

ANA PAULA MARTINS SEBASTIÃO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE FENÓTIPO BASAL COM MARCAÇÃO
IMUNOISTOQUÍMICA PARA EGFR, CK5/6 E CK14 EM CARCINOMAS
DUCTAIS DA MAMA LUMINAIS A E TRIPLO NEGATIVOS**

CURITIBA

2010

ANA PAULA MARTINS SEBASTIÃO

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DE FENÓTIPO BASAL COM MARCAÇÃO
IMUNOISTOQUÍMICA PARA EGFR, CK5/6 E CK14 EM CARCINOMAS
DUCTAIS DA MAMA LUMINAIS A E TRIPLO NEGATIVOS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Grau Acadêmico de Doutor.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Co-orientador: Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres

CURITIBA

2010

Sebastião, Ana Paula Martins

Estudo da expressão de fenótipo basal com marcação
imunohistoquímica para EGFR, CK5/6 e CK14 em carcinomas
ductais da mama luminais A e triplo negativos/ Ana Paula Martins
Sebastião. – Curitiba, 2010.

104 f: il.

Orientador: Prof. Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias

Tese – (Doutorado) – Setor de Ciências da Saúde, Universidade
Federal do Paraná.

1. Neoplasias da mama. 2. Imunohistoquímica. 3. Fenótipo basal.
I. Título. NLM: WP 870

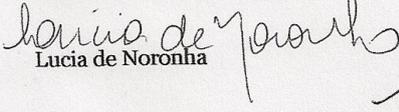


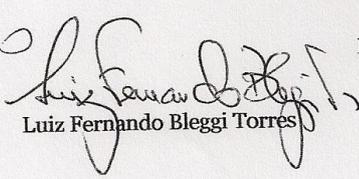
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEIS: MESTRADO E DOUTORADO

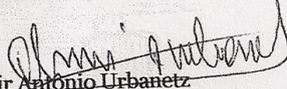
Ata do julgamento da 133ª Tese de Doutorado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica da Universidade Federal do Paraná, referente a aluna **ANA PAULA MARTINS SEBASTIÃO** sob o Título: **ESTUDO DA EXPRESSÃO DE FENÓTIPO BASAL COM MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA EGFR, CK5/6 E CK14 EM CARCINOMAS DUCTAIS DA MAMA LUMINAIS A E TRIPLO NEGATIVOS**, na Linha de Pesquisa: **MÉTODOS DE DETECÇÃO PRECOCE E AVALIAÇÃO DE FATORES PROGNÓSTICOS EM AFECÇÕES CIRÚRGICAS**, Área de Concentração: **Clínica Cirúrgica**, tendo como orientador Prof.Dr. Jorge Eduardo Fouto Matias.

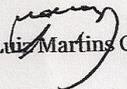
Às sete horas e trinta minutos do dia nove de abril de dois mil e dez, no Auditório do 7º andar do prédio central sala 701 do Hospital de Clínicas, reuniu-se, em sessão pública, a Banca Examinadora de Avaliação composta pelos Professores Doutores Cícero de Andrade Urban, Almir Antônio Urbanetz, Lucia de Noronha, Luiz Martins Collaço e Luiz Fernando Bleggi Torres sendo esta última Presidente da Banca. Aberta a sessão, foi apresentada pelo Prof. Dr. Antonio Carlos L. Campos, Coordenador do Programa, a documentação probatória do cumprimento pela candidata das exigências legais que lhe facultam submeter-se à avaliação da tese, como última etapa à sua titulação no Programa. A seguir o Presidente da Banca Examinadora convidou a candidata a apresentar oralmente resumo de sua tese no prazo máximo de trinta minutos para demonstração de sua capacidade didática e para melhor conhecimento do tema por parte da audiência composta de professores, médicos, alunos, familiares e demais interessados. Seguiu-se a arguição e imediata resposta pela candidata, sucessivamente pelos componentes da Banca Examinadora. Obedecido o tempo máximo de vinte minutos para a arguição e igual tempo para cada resposta. Terminada a etapa de arguição, reuniu-se a Banca Examinadora em sala reservada para atribuição das notas, dos conceitos e lavratura do Parecer Conjunto. A candidata foi **APROVADA** considerando-se os parâmetros vigentes estabelecidos pelo programa e regidos pela legislação pertinente da instituição. Voltando à sala de sessão, a Senhora Presidente da Banca Examinadora leu os conceitos do Parecer Conjunto e deu por encerrada a sessão. E para que tudo conste, foi lavrada a presente Ata, que será assinada pelos seguintes componentes da Banca Examinadora.


Cícero de Andrade Urban


Lucia de Noronha


Luiz Fernando Bleggi Torres


Almir Antônio Urbanetz


Luiz Martins Collaço



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
SETOR DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA CIRÚRGICA
NÍVEL MESTRADO - DOUTORADO

**PARECER CONJUNTO DA BANCA EXAMINADORA
DA AVALIAÇÃO DA DEFESA DE DOUTORADO**

Aluna: **ANA PAULA MARTINS SEBASTIÃO**

Título da Tese: ESTUDO DA EXPRESSÃO DE FENÓTIPO BASAL COM MARCAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA PARA EGFR, CK5/6 E CK14 EM CARCINOMAS DUCTAIS DA MAMA LUMINAIS A E TRIPLO NEGATIVOS.

CONCEITOS EMITIDOS:

Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof. Dr. Almir Antônio Urbanetz	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof. Dra. Lucia de Noronha	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof. Dr. Luiz Martins Collaço	conceito emitido	A	equivalência	10
Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres	conceito emitido	A	equivalência	10

Conceito Final de Avaliação:

Conceito: A Equivalência: 10,0

Curitiba, 09 de abril de 2010.

Prof. Dr. Cícero de Andrade Urban _____

Prof. Dr. Almir Antônio Urbanetz _____

Prof. Dra. Lucia de Noronha _____

Prof. Dr. Luiz Martins Collaço _____

Prof. Dr. Luiz Fernando Bleggi Torres _____

A Deus por ter me dado saúde e inspiração.

Aos meus pais, por terem me dado suporte, carinho e incentivo nos estudos desde a infância até os dias de hoje.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. JORGE EDUARDO FOUTO MATIAS, coordenador da Pós-Graduação em Clínica Cirúrgica do Setor de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Paraná, pela oportunidade, atenção e confiança em me aceitar como sua orientanda.

Ao Prof. Dr. LUIZ FERNANDO BLEGGI TORRES, por sua amizade, pela paciência neste período especial da minha vida e pelo seu exemplo de ética e profissionalismo que orientaram a construção da minha vida profissional. Agradeço pela co-orientação deste estudo.

Ao LABORATÓRIO DE PATOLOGIA EXPERIMENTAL DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ pela indispensável ajuda das biólogas ANA PAULA CAMARGO E MARINA LUISE VIOLA DE AZEVEDO na confecção dos TMA's e nas colorações imunoistoquímicas. À DRA. LUCIA DE NORONHA, coordenadora deste laboratório, pela amizade, incentivo e apoio na leitura das lâminas de imunoistoquímica deste estudo.

Aos estimados patologistas do Centro de Patologia de Curitiba por tantos anos de trabalho juntos, com muitas conquistas e transformações. Em especial ao DR. LUIZ MARTINS COLLAÇO, cujo exemplo me inspirou a abraçar a patologia como especialidade e o magistério como compromisso.

Aos mastologistas da Unidade de Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças, Dr. RUBENS SILVEIRA DA LIMA, DR. EDUARDO SCHUNEMANN JUNIOR, DR. CÍCERO DE ANDRADE URBAN, DRA IRIS RABINOVICH e DR. CLEVERTON SPAUTZ, cuja seriedade profissional e o comprometimento em servir às pacientes com câncer de mama me incentivaram a prosseguir neste estudo. Agradeço a confiança que sempre depositaram em meu trabalho.

