLQ sobre-expressão na estabilidade cromossômica foi realizada metáfase do Q1, Q2, Q3 e clones controlos isogénicos. POLQ a sobre-expressão resultou num aumento significativo na frequência de células exibindo quadriradials, de ponta a ponta, fusões e quebras de cromátídeos (25% de células em metáfase aberrantes foram detectados em células POLQ versus 15% nos controlos;. Fig. 8). Estes dados indicam que a instabilidade cromossoma espontânea ocorre em POLQ sobre-expressando células, que podem ser as consequências da quebra do DNA observada aumentada.

2.6. Dinâmica de replicação é perturbada em POLQ-superexpressão de células

Um papel proposto de POLQ em BER poderia ser que sobre-expresso POLQ interfere com a via BER e conduz a uma acumulação de danos no DNA endógeno (incluindo danos gerados por espécies reativas de oxigénio). Para testar esta hipótese, foi medida a sensibilidade do POLQ sobre-expressando células para metil-metano-sulfonato (MMS) e nitroso-N-metilureia (MNU) (fig. 9), ambos os quais induz danos no DNA reparados por RIC. Foi descoberto que POLQ sobre-expressão não afetou significativamente a sobrevivência de MMS e tratamentos MNU, sugerindo que o defeito progressão do ciclo celular, a instabilidade genética, bem como a ativação do ponto de verificação danos no DNA, não resultam de um RIC defeito de danos no DNA endógeno no POLQ sobre-expressando células.

Os resultados apresentados acima nos levaram a examinar a dinâmica de replicação em células POLQ superexpressão. Para avaliar se POLQ sobre-expressão afetou a taxa de progressão da forquilha de replicação, dinâmica molecular foi realizada pentear. Este método permitiu determinar a polaridade de forquilha de replicação *in vivo* ao nível das moléculas individuais de DNA de replicação, bem como a distribuição das velocidades de garfo (Fig. 10). A velocidade média medido em células de controlo foi de 1,699 kb/min (n = 144) enquanto que as células Q2 e Q3

exibida uma menor velocidade de 1,403 kb/min ($n = 113$) e 1,402 kb/min ($n = 200$), respectivamente. Em conclusão, POLQ sobre-expressando células exibido uma redução substancial na velocidade de replicação em geral, demonstrando que POLQ excesso constitui um potente indutor de stress replicativo em células humanas. Uma semelhante sobre-expressão de qualquer das POLB ou POLK é suficiente para impedir a progressão da replicação do garfo (Chirgwin et al Biochemistry 18:. 5294-5299, 1979).

2.7. POLQ-superexpressão células são hipersensíveis a um inibidor de Chk2

MDA-MB231 e MCF7 células de cancro da mama (ATCC) foram cultivadas em meio RPMI 1640 + médio Glutamax. Um 13,8 mM Chk2 inibidor Hidrato II (Sigma RefC3742) de solução stock foi preparada por diluição do agente em DMSO (Sigma) e armazenadas a -20°C . Esta solução foi diluída em meio de cultura para dar como indicado a concentração de fármaco final. As células foram expostas a diferentes concentrações que variam de $1\mu\text{M}$ para $150\mu\text{M}$ durante 16 horas. As células foram lavadas com tampão PBS, meio fresco foi adicionado e as células foram incubadas durante mais sete dias. As células foram fixadas com NaCl a 0,9% e coradas com violeta de cristal (Sigma C3886). Os clones contendo mais de 20 células foram contados. Para o ensaio clonogénico 400 células foram semeadas em seis poços e incubadas durante a noite. A expressão POLQ foi medida por PCR em tempo real, tal como descrito acima.

As células com superexpressão POLQ acumular danos no DNA. Disse danos desencadear a ATM-dependente checkpoint danos no DNA através da ativação da proteína quinase Chk2, eventualmente levando à prisão do ciclo celular. Isto sugere que POLQ-superexpressão células seria hipersensibilidade aos inibidores de sinalização danos ao DNA. A fim de testar esta hipótese, a viabilidade da MCF7 e MDA-MB231 células foi determinada na presença de quantidades crescentes de um inibidor de Chk2. Em paralelo, a expressão POLQ foi ensaiada em cada linha celular.

Como mostrado na figura 12, MCF7 que expressam mais do que duas vezes mais do que POLQ RNA MDA-MB231 hipersensibilidade ao inibidor CHK2. Existe, portanto, uma correlação entre a expressão de POLQ ea sensibilidade à inibição da via de sinalização de danificar o DNA.

LISTAGEM DE SEQUÊNCIAS

<110> Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS)
Universite Paul Sabatier Toulouse III
Institut Claudius Regaud