Ao biólogo CLEBER RAFAEL VIEIRA DA COSTA pelo auxílio na separação de blocos e lâminas originais para o início deste estudo.

A Sra. MARCIA OLANDOSKI pela prestatividade e eficiência com que sempre me atendeu no auxílio com as análises estatísticas.

A Sra. ÁUREA MARIA COSTIN, bibliotecária da Biblioteca de Ciências da Saúde da UFPR pelo auxílio na revisão bibliográfica e formatação do texto deste estudo.

A minha FAMÍLIA e ao GILBERTO, pelo apoio constante que possibilitou este meu exercício acadêmico.

*"O importante é não parar de questionar."
Albert Einstein*

RESUMO

A classificação molecular do câncer de mama estabeleceu que o subtipo Basalóide, um carcinoma triplo negativo (receptores hormonais negativos e ausência de superexpressão de HER2) que expressa fenótipo basal, é um tumor de prognóstico reservado e que não possui terapia alvo direcionada; enquanto o subtipo Luminal A (positivo para receptores hormonais e negativo para superexpressão de oncoproteína HER2) é o de melhor prognóstico e responsivo a terapia hormonal. Publicações subseqüentes demonstraram que existe heterogeneidade mesmo dentro dos subtipos propostos. O objetivo deste estudo foi comparar carcinomas ductais Luminais A (LA) e Triplo Negativos (TN) em relação à expressão de fenótipo basal por imunistoquímica. As variáveis prognósticas clássicas de idade, grau histológico e envolvimento linfonodal foram comparadas nos diferentes subgrupos, que expressaram ou não fenótipo basal. Foram construídos TMAs (microarranjos de tecido) que continham 40 casos LA e 42 casos TN. Nos cortes obtidos foi feita a pesquisa dos marcadores basais EGFR, CK5/6 e CK14 através de imunistoquímica. A média de idade foi menor em pacientes Triplo Negativo ($p=0,03$). O grau histológico I foi mais freqüente no LA e o grau III foi mais freqüente no TN ($p < 0,001$). A associação entre o envolvimento linfonodal e os subtipos de carcinoma de mama não evidenciou diferença estatisticamente significativa. Ambos os grupos Luminal A e Triplo Negativo podem expressar fenótipo basalóide com os marcadores EGFR, CK5/6 e CK 14, sendo que a expressão de CK14 predominou no Triplo Negativo ($p=0,05$). Na dependência da expressão isolada ou combinada dos marcadores estudados, ocorre variação na freqüência de casos de Carcinoma Basalóide, sendo que CK14 mostrou maior sensibilidade para identificá-los. Entre os casos LA e TN, analisados isoladamente, a presença de fenótipo basal não determinou diferenças significativas em relação à média de idade, ao grau histológico e ao envolvimento linfonodal. Houveram mais casos de carcinomas ductais grau III entre os TN basais do que entre os LA basais ($p=0,009$) e também entre os TN não-basais do que entre os LA não-basais ($p=0,03$), sugerindo que a condição Triplo Negativo é mais importante do que a presença de fenótipo basal na determinação de pior prognóstico em relação ao grau histológico. A média de idade foi significativamente menor nos carcinomas com expressão de fenótipo basal, independente de ser LA ou TN ($p=0,03$).

Palavras chave: Neoplasias da mama. Imunistoquímica. Fenótipo basal.

ABSTRACT

The molecular classification of the breast cancer indicates that the Basal-like subtype, a triple negative carcinoma that express basal phenotype, is a tumor with poor prognosis that does not have target therapy, while the Luminal A subtype (positive for hormonal receptors and negative for HER2 overexpression) is of better prognosis and responsive for hormonal therapy. Subsequent publications had demonstrated heterogeneity even inside of considered subtypes. The aim of this study was to compare invasive ductal carcinomas Luminal A (LA) and Triple Negatives (TN) in relation to the basal phenotype by immunohistochemistry. The classic prognostics variables of age, histologic grade and nodal status were compared in the different subgroups, that expressed or not basal phenotype. TMAs (tissue microarrays) were designed that contained 40 cases of LA and 42 cases of TN and were tested by immunohistochemistry for basal markers which included EGFR, CK5/6 and CK14. Average age was younger in patients with Triple Negative tumors ($p=0,03$). Histologic grade I was more frequently observed in LA and grade III was more frequent in TN tumors ($p < 0,001$). There was no statistically significant difference between nodal status and the subtypes of breast carcinoma. Both Luminal A and Triple Negative tumors can express basal phenotype with the markers EGFR, CK5/6 and CK 14. However, CK14 expression was more prevalent in the Triple Negative population ($p=0,05$). There was variation in the frequency of Basal-like carcinomas depending if the defining criterion was positivity for a single or a combination of markers. As an isolated marker, CK14 proved to be the most sensitive in identifying the Basal-like population ($p=0,05$). Between LA and TN, when analyzed separately, the basal phenotype did not lead to significant differences in average age, histologic grade and nodal status. There were more cases of ductal carcinomas grade III in the subgroup of basal TN than in basal LA ($p=0,009$) and also in the subgroup non-basal TN than in non-basal LA ($p=0,03$). These data suggest that Triple Negative status is more significant than basal phenotype in the determination of prognosis in relation to histologic grade. The age average was significantly younger in the carcinomas with basal phenotype despite the fact of being LA or TN ($p=0,03$).

Key words: Breast neoplasms. Immunohistochemistry. Basal phenotype.

LISTA DE ABREVIATURAS

ATM -	ataxia
BRCA-1 -	breast cancer associated gene – 1
CDI -	carcinoma ductal invasivo
CDIS -	carcinoma ductal in situ
cDNA -	DNA complementar
CGH -	comparative genomic hybridization
CK -	citoceratinas (<i>cytokeratins</i>)
chK2 -	checkpoint kinase 2
EGFR -	epidermal growth factor receptor
ELISA -	enzyme-linked immunosorbent assay
FI -	filamentos intermediários
GH -	grau histológico
HER2 -	proteína c-erbB-2 / HER2neu
IGF-I -	Insuline growth factor-I
IIQ -	imunoistoquímica
LA -	luminal A
mTOR -	mammalian target of rapamicin
OMS -	Organização Mundial da Saúde
PCR -	reação de polimerase em cadeia
RH -	receptores hormonais
RE -	receptor de estrogênio
RP -	receptor de progesterona
TMA -	microarranjo de tecidos (<i>tissue microarrays</i>)
TN -	triplo negativo

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 OBJETIVOS	17
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 MAMA NORMAL E CARCINOGENESE.....	18
2.2 HISTOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	21
2.2.1 Tipos histológicos.....	21
2.2.2 Graduação histológica.....	24
2.2.3 Envolvimento linfonodal.....	25
2.3 MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS VALIDADOS PARA APLICAÇÃO CLÍNICA.....	26
2.3.1 Receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR).....	26
2.3.2 HER 2.....	28
2.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA.....	31
2.4.1 O fenótipo basalóide.....	34
2.4.2 EGFR (HER1/c-erbB1).....	39
2.4.3 Citoqueratinas.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS	44
3.1 TIPO DE ESTUDO.....	44
3.2 DESENHO DO ESTUDO, SELEÇÃO E TAMANHO DA AMOSTRA.....	44
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO.....	45
3.4 VARIÁVEIS E CONCEITOS.....	46
3.5 MÉTODO IMUNOHISTOQUÍMICO.....	47
3.6 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS.....	48