<120> ASSINATURA PARA A DIAGNOSE DA INSTABILIDADE GENÉTICA E DA AGRESSIVIDADE DO CÂNCER DE MAMA

<130> D28090

<140> PCT/EP2010/067401

<141> 2010-11-12

<150> EP09306096.0

<151> 2009-11-13

<160> 15

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> IPO8 iniciador

<400> 1
agggggaattg atcagtgcac tccac 25

<210> 2
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> HMBS iniciador

<400> 2
gcggctgcaa cggcggaaga aaaca 25

<210> 3
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador da POLA

<400> 3
tacaaccaac caggtgtggt atttc 25

<210> 4
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador da POLD1

<400> 4
ctgtttgaag cgggatggat ggcaa 25

<210> 5
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciadorea da POLE

<400> 5
ctttgaagag gtgtgtgatg agatt 25

<210> 6
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador de REV1L

<400> 6
gggaaacatg ggggtgggtat atggc 25

<210> 7
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador da POLH

<400> 7
tcacacaata aggtcctggc aaaac 25

<210> 8
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador da POLM

<400> 8
gcagaaagcg gggctccagc accac 25

<210> 9
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador da POLK

<400> 9
gccacgaagg ggtccagatt ttatg 25

<210> 10
<211> 25

<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador de REV3L

<400> 10
aaaagcccag ggagattggt ggacg 25

<210> 11
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> POLL iniciador

<400> 11
gattgagcag acagtccaga aagca 25

<210> 12
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador de POLB

<400> 12
gagttagtgg cattggtcca tctgc 25

<210> 13
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador de POLN

<400> 13
tggagcaggg aaggagcggc tggct 25

<210> 14
<211> 25
<212> DNA
<213> sequência artificial

<220>
<223> Iniciador da POLI

<400> 14

ccagctcgca gggagttcat gatca 25

<210> 15

<211> 25

<212> DNA

<213> sequência artificial

<220>

<223> Iniciador da POLQ

<400> 15

gcctttccca ggtggttcaa tactg 25

Lisboa, 28 de outubro de 2014

REIVINDICAÇÕES

1. Método para prognosticar a sobrevivência desfavorável de um paciente que sofre de cancro de mama, compreendendo:

a) medir *in vitro* o nível de expressão do gene POLQ e/ou uma ou diversas de suas formas de iso, e o nível de expressão de um gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente,

b) calcular para o referido gene POLQ e/ou a isoforma de uma relação do nível de expressão do nível de expressão de POLQ e/ou uma ou diversas de suas isoformas para a expressão do referido gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente

c) comparar a referida relação do nível de expressão do gene a um valor limiar correspondente, e

d) prognosticar a sobrevivência desfavorável se a referida relação for superior ao seu valor limiar correspondente.

2. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o paciente tem um número elevado dos linfonodos metastáticos.

3. Método, de acordo com a reivindicação 1, em que o cancro de mama expressa um cDNA do p53 do tipo selvagem

4. Método para diagnosticar a instabilidade genética num cancro de mama num paciente a partir de uma amostra de cancro de mama do referido paciente, compreendendo:

a) medir *in vitro* o nível de expressão do gene POLQ e uma ou diversas de suas isoformas, e o nível de expressão de um gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente

b) calcular para o referido gene POLQ e/ou a isoforma de uma relação do nível de expressão do nível de expressão de POLQ e/ou uma ou diversas de suas isoformas para a expressão do referido gene de controlo na referida amostra de cancro de mama do paciente

c) comparar a referida relação do nível de expressão do gene com um valor limiar correspondente, e

d) diagnosticar a instabilidade genética do cancro de mama se a referida relação for superior ao seu valor limiar correspondente.

5. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-4, em que o referido gene de controlo é um gene de manutenção.

6. Método, de acordo com a reivindicação 5, em que o referido gene de manutenção é um gene selecionado no grupo consistindo em B2M, TFRC, YWHAZ, RPLO, 18S, GUSB, UBC, TBP, GAPDH, PPIA, POLR2A, ACTB, PGK1, HPRT1, IP08 e HMBS.

7. Método, de acordo com a reivindicação 6, em que o referido gene é IP08 ou HMBS.

8. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-7, em que o referido nível de expressão é medido no nível de mRNA.

9. Método, de acordo com a reivindicação 8, em que o referido nível de expressão é medido empregando o PCR quantitativo ou a tecnologia dos microarranjos.

10. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-9, em que o referido nível de expressão é medido no nível de proteína.

11. Método, de acordo com a reivindicação 10, em que o referido nível de expressão é medido empregando os anticorpos específicos.

12. Método, de acordo com qualquer uma das reivindicações 1-11, em que o referido valor limiar é 15,8

13. Utilização de um microarranjo compreendendo no máximo 500 sondas, em que pelo menos uma das quais hibridiza especificamente com POLQ e em pelo menos uma outra sonda hibridiza especificamente com um gene selecionado no grupo consistindo no gene IP08 ou no gene HBMS, no método de qualquer das reivindicações 1-12.

14. Utilização de um kit, compreendendo um microarranjo, em que o referido microarranjo compreende no máximo 500 sondas, em que pelo menos uma das quais hibridiza especificamente com POLQ e em pelo menos uma outra sonda hibridiza especificamente com um gene selecionado no grupo consistindo no gene IP08 ou no gene HBMS, ou iniciadores de amplificação específicos para POLQ, em que o referido kit compreende ainda iniciadores de amplificação específicos para um gene selecionado no grupo consistindo no gene IP08 ou no gene HBMS, no método de qualquer das reivindicações 1-12.

15. Método para o prognóstico da eficiência da radioterapia ou de reparção de DNA, sinalização da lesão de DNA ou de inibidores do metabolismo de nucleotídeos no tratamento de cancro de mama num paciente, compreendendo:

a) diagnosticar ou não a instabilidade genética no referido cancro de mama no referido paciente empregando o método da reivindicação 4, e

b) prognosticar a eficiência da radioterapia ou inibidores da reparação de DNA se a instabilidade genética foi diagnosticada na etapa a).

Lisboa, 28 de outubro de 2014

FIG. 1

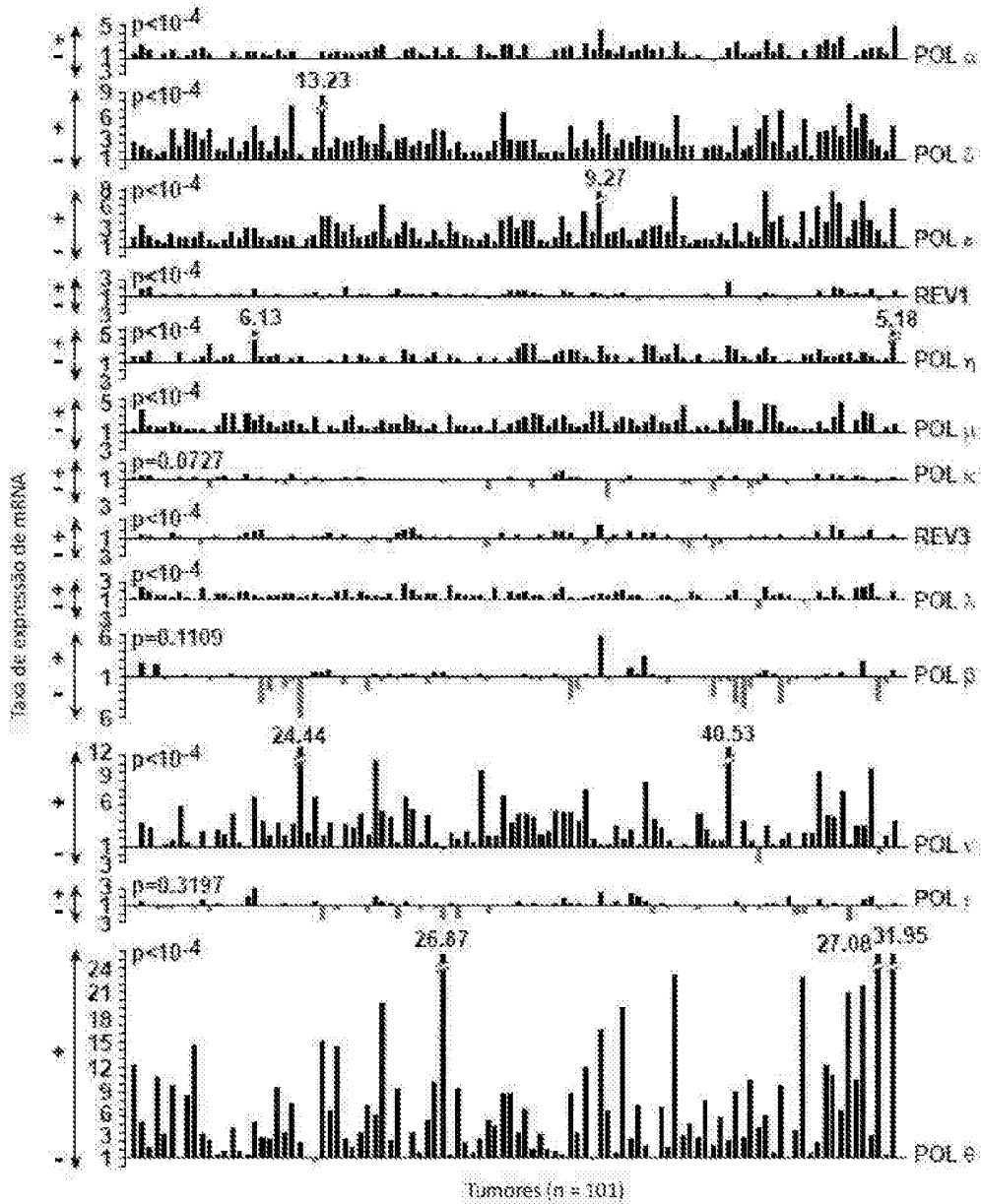


FIG. 2

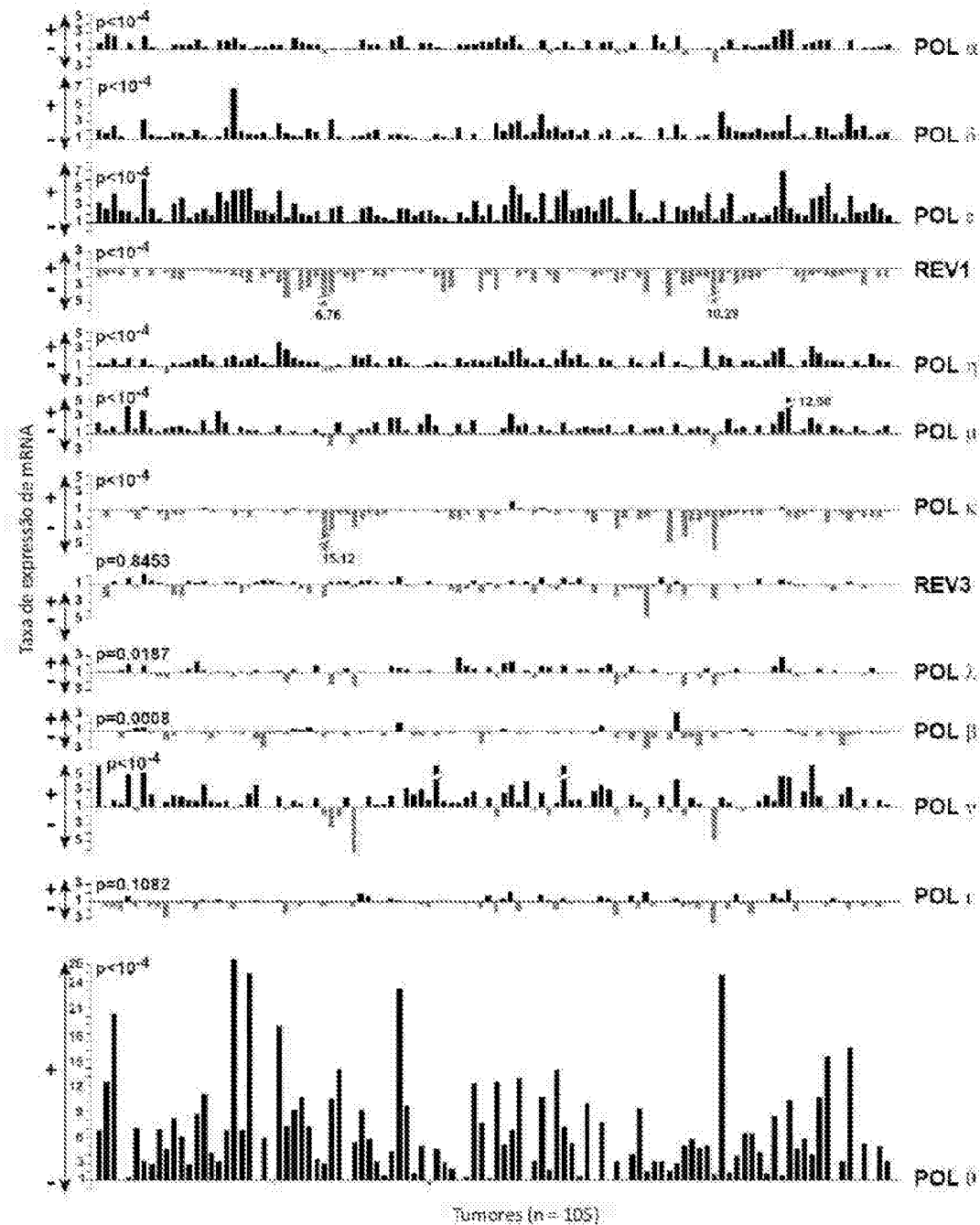