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	49
3.8 ASPECTOS ÉTICOS.....	49
4 RESULTADOS	50
4.1 RESULTADOS QUALITATIVOS.....	50
4.2 RESULTADOS QUANTITATIVOS.....	54
4.2.1 Comparação entre LA e TN em relação à idade, grau histológico e linfonodos.....	54
4.2.2 Expressão dos marcadores EGFR, CK5/6 e CK14 nos grupos LA e TN.....	55
4.2.3 Estudo dos carcinomas LA e TN quanto à expressão de fenótipo basal em relação à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.....	58
5 DISCUSSÃO	65
5.1 AMOSTRA E O MÉTODO.....	65
5.2 A EXPRESSÃO QUALITATIVA E A AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DOS MARCADORES DE FENÓTIPO BASAL EGFR, CK5/6 E CK14.....	69
5.3 RESULTADOS QUANTITATIVOS.....	69
6 CONCLUSÕES	77
REFERÊNCIAS	79
APÊNDICES	91
ANEXO	102

1 INTRODUÇÃO

O câncer é um dos maiores desafios da medicina, desde a sua prevenção no âmbito da medicina social até a mais incessante busca pela descoberta dos mecanismos biomoleculares envolvidos na sua compreensão e cura. O câncer de mama é provavelmente o mais temido pelas mulheres, devido à sua alta frequência e, sobretudo pelos seus efeitos psicológicos, que afetam a percepção da sexualidade e a própria imagem pessoal.

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais freqüente em mulheres, com incidência mundial crescente. No ano 2000 foram registrados 1.050.000 casos, expressando 22% de todos os casos de carcinoma no contexto mundial (TAVASSOLI; DEVILLEE, 2003; PARKIN, 2001). Este tipo de câncer representa nos países ocidentais uma das principais causas de morte em mulheres. As estatísticas indicam o aumento de sua freqüência tanto nos países desenvolvidos quanto nos países em desenvolvimento.

No Brasil, a incidência do carcinoma de mama é semelhante a dos países desenvolvidos. De acordo com as Estimativas 2010 de Incidência de Câncer no Brasil (INCA), o câncer de mama seria o mais incidente entre as mulheres, com 49.240 novos casos e com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. No Paraná, a taxa estimada foi de 81,57 casos a cada 100 mil mulheres. É o câncer que mais causa mortes entre as mulheres brasileiras. (BRASIL, 2010).

A maioria dos tumores mamários invasores são do padrão histológico ductal, chamados de carcinomas ductais invasivos sem outra especificação (SOE). Pacientes com este tipo histológico de tumor apresentam diferentes evoluções clínicas quando comparadas entre si num mesmo estadiamento clínico. Por esta diversidade de comportamento, o câncer de mama tem sido considerado uma doença heterogênea, tanto do ponto de vista clínico quanto biológico. Atualmente, com o advento de estudos dos perfis gênicos dos cânceres de mama, a sua taxonomia tem sido revista (SORLIE *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2005).

Utilizando-se esta abordagem molecular, Perou *et al.* (2000) e posteriormente SORLIE *et al.* (2001) utilizando os achados de similaridades genéticas entre a célula tumoral e sua correspondente normal, propuseram classificar os tumores de mama em 5 grandes grupos: 1) Luminal A, 2) Luminal B, 3) Superexpressão HER2, 4)

Basalóide e 5) *normal breast-like group*. O subtipo Luminal A demonstrou ser o mais freqüente, de prognóstico geralmente favorável e com o benefício de terapia alvo dirigida. Já o subtipo Basalóide é o único que não apresenta alvo terapêutico definido.

A partir desta proposta molecular, vários estudos têm testado diferentes anticorpos para reproduzir a classificação por imunohistoquímica, em especial para caracterizar o subtipo carcinoma basalóide, e para verificar a correspondência destes subtipos com fatores prognósticos do câncer de mama (SORLIE, 2001; SORLIE *et al.*, 2003). O receptor de estrogênio foi considerado o principal discriminador entre os grupos de pior e melhor prognóstico, seguido do grau histológico (SOTIRIOU *et al.*, 2006).

Na incessante busca dos pesquisadores em reclassificar os carcinomas de acordo com as características moleculares propostas, observa-se na literatura diversos artigos demonstrando diferentes casuísticas de carcinoma basalóide, sempre enfatizando a busca do perfil de marcadores ideais para a caracterização destes carcinomas em meio a casos triplo negativos. No entanto, recentes estudos já vêm demonstrando que existe expressão de fenótipo basalóide (expressão de proteínas que são comuns às células basais/mioepiteliais) em meio a casos com superexpressão do HER2 (LAAKSO *et al.*, 2006), e poucos artigos discutem, ou sequer referem, a ocorrência de fenótipo basalóide dentro do grupo de casos com receptores hormonais positivos.

Todos esses avanços da patologia molecular no câncer de mama e a ausência desses estudos em Curitiba, encorajaram a pesquisa do perfil imunohistoquímico de carcinomas ductais invasores no nosso meio. Foram comparados os dois subtipos descritos como mais diferentes entre si do ponto de vista molecular, de tratamento e prognóstico, os Luminais A (LA) e os Triplo Negativos (TN), quanto à expressão de fenótipo basalóide em relação à idade e ao grau histológico. Seriam os LA e os TN diferentes entre si, em relação à idade, ao grau histológico e ao envolvimento linfonodal, quando expressam ou não fenótipo basalóide? Este foi o questionamento principal deste estudo. O emprego da técnica do TMA (microarranjo de tecidos) foi utilizada para que todos os experimentos fossem realizados nas mesmas condições técnicas com economia de tempo e de recursos, propiciando também um banco de casos para estudos posteriores.

1.1 OBJETIVOS

Objetivo geral

- Comparar carcinomas ductais de mama luminais A (LA) e triplo negativos (TN) em relação ao fenótipo basal com marcação imunoistoquímica para EGFR, CK5/5 e CK 14.

Objetivos específicos

1. Comparar LA e TN quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.
2. Avaliar a frequência da expressão das proteínas EGFR, CK 5/6 e CK14 para identificar fenótipo basal nos grupos LA e TN.
3. Nos LA, comparar basais e não-basais quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.
4. Nos TN, comparar basais e não-basais quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.
5. Comparar LA basais com TN basais quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.
6. Comparar LA não-basais com TN não-basais quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.
7. Comparar LA não basais com TN basais quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.
8. Comparar Carcinomas basais e não-basais, independente de serem LA ou TN, quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 MAMA NORMAL E CARCINOGENESE

O tecido glandular mamário desenvolve-se a partir da interação do epitélio rudimentar na papila mamária com o tecido adiposo subjacente na fase pré-púbere. A penetração inicial dos ductos no tecido fibro-adiposo depende de fatores indutivos locais ainda pouco conhecidos e compreendidos. O alongamento e a ramificação dos ductos ocorrem na puberdade, sob estímulos positivos do estrógeno, progesterona e hormônio de crescimento hipofisário, ou de seu mediador local, o fator de crescimento IGF-I (insuline-like growth factor-I). A finalização do processo de diferenciação ocorre durante a gestação, com o desenvolvimento lóbulo-alveolar, sob a influência de vários hormônios: prolactina, hormônio do crescimento, insulina, glicocorticóides, estrógeno e progesterona (DICKSON; LIPPMAN 2001).