FIG. 3

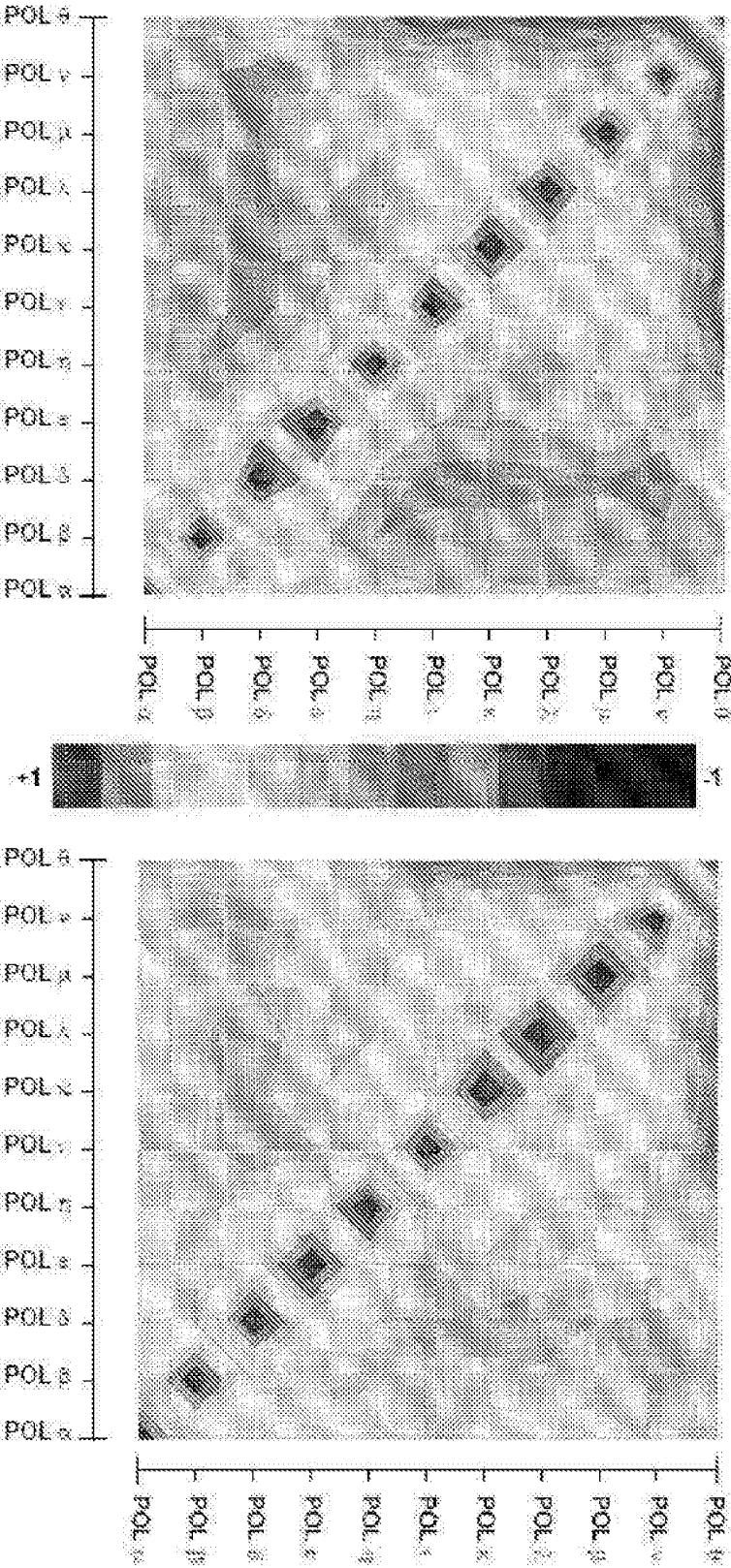


FIG. 4

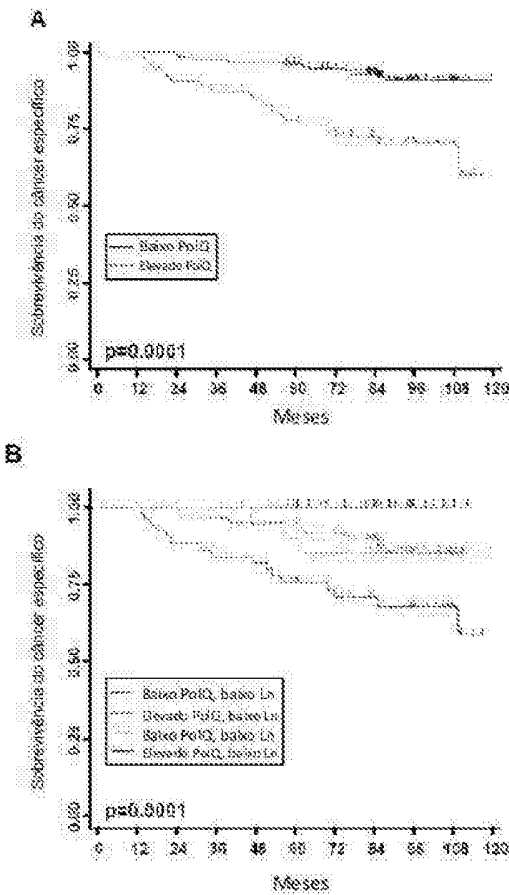