Durante a puberdade, o crescimento decorrente da estimulação pelo estrógeno e progesterona depende da expansão de uma população de células de reserva que facilita a 'invasão' do tecido fibro-adiposo e as ramificações terminais da rede de ductos. Essas células multipotentes de reserva têm características morfológicas particulares, ficando dispostas na camada basal das unidades ducto-lobulares mamárias. O estroma adjacente certamente desempenha papel crucial no desenvolvimento normal da mama bem como na carcinogênese, através da interação com as células basais das unidades ducto-lobulares e com a membrana basal (DICKSON; LIPPMAN 2001).

As mamas da mulher adulta são órgãos constituídos por 15 a 20 lobos que são formados por glândulas mamárias lóbulo-alveolares que se abrem, de maneira independente, pelos canais galactóforos em cada um dos mamilos. Cada lobo é dividido em lóbulos mamários através de feixes de tecido conjuntivo que permeiam as glândulas. Feixes interlobulares são de tecido conjuntivo mais denso, enquanto o tecido conjuntivo intralobular é mais frouxo e delicado. Há também feixes fibrosos ligados à derme, conhecidos como ligamentos suspensores de Cooper (STERNBERG,1991).

As glândulas são constituídas por uma porção secretora e o seu ducto excretor correspondente, circundados por uma membrana basal, por estroma colagenoso, vasos sanguíneos e tecido adiposo (STERNBERG,1991).

Os ductos são revestidos por 1 a 2 camadas de células luminiais cilíndricas. A porção lobular-alveolar é revestida por uma a duas camadas de células cúbicas com capacidade secretora. Uma camada de células mioepiteliais localiza-se em íntimo contato com a membrana basal do epitélio alveolar e dos ductos menores. Estas células são sensíveis a ocitocina, têm citoplasma claro, núcleos ovais e densos e contêm miofibrilas citoplasmáticas. Apresentam positividade para marcadores imunoistoquímicos de origem tanto epitelial quanto mesenquimal como actina de músculo liso, p63, proteína S100 e citoqueratinas 5, 6, 14 e 17. Têm capacidade contráctil e são responsáveis pela renovação do epitélio luminal. As células mioepiteliais basais possuem altos níveis de colagenase tipo IV, com provável participação crítica nos processos de renovação da membrana basal e remodelação das glândulas (STERNBERG,1991; MONTEAGUDO *et al.*, 1990).

A mama sofre alterações estruturais associadas com o ciclo menstrual, gestação, lactação e menopausa. O entendimento destas mudanças estruturais normais são necessárias para a distinção entre um processo fisiológico e os estados patológicos da mama (STERNBERG,1991).

Vários fatores podem influenciar a regulação do desenvolvimento normal, da carcinogênese e da progressão do câncer de mama, sendo os hormônios alguns dos principais. Os hormônios com papel mais bem estudado e definido são os esteróides endócrinos, peptídeos e outras moléculas produzidas pelos ovários, hipófise, pâncreas endócrino, tiróide e córtex adrenal. Esses hormônios atuam através de receptores nucleares ou na superfície celular, e regulam a transcrição de grupos específicos de genes (DICKSON; LIPPMAN, 2001).

Tanto o tecido mamário normal quanto o neoplásico são capazes de produzir substâncias similares aos hormônios em suas próprias células, que agem localmente (hormônios parácrinos), modulando a função das células epiteliais, estromais ou vasculares / endoteliais adjacentes. As células tumorais são capazes de produzir fatores de crescimento polipeptídeos que agem como hormônios autócrinos, regulando a transcrição de genes através da ação em receptores de sua própria superfície (DICKSON; LIPPMAN, 2001).

No tecido mamário normal existem três principais grupos de células, à saber, epiteliais, mioepiteliais/basais e estromais, que utilizam fatores parácrinos em suas interações, sendo que, entre as células epiteliais, os mecanismos autócrinos desempenham também papel importante. O câncer é resultado de um processo

complexo que envolve o desequilíbrio destas interações e a perda do controle da ação de fatores que promovem a sobrevivência das células, ativação de oncogenes, inativação ou perda de genes supressores de tumores, com participação dos fatores hereditários e a exposição a fatores promotores da carcinogênese. Na mama, os carcinomas caracterizam-se pela proliferação descontrolada e desregulada das células epiteliais, pelo desaparecimento das células mioepiteliais, alterações nos padrões de morte celular programada (apoptose) e, algumas vezes, pela perda de certas características epiteliais, denominada como transição epitélio-mesenquimal (EMT). A transição epitélio-mesenquimal, definida como a ocorrência de número variável de células epiteliais tumorais que passam a expressar marcadores mesenquimais, tais como a vimentina, foi originalmente descrita como um processo normal do desenvolvimento (HAY, 1995). Posteriormente, foi usada para explicar a conversão mesenquimal de alguns grupos de células epiteliais em cultura. No câncer, a EMT indica um comportamento mais agressivo das células tumorais, que está presente em cerca de 18% dos carcinomas mamários (DANDACHI *et al.*, 2001; JONES *et al.*, 2001).

Ocorrem também instabilidades genômicas (mutações, deleções, ampliações e rearranjos cromossômicos), com perda global da organização tecidual normal e, eventualmente, metástases. A estabilidade genômica é mantida por diversos componentes moleculares de diferentes vias do metabolismo celular que têm papel primordial na supressão do câncer. Mutações herdadas dos genes das 4 principais vias de controle do ciclo celular e de reparação de danos ao DNA celular, BRCA1, TP53 (p53), chk2 e ATM, provocam aumento na suscetibilidade ao câncer de mama em mulheres portadoras dessas mutações, sendo as mutações do gene da p53 as mais freqüentes nos carcinomas esporádicos da mama (STIEPCICH, M. M. A., 2007).

Existem evidências que suportam as hipóteses causais da estimulação mitogênica por proto-oncogenes incluindo c-fos, c-myc, c-myb e c-jun e sua ligação com a indução de processos proliferativos. Alguns desses genes são induzidos pelo estrogênio e pela progesterona (LEROY *et al.*, 1991; MURPHY 1991). Os proto-oncogenes sinalizam múltiplas vias intracelulares que estimulam o crescimento epitelial por ativação esteroideal direta, através da proteína MAP-kinase (*mitogen-activated protein*), induzida pelos fatores de crescimento, da fosfolipase C-PKC ou da via JAK-STAT (*Janus kinasesignal transducer and activator of transcription*). Após

estímulos proliferativos exercidos através do EGFR (epidermal growth factor), FGFR (*fibroblast growth factor*) e dos receptores de insulina, a ativação mais importante é a da via da MAP-kinase. Ocorre a autofosforilação dos receptores da superfície que desencadeia uma cascata de interações das vias de transdução dos sinais de ativação, que culminam com a saída da condição de repouso celular, entrada no ciclo celular e na proliferação das células. A expressão de algumas oncoproteínas (ex: c-fos, c-ras) parece desregular os genes que codificam as citoceratinas e proteínas associadas (JOOSS; MULLER, 1995), e essas alterações em seu perfil de expressão parecem ocorrer precocemente na transformação neoplásica (TRASK *et al.*, 1990; FRANZÉN *et al.*, 1996).

A expressão de CKs varia ao longo das diferentes fases da vida (embrionária, infância, puberdade, fase adulta e senescência), e está correlacionada à organogênese, desenvolvimento e maturação funcional dos diferentes tecidos e órgãos e ao processo de envelhecimento (PARAMIO; JORCANO, 2002). Na carcinogênese há alterações na expressão normal das citoqueratinas (CKs), observando-se expressão anômala ou perda de expressão de algumas delas, que parecem estar relacionadas aos diferentes comportamentos biológicos dos diversos tipos de carcinoma. Nas células transformadas, as CKs interferem no controle do ciclo celular, favorecendo a proliferação, conferindo às células neoplásicas maior plasticidade e maleabilidade, aumentando sua capacidade de invasão da membrana basal e estroma adjacente, de penetração na parede dos vasos e de geração de metástases à distância (STIEPCICH, M. M. A., 2007).