FIG. 5

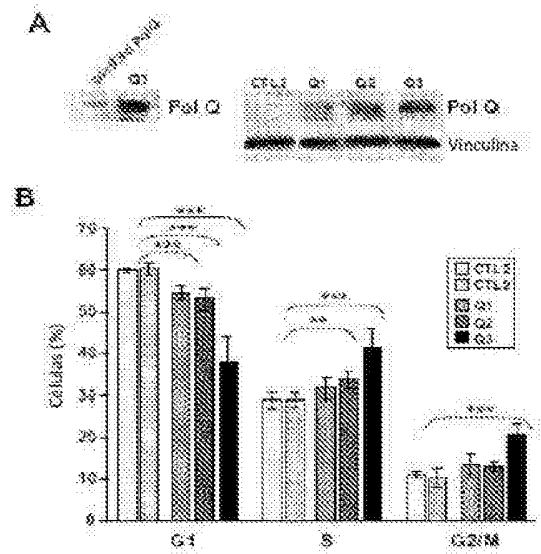


FIG. 8

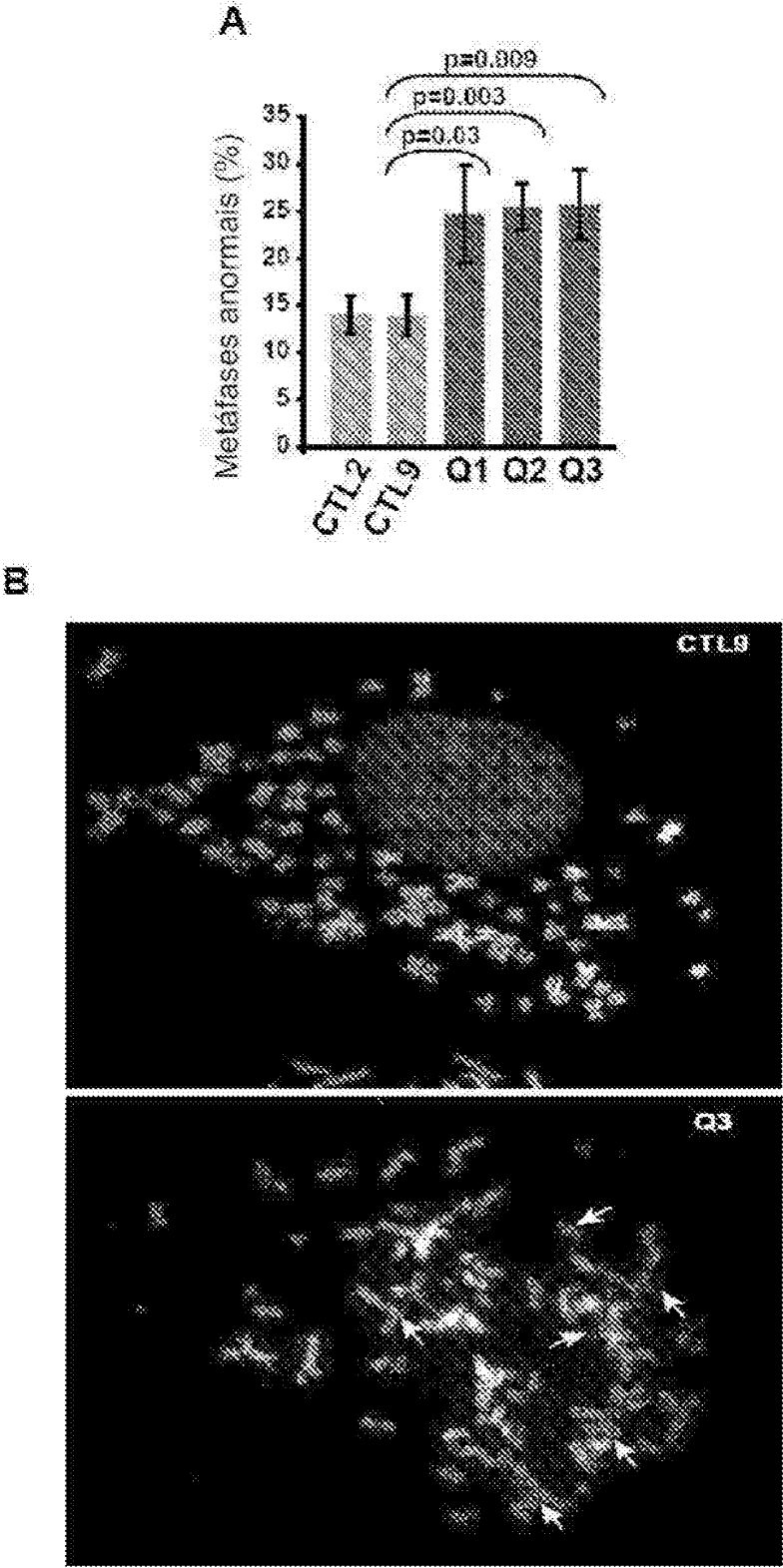


FIG. 9