2.2 HISTOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

2.2.1 Tipos histológicos

O carcinoma invasivo de mama é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invadir o tecido adjacente e ter marcada tendência à metástase à distância. A grande maioria destes tumores é derivada das células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário, que são as células cuboidais luminiais secretoras e as células mioepiteliais e/ou basais (BIRNBAUM *et al.*, 2004; TAVASSOLI; DEVILEE, 2003).

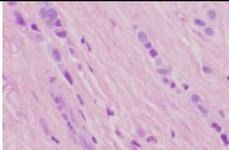
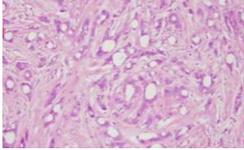
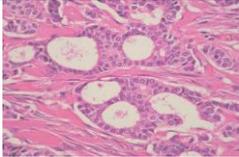
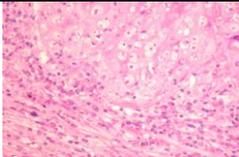
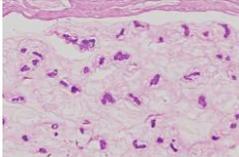
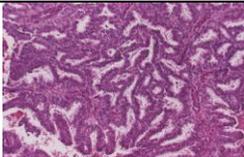
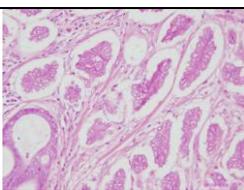
Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do câncer de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas (SORLIE, 2004). A classificação morfológica histológica atualmente utilizada tem mostrado limitações em caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que tumores com o mesmo tipo histológico, grau e estadiamento podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia. Acredita-se que as limitações na classificação morfológica são devidas à incapacidade de considerar as características biológicas destes tumores (ELSTON; ELLIS; PINDER, 1999; REIS-FILHO, 2006).

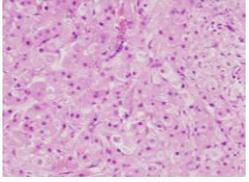
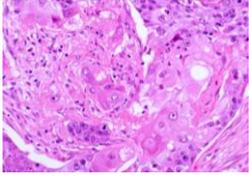
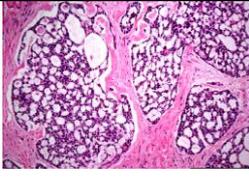
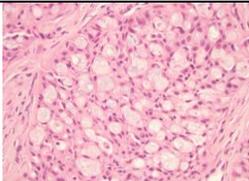
A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece 20 tipos morfológicos diferentes de carcinoma invasor da mama, além das chamadas lesões precursoras, que incluem a neoplasia lobular, as lesões proliferativas intraductais, o carcinoma micro-invasor e as neoplasias intraductais papilares (TAVASSOLI; DEVILLE, 2003).

O carcinoma ductal infiltrante sem outra especificação (SOE) inclui a maioria dos carcinomas (70 a 80%) que não podem ser classificados em qualquer outro subtipo por não apresentarem características específicas em mais de 50% da massa tumoral. Ainda assim, possui quatro variantes raras: o carcinoma pleomórfico, o carcinoma com células gigantes osteoclásticas, o carcinoma com características coriocarcinomas e o carcinoma com características melanocíticas (TAVASSOLI; DEVILLE, 2003).

Os outros 19 tipos de carcinoma de mama enquadram-se nos chamados tipos especiais de carcinoma mamário. Vinte por cento deles correspondem ao carcinoma lobular, seguido pelos carcinomas tubulares e mucinosos; os demais tipos são vistos em menor frequência. Para estabelecer um diagnóstico de tipo especial de carcinoma mamário, o tumor precisa apresentar 90% do seu padrão característico. Os carcinomas especiais devem ser distinguidos dos carcinomas mistos, nos quais a área de carcinoma ductal SOE ocupa de 10 a 49% da área tumoral e no restante pode-se distinguir um padrão do tipo especial. Os Tipos especiais mais frequentes encontram-se didaticamente resumidos no quadro 1, constando de algumas peculiaridades clínico-patológicas, ilustração microscópica e perfil imunoistoquímico mais comumente encontrado (TAVASSOLI; DEVILLE 2003).

QUADRO 1 - TIPOS ESPECIAIS MAIS FREQUENTES DE CARCINOMA MAMÁRIO INVASOR

	CLÍNICA	PATOLOGIA	MICROSCOPIA	IIQ
LOBULAR	<ul style="list-style-type: none"> - 5-15% dos cânceres de mama - 20% bilateral - Tendência a multicentricidade - Metástase para LCR superfícies serosas, ovário, útero e MO - Idade mais avançada 	<ul style="list-style-type: none"> - 90% grau II - Macroscopia: irregular, pouco delimitado - Variante pleomórfica comporta-se CDI SOE 		<ul style="list-style-type: none"> - RE+ - RP+ - HER2 -
TUBULAR	<ul style="list-style-type: none"> - 2% dos cânceres de mama - Faixa etária mais avançada que CDI SOE - Raras metástases axilares - Excelente prognóstico 	<ul style="list-style-type: none"> - Difícil diferencial com cicatriz radial e adenose esclerosante 		<ul style="list-style-type: none"> - RE+ - RP+ - HER2 -
CRIBRIFORME	<ul style="list-style-type: none"> - 1% dos cânceres de mama - Frequente associação com carcinoma tubular - Bom prognóstico 	<ul style="list-style-type: none"> - Decaptação apical frequente 		<ul style="list-style-type: none"> - RE+ - RP+ - HER2 +/-
MEDULAR	<ul style="list-style-type: none"> - Pouco comum - Prognóstico melhor que CDI SOE - Alta frequência em pacientes com mutação BRCA1 	<ul style="list-style-type: none"> - Macroscopia: margens expansivas - Grau III - Crescimento sincicial, bordos celulares indistintos - Infiltrado linfocitário 		<ul style="list-style-type: none"> - RE- - RP- - HER2 -
MUCINOSO	<ul style="list-style-type: none"> - 1% dos cânceres de mama - Excelente prognóstico 	<ul style="list-style-type: none"> - Maioria grau I ou II - Macroscopia: gelatinoso, margens expansivas 		<ul style="list-style-type: none"> - RE+ - RP+ - HER2 +/-
PAPILAR	<ul style="list-style-type: none"> - < 1-2% dos cânceres de mama - Pacientes pós-menopausa - Prognóstico satisfatório 	<ul style="list-style-type: none"> - componente invasor constando de estruturas papilares compostas por eixo conjuntivo-vascular revestido por células epiteliais malignas - Frequentemente associado a carcinoma ductal 		<ul style="list-style-type: none"> - RE+ - RP+ - HER2 -
MICROPAPILAR	<ul style="list-style-type: none"> - < 2% dos cânceres de mama - 77% metástase axilar 	<ul style="list-style-type: none"> - Macroscopia: lobulado, margens expansivas 		<ul style="list-style-type: none"> - RE+/- - RP+/- - HER2 +

APÓCRINO	- Prognóstico semelhante ao CDI SOE	- Células apócrinas com citoplasma finamente granula PAS+		- RE- - RP- - HER2 – - MB +
METAPLÁSICO	- < 1% dos cânceres de mama - incomum metástases axilares (mais freqüente com diferenciação escamosa ou fusocelular) - Carcinosarcomas são mais agressivos	- Adenocarcinomas puros com diferenciação escamosa/ fusocelular ou mistos com componente mesenquimal (condróide, ósseo ou carcinosarcoma)		- RE- - RP- - HER2 –
ADENÓIDE CÍSTICO	- 0,1% dos cânceres de mama - baixo potencial de malignidade	- histologicamente semelhante ao da glândula salivar Origem na célula basal mioepitelial		- RE- - RP- - HER2 –
SECRETOR	- < 0,15% dos cânceres de mama - ocorre em crianças e adultos jovens	Macroscopia: nódulo circunscrito Baixo grau histológico Secreta material intra e extracelular (Milk like)		- RE- - RP- - HER2 –

- IIQ: Imunoistoquímica
 - MO: Medula Óssea
 - CDI SOE: Carcinoma ductal invasor sem outra especificação
 - RE: Receptor de estrogênio
 - RP: Receptor de progesterona
- Fonte: Fotomicrografias dos sites : atlasgeneticsoncology.org ; breastpathology.info

2.2.2 Graduação histológica

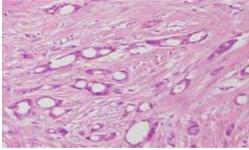
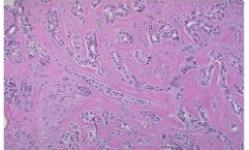
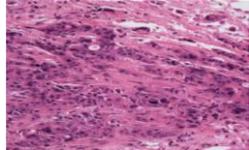
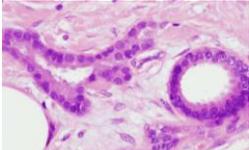
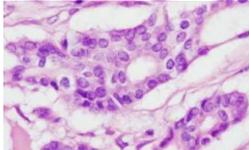
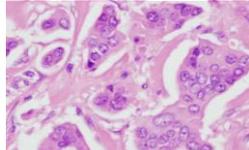
O grau histológico é um dos principais fatores prognósticos em câncer de mama, definido como categoria I pelo Colégio Americano de Patologistas, ou seja, suficientemente estudado e comprovado quanto à utilidade na prática clínica (FITZGIBBONS *et al.*, 2000).

Na reunião de St Gallen em 2007, o grau histológico continuou sendo mantido dentro das variáveis na avaliação das categorias de risco, juntamente com estado linfonodal, o tamanho do tumor, a avaliação dos receptores hormonais e da superexpressão do HER2, a invasão vascular extensa e a idade da paciente ao diagnóstico.

O sistema de graduação mais comumente utilizado é o de Nottingham (sistema de graduação de Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis) combina o grau nuclear, a formação de túbulos e a taxa mitótica (quadro 2). Mais de 80% das mulheres com tumores

de grau 1 sobrevivem 16 anos, enquanto menos de 60% das mulheres com tumores de grau II e grau III sobrevivem durante o mesmo período de tempo (BARROS; BUZAID, 2007).

QUADRO 2 - SISTEMA DE GRADUAÇÃO DE NOTTINGHAM

	Escore 1	Escore 2	Escore 3
Formação de túbulos	>75%	10-75%	<10%
			
Pleomorfismo Nuclear	Uniformes/ regulares	Tamanho/variabilidade moderados	Marcada variação
			
Contagem mitótica * (no.mitoses/10CGA)	0-6	7-14	>14
GRAU I	Somatória 3 a 5 pontos		
GRAU II	Somatória 6 a 7 pontos		
GRAU III	Somatória 8 a 9 pontos		

* Valores ajustados para microscópio Olympus CH30

FONTE: Adaptado de Mayo Clinic - Department of Laboratory Medicine and Pathology; Rochester, MN. Fotomicrografias do site: breastpathology.info

2.2.3 Envolvimento linfonodal

O envolvimento do linfonodo loco-regional por metástase de carcinoma de mama, como parâmetro isolado, é um dos mais importantes fatores prognósticos do câncer de mama, capaz de prever a sobrevida livre de doença e a sobrevida

global. Somente 20-30% das pacientes com linfonodo negativo poderão desenvolver recorrência da doença em 10 anos, comparado com cerca de 70% das pacientes com envolvimento axilar (FITZGIBBONS *et al.*, 2000).

2.3 MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS VALIDADOS PARA APLICAÇÃO CLÍNICA

Além dos fatores prognósticos clássicos como estadiamento TNM, tipo e grau histológico, os receptores hormonais de estrógeno (RE) e de progesterona (RP) e a super-expressão do HER2 estão atualmente validados e se consolidaram como alvo terapêutico (FITZGIBBONS *et al.*, 2000; WOLLF *et al.*, 2007).

2.3.1 Receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP)

Os estrogênios são reconhecidos como agentes estimuladores da proliferação celular mamária. Sua fração mais potente, o estradiol, liga-se com os RE e induz a produção de fatores de crescimento que estimulam a divisão celular por efeito autócrino.

Observações epidemiológicas ressaltaram os efeitos da exposição prolongada ao estrógeno e sua associação com maior risco de desenvolvimento do câncer de mama. Contrariamente, a menarca mais tardia, ciclos anovulatórios, menopausa cirúrgica mostraram ter efeito protetor. Essas observações foram a base do desenvolvimento das terapias hormonais (OSBORNE, 1998; HORTOBAGYI, 2004). A descoberta da ativação de vias de sinalização a partir da ligação do estradiol aos receptores proporcionou a criação dos moduladores seletivos dos receptores de estrógeno, sendo o tamoxifeno um dos principais representantes até há poucos anos.

O RE foi identificado pela primeira vez nos anos 60 e durante décadas a dosagem de receptores hormonais foi realizada com macerados de tecido tumoral através de métodos bioquímicos como PCR quantitativo, amplificação por Southern blott e ELISA (MANSOUR; RAVDIN; DRESSLER, 1994).

Avanços na técnica para detecção dos receptores hormonais possibilitaram a determinação mediante a realização de imunoistoquímica, o que trouxe várias

vantagens à prática clínica, como a possibilidade de ser realizada nos cortes de material parafinado, sem prejuízo do exame anatomopatológico, a identificação precisa da expressão em células tumorais e não em células epiteliais normais entremeadas ao tumor, além de uso em estudos retrospectivos em material parafinado arquivado (HENSON *et al.*, 1995; MOLINO *et al.*, 1997; STIERER *et al.*, 1998) .

O *status* dos receptores hormonais tem valor prognóstico no intervalo livre de doença, no intervalo livre de metástases e na sobrevida geral (REINER *et al.*, 1990; ALLRED *et al.*, 1998). A sobrevida geral das pacientes após uma primeira metástase também é significativamente maior nos tumores RE positivos em relação aos tumores RE negativos (YAMASHITA *et al.*, 2006). Quando comparado ao TNM e grau histológico, o *status* hormonal tem menor valor prognóstico, sendo que o maior interesse permanece como fator preditivo auxiliar na decisão da conduta terapêutica adjuvante (BARDOU *et al.*, 2003).

Diversos estudos mostram que há uma variação ampla quanto à definição da positividade dos receptores hormonais. Alguns autores propuseram formas de quantificação do número e / ou intensidade de células marcadas (REINER *et al.*, 1990; ALLRED *et al.*, 1998). Na prática clínica, entretanto, observa-se grande uso da estimativa percentual, com valores de corte que variam de 1% a 10% de células marcadas, que mostram boa correlação com os esquemas de graduação que avaliam simultaneamente a intensidade e o número de células marcadas (GOBBI *et al.*, 2000; YAMASHITA *et al.*, 2006).

OYAMA *et al.*, (2007), ao comparar os métodos de avaliação da expressão dos receptores hormonais de forma quantitativa (percentual) e a mista (análise de intensidade e percentual de células marcadas), verificou que a avaliação percentual obteve melhor consistência de resultados.