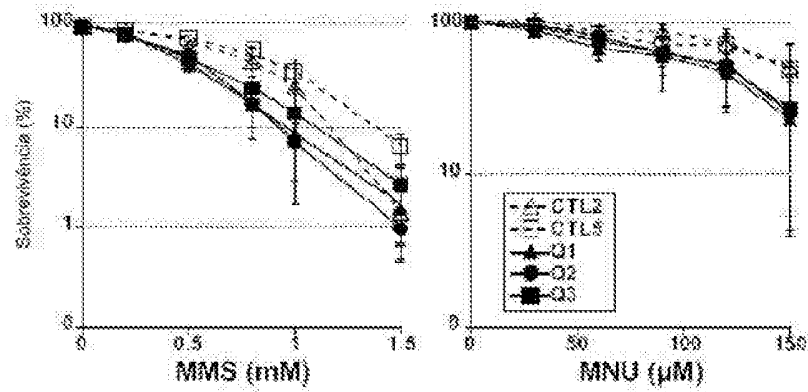


FIG. 10

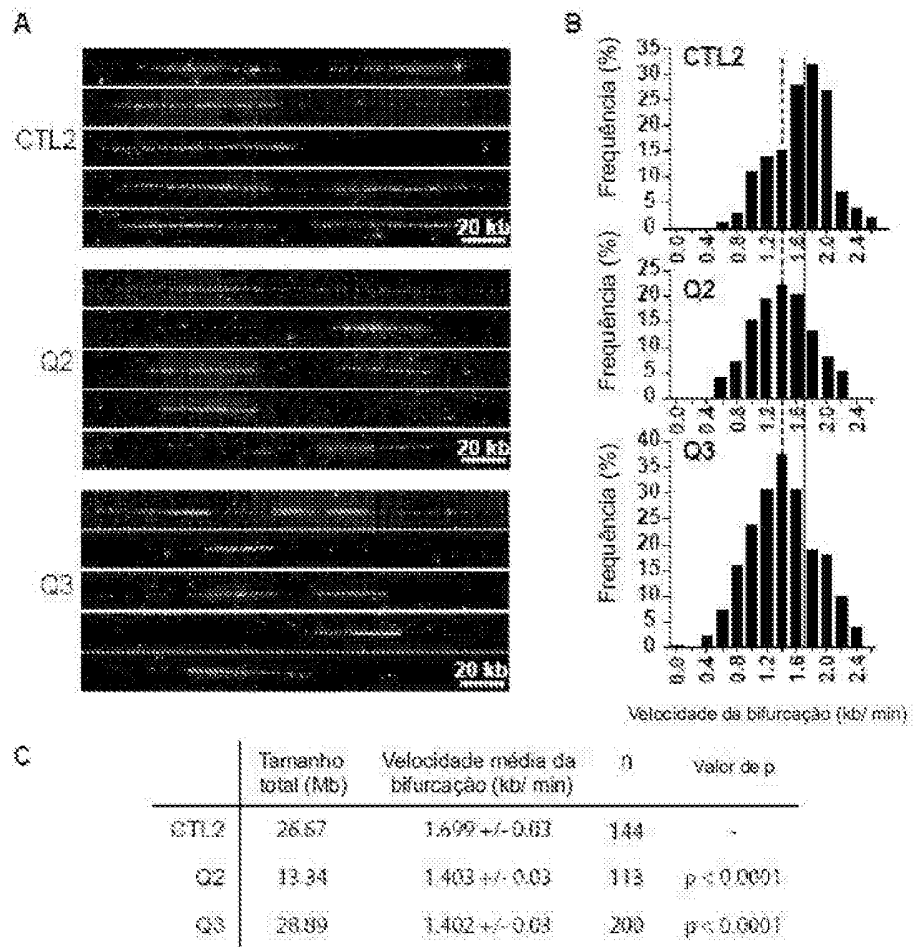


FIG. 11