Há variações no padrão de expressão dos receptores hormonais, observando-se tumores positivos para ambos os receptores (RE+/RP+), positivos para apenas um dos receptores (RE+/RP- ou RE-/RP+), e negativos para ambos os receptores (RE-/RP-), com diferenças na mortalidade de cada grupo (DUNNWARD *et al.*, 2007). As pacientes com ambos os receptores negativos apresentam poucos benefícios clínicos quando submetidas a hormonioterapia, principalmente num cenário de adjuvância. Num dos estudos (BARDOU *et al.*, 2003), as pacientes que

apresentaram positividade para RE e negatividade para RP tiveram benefícios reduzidos com o uso de tamoxifeno adjuvante.

Outros autores (DOWSETT *et al.*, 2001) mostraram maior expressão de HER2 nesse grupo de tumores (RE+/RP-) comparativamente aos tumores positivos para ambos os receptores (RE+/RP+), sugerindo maior benefício com terapias de privação estrogênica em relação ao tamoxifeno. A pior resposta ao tamoxifeno provavelmente é decorrente de redução de suas atividades antagônicas secundária à ativação da cascata de sinalização desencadeada pelo fator de crescimento epitelial HER2 (OSBORNE *et al.*, 2003, 2005).

Nos casos de negatividade para ambos os receptores, há necessidade de se utilizar marcadores adicionais na tentativa de identificar os eventuais subgrupos de maior ou menor risco e prognóstico. Num dos trabalhos da literatura (NAGAHATA *et al.*, 2004) usou-se a técnica de cDNA microarrays e identificou-se um grupo de 71 genes com expressão aumentada nas pacientes com pior evolução clínica (óbito em 5 anos após a cirurgia), propondo um sistema de classificação de risco baseado na expressão gênica aberrante.

Com o desenvolvimento de resistência primária e secundária ao tratamento hormonal, foram criadas novas substâncias e novos esquemas de associação com bloqueadores dos receptores de fatores de crescimento, potencializando o efeito das drogas e recuperando a capacidade de resposta à quimioterapia. Algumas dessas substâncias são os inibidores das aromatases (anastrozol, letrozol), fulvestranto (antagonista dos receptores de estrogênio e progesterona), pan-inibidores de EGFR (GW572016), inibidores da mTOR (rapamicina, RAD001- inibir o controlador central do crescimento tumoral e da angiogênese), a anti-HER2 (trastuzumab) e os taxanos (paclitaxel, docetaxel) (MUNSTER; NORTON, 2001).

2.3.2 HER 2

Localizado no braço longo do cromossomo 17 (Chr 17q21), o protooncogene c-erbB-2/HER-2 neu codifica um receptor glicoprotéico transmembranar de fator de crescimento epitelial com atividade tirosinoquinase (SLAMON *et al.*, 1987; ROSS *et al.*, 2004). Esse receptor é uma glicoproteína de 185 kD (p185HER2) pertencente à família dos receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR – *epidermal growth factor receptors*). Aproximadamente 15 a 20% dos carcinomas mamários

apresentam amplificação do gene HER2neu (SLAMON *et al.*, 1987; YAZIJI *et al.*, 2004). A expressão aumentada nas pacientes com carcinomas linfonodo-negativos está correlacionada com pior prognóstico, negatividade para os receptores de estrógeno e progesterona e menor resposta à quimio e hormonioterapia (YAMAUCHI *et al.*, 2001). Sob condições normais, as 2 cópias do gene HER-2 em uma determinada célula produzem uma pequena quantidade do receptor protéico na superfície celular, designado de p185HER2 (utilizaremos o termo HER2 neste texto). Esse receptor protéico desempenha importante papel na transmissão dos sinais do meio extracelular para o núcleo da célula, exercendo controle sobre a divisão e crescimento da célula normal. Quando o gene HER-2 está amplificado, há “expressão excessiva do HER-2” (*HER-2 overexpression*) traduzida pelo aumento do número de receptores na superfície celular (SLAMON *et al.*, 1987). Como o receptor está intimamente envolvido com a transmissão de sinais relacionados à proliferação celular, a divisão celular é estimulada, resultando em um crescimento celular acelerado, que contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer.

Os métodos disponíveis na prática clínica para a detecção da expressão excessiva de HER-2 estão relacionados à amplificação do gene e à expressão excessiva de seu produto protéico, a proteína p185HER2. Para a detecção da amplificação do gene propriamente dita há dois métodos: FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) e CISH (*Chromogenic in situ hybridization*). Seu princípio consiste na visualização "*in situ*" da amplificação do gene através de sua identificação com sondas de DNA complementares marcadas com fluorocromo ou cromógeno. Esses métodos demonstram o número aumentado de cópias do gene, em relação às 2 cópias encontradas na célula normal (O'GRADY *et al.*, 2003).

A identificação do produto do gene, a proteína HER2, através da técnica imunoistoquímica (IIQ), utiliza um anticorpo policlonal obtido em coelhos imunizados com a oncoproteína humana sintética. O anticorpo apresenta alta afinidade pelo domínio extracelular da proteína HER2. A expressão excessiva deste produto é então demonstrada na membrana celular das células tumorais em preparados histológicos do tumor. Em uma segunda etapa da reação, liga-se ao anticorpo primário um anticorpo secundário ligado a uma enzima e um polímero de amplificação dos sinais da reação que aumenta a sensibilidade do método. A reação produz um precipitado de coloração marrom de padrão membranoso, sendo a reação semiquantificada visualmente ao microscópio óptico comum, divididos em

grupos: negativo (escores 0 e 1+), duvidoso (2+) e positivo (3+) (STIEPCICH, M. M. A., 2007).

A partir da utilização de linhagens celulares nas quais o número de receptores de HER2 na superfície é conhecido, estabeleceu-se um método imunistoquímico padronizado e um sistema de classificação dos resultados através de escores. Células com menos de 20.000 receptores não apresentariam marcação (escore 0); células com cerca de 100.000 receptores mostrariam marcação parcial do contorno da membrana em menos de 30% das células tumorais (escore 1+); células contendo cerca de 500.000 receptores poderiam mostrar marcação completa de membrana com intensidade leve a moderada em mais de 10% das células neoplásicas (escore 2+); e células apresentando cerca de 2.300.000 receptores de superfície mostram marcação completa e de forte intensidade da membrana, em mais de 10% das células neoplásicas (escore 3+). A padronização da fixação dos espécimes, o processamento com controle de temperatura dos reagentes, e o rigoroso controle técnico da reação imunistoquímica mostraram que há excelente correlação do número de cópias de genes com o nível de expressão protéica (SCHNITT; JACOBS 2001; HAYES; THOR, 2002).

A partir desses conhecimentos, foi desenvolvido um anticorpo monoclonal humanizado recombinante (rhuMab 4D5, trastuzumab, HERCEPTIN®) que apresenta alta afinidade para p185HER2 e inibe o crescimento de células do câncer de mama que têm expressão aumentada de HER2. Esse anticorpo é dirigido contra o domínio extracelular da proteína. Ensaios clínicos bem controlados demonstraram inicialmente a atividade do trastuzumab em casos de câncer de mama avançados (linfonodos axilares positivos), com expressão aumentada de HER2, constituindo-se em evidência clínica pioneira da utilização de anticorpos dirigidos contra receptores de fator de crescimento para o tratamento do câncer de mama em humanos (SLAMON *et al.*, 2001). Posteriormente, com a ampliação dos ensaios clínicos e a utilização do trastuzumab em pacientes com estádios clínicos precoces, comprovou-se significativa redução do risco de óbitos e aumento da sobrevida livre de doença também nesse grupo de pacientes (SLAMON *et al.*, 2001; VOGEL *et al.*, 2002; SLAMON *et al.*, 2005; GOLDBIRSCHE *et al.*, 2007).