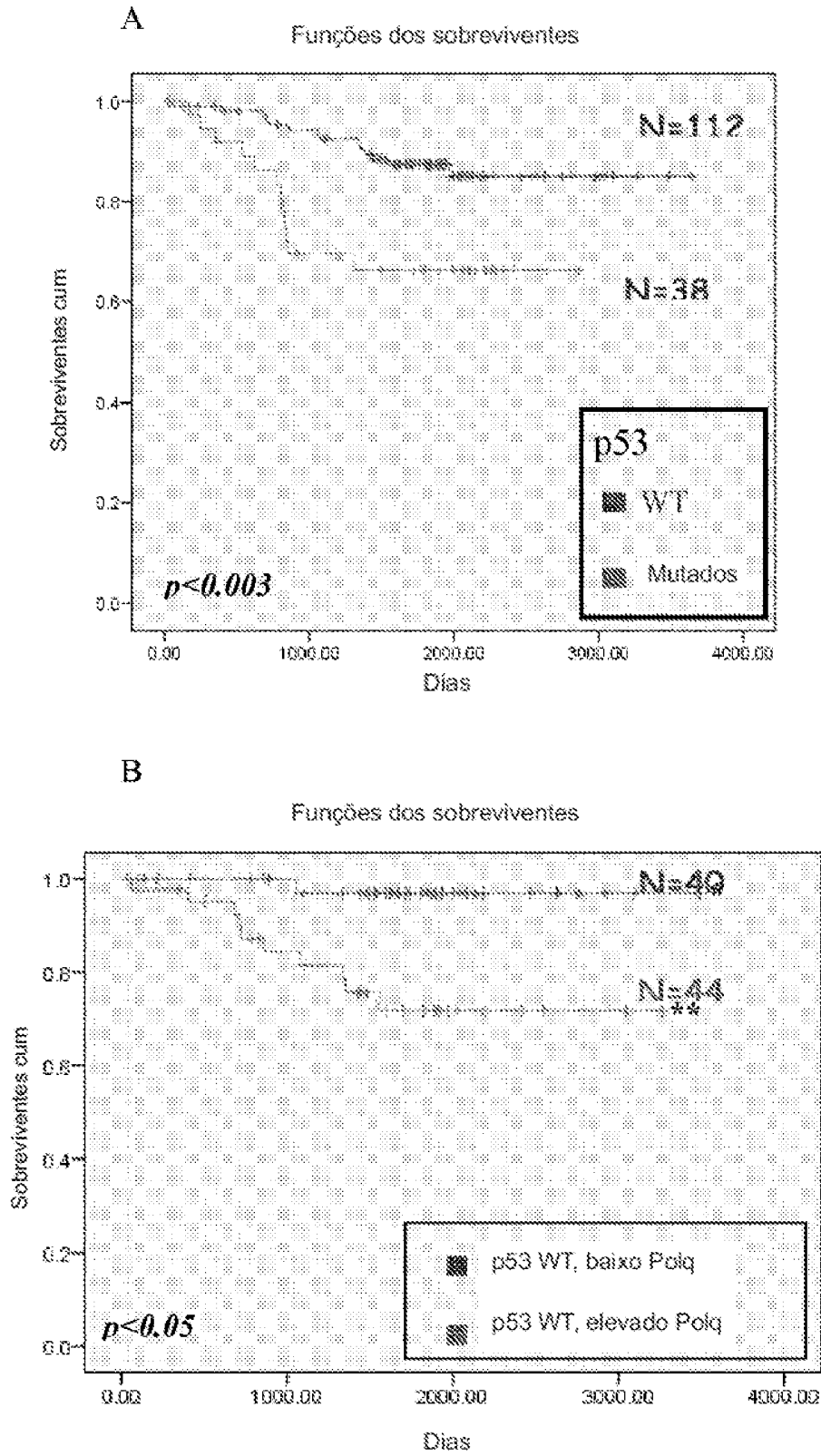
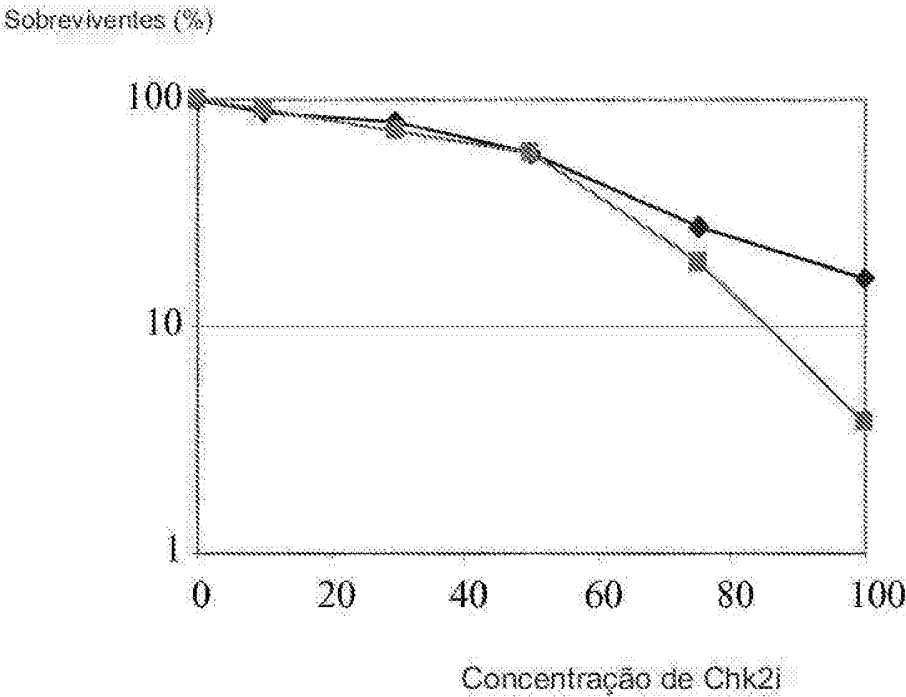
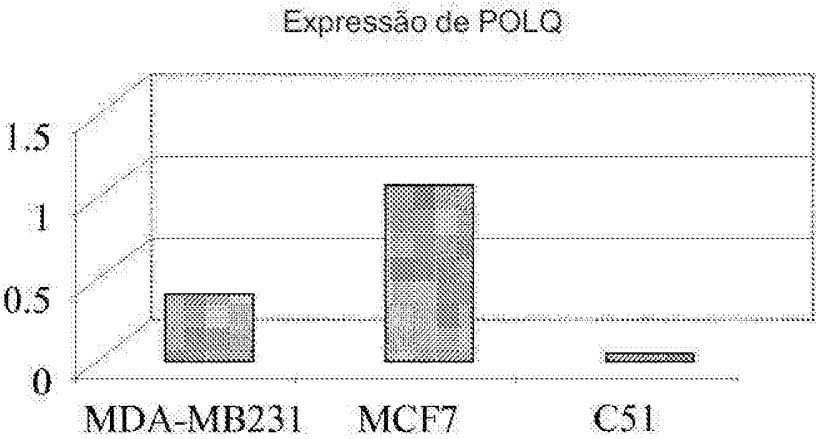


FIG. 12

A



B



REFERÊNCIAS CITADAS NA DESCRIÇÃO

Esta lista de referências citadas pelo requerente é apenas para conveniência do leitor. A mesma não faz parte do documento da patente Europeia. Ainda que tenha sido tomado o devido cuidado ao compilar as referências, podem não estar excluídos erros ou omissões e o IEP declina quaisquer responsabilidades a esse respeito.

Documentos de patentes citadas na Descrição

- WO 2004080976 A
- WO 2005053662 A
- WO 2009046205 A
- WO 2008082856 A
- WO 2007001684 A
- EP 09306096 A

Literatura que não é de patentes citada na Descrição

- JEMAL et al. *Cancer Statistics*, 2009, vol. 59, 225-249
- BARTKOVA et al. *Nature*, 2005, vol. 434, 864-870
- GORGOULIS et al. *Nature*, 2005, vol. 434, 907-913
- SEKI et al. *EMBO J*, 2004, vol. 23, 4484-4494 [0009]
- MASUDA et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 2005, vol. 102, 13986-13991
- YOSHIMURA et al. *Mol. Cell*, 2006, vol. 24, 115-125
- KAWAMURA et al. *Int J Cancer*, 2004, 9-16 [0010]
- EISENBERG et al. *Trends in Genetics*, 2003, vol. 19, 362-365
- ROCHÉ et al. *J Clin Oncol*, 2008, vol. 24, 5664-5671
- CHIRGWIN J. et al. *Biochemistry*, 1979, vol. 18, 5294-5299
- SEKI et al. *Nucleic Acid Res*, 2003, vol. 31, 6117-6126
- PILLAIRE et al. *Cell Cycle*, 2007, vol. 6, 471-7 [0048]
- SEKI et al. *Nucleic Acids Res*, 2003, vol. 31, 6117-6126
- BERGOGLIO et al. *J Cell Science*, 2002, vol. 115, 4413-4418
- RAO et al. *Mol Cancer Res*, 2007, vol. 5, 713-24
- BERGOGLIO et al. *Cancer Res*, 2002, vol. 62, 3511-3514
- PILLAIRE et al. *Cell Cycle*, 2007, vol. 6, 471-477
- CORPET F. *Nucleic Acids Res*, 1988, vol. 16 (22), 10881-90
- PETITJEAN et al. *Hum Mutat*, 2007, vol. 28 (6), 622-9
- MARINI et al. *J Biol Chem*, 2003, vol. 278, 32014-32019
- CHIRGWIN et al. *Biochemistry*, 1979, vol. 18, 5294-5299