Somente as pacientes com escore 3+ no exame IIQ são qualificadas para o tratamento com trastuzumab. Aquelas com escore 2+ são submetidas à pesquisa de amplificação do gene através de FISH e, se for confirmada a amplificação, passam a

ser elegíveis ao tratamento. O guia americano de orientação ao tratamento do câncer de mama da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology* - ASCO) tem indicado o teste de identificação da amplificação de HER2 para todos os novos casos de câncer desde 2001 (BAST *et al.*, 2001). A estratégia de detecção da amplificação que parece ter a melhor relação custo-benefício é fazer a pesquisa inicial com o exame imunohistoquímico, com confirmação através de FISH para os casos que tenham escores 2+ (DENDUKURI *et al.*, 2007). A expressão da proteína se preserva no tecido incluído em parafina, tendo sido obtidos resultados fidedignos em material arquivado por até 10 a 15 anos (FERGENBAUM *et al.*, 2004). Este fator assume relevância na medida em que permite a análise retrospectiva de casos submetidos a tratamento com resposta desfavorável aos esquemas terapêuticos convencionais, e nos quais se considere o trastuzumab como opção terapêutica adicional.

A participação em programas internacionais de acreditação é recomendada como parte fundamental do controle de qualidade dos laboratórios que realizam a imunohistoquímica para pesquisa de superexpressão do HER2 (KAY *et al.*, 2004; WOLFF *et al.*, 2007). Ressalta-se ainda que é de fundamental importância a fixação, processamento e padronização das reações, da parte técnica e da interpretação dos resultados para a melhor correlação com o significado biológico e resposta à terapêutica (JØRGENSEN; NIELSEN; EJLERTSEN, 2007; STIEPCICH, M. M. A., 2007).

2.4 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

Desde o início desta década, o estudo do perfil molecular do carcinoma de mama vem mostrando um importante avanço a partir da identificação dos perfis de expressão gênica propostos por Perou *et al.* (2000) que foram baseados em estudos com *cDNA microarrays*. Neste trabalho pioneiro, os autores estudaram uma plataforma de mais de 8.000 genes humanos, pertencentes a 42 pacientes, e conseguiram definir perfis de expressão diferentes para os carcinomas de mama. O primeiro nível de classificação separou tumores negativos para o receptor de estrógeno (RE) e tumores positivos para a expressão deste receptor, porque a maior diferença no perfil global de expressão gênica foi observada entre os tumores

positivos e negativos para este receptor. Subseqüentes análises mais refinadas foram realizadas em modelos propostos por vários pesquisadores (SORLIE *et al.*, 2001; BERTUCCI *et al.*, 2000). A rigor, correlacionando os subtipos de carcinoma de mama com parâmetros clínicos relevantes, como o tempo de sobrevida e o tempo livre de doença destas mulheres, foi possível distinguir os atuais conceitos em que se baseia a classificação molecular conforme a seguir:

- Luminal A (fenótipos RH positivo/HER2 negativo): Foi caracterizado pela elevada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas (CK) 7, 8,18 e 19. A este fenótipo está associada a assinatura genética de melhor prognóstico, e não se verifica expressão aumentada de HER2 . A maioria dos carcinomas não relacionados a mutações genéticas, são caracterizados por este perfil (SORLIE, 2004).
- Luminal B (fenótipos RH positivo/HER2 positivo): Foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas (CK) 7,8,18 e 19. A este fenótipo está associada a assinatura genética de pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (subtipo Superexpressão do HER2 e Basal). Provavelmente, este perfil esteja ligado a mutações genéticas (SORLIE, 2004).
- Superexpressão do HER2 (fenótipos RH negativo/HER2 positivo): Foi caracterizado pela expressão aumentada de vários genes expressos nas células progenitoras, células mais indiferenciadas. A amplificação do oncogene HER2, e concomitantemente a superexpressão de sua proteína, é atualmente implicada como um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama (TANNER *et al.*, 2000). Provavelmente, este perfil também não esteja relacionado a mutações genéticas (SORLIE *et al.*, 2001).
- Basalóide (fenótipos RH negativo/HER2 negativo): Foi caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais (SORLIE, 2004). De acordo com as mais recentes publicações, este fenótipo mostra positividade para CK5/6, CK14, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina, p63 e CK17 que são proteínas expressas nas células basais/mioepiteliais (MATOS *et al.*, 2005; SORLIE *et al.*,

2001, 2004; NIELSEN *et al.*, 2004; VAN DE RIJN *et al.*, 2002; VAN'T VEER, 2002) . Este perfil está ligado a mutações genéticas (SORLIE, 2004), e é um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois tem associação com pior prognóstico e não possui um alvo terapêutico definido como os outros subtipos (BERTUCCI, 2006). Portanto, não responde ao tratamento com drogas anti-estrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2 *trastuzumab* (ROSS; FLETCHER, 1999; TANNER, 2000).

- Normal *Breast-Like*: Último grupo identificado por Perou *et al.* (2000) através do aumento da expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células não epiteliais. Estes tumores também mostraram forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão para genes do epitélio luminal. Apesar disso, ainda não está clara sua distinção e seu valor clínico (SORLIE, 2004).

Quando comparados os prognósticos destes diferentes subgrupos, observou-se que o grupo Basaloide e Superexpressão HER2 mostraram comportamento clínico mais agressivo, enquanto luminais estavam associados a melhor prognóstico.

Em estudo de Millikan *et al.*, (2008), analisando o padrão epidemiológico dos subtipos moleculares em 1.424 casos de carcinomas *in situ* de mama, encontraram o subtipo luminal A como sendo o mais freqüente e exibindo correlação com os fatores de risco tipicamente reportados, como associação inversa com paridade e idade precoce da primeira gestação. Já nos casos Basalóides, as associações foram opostas, com aumento do risco em relação a maior paridade e idade precoce da primeira gestação.

O principal interesse em caracterizar os níveis de expressão gênica do carcinoma de mama está na determinação do subtipo Basalóide por meio da verificação das citoqueratinas basais (CK5, CK6, CK14 e CK17) (REIS-FILHO *et al.*, 2003; SORLIE *et al.*, 2004), EGFR, p-63 e P-caderina (MATOS *et al.*, 2005). A importância e a grande atenção neste subtipo de carcinoma de mama vem aumentando nos últimos anos devido à freqüente demonstração de um pior desfecho e menor sobrevida livre de doença para as pacientes (NIELSEN *et al.*, 2004; SORLIE, 2004).

Em revisão de Sorlie *et al.*, (2004) investigaram se os diferentes subtipos do carcinoma de mama poderiam representar grupos clinicamente distintos, utilizando

para tanto análise univariada, comparando com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença. A curva de Kaplan-Meier, baseada em quatro subtipos (excluindo o Normal *Breast-Like*) mostrou diferenças altamente significantes na sobrevida global entre as pacientes de subclasses diferentes. Resultados intrigantes foram observados no subtipo Luminal, revelando diferentes desfechos. A observação entre os tipos Luminal A e Luminal B, evidenciou que o subtipo Luminal B pode representar um grupo clinicamente distinto com pior curso da doença, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, provavelmente por similaridades deste grupo com os tumores RE negativos (Carcinoma Basal-símile e o Superexpressão do HER2).

Em 2006, Sorlie *et al.* validaram e caracterizaram os dois principais subtipos do carcinoma de mama, previamente definidos como clinicamente relevantes (subtipo Luminal A e Basalóide), em amostras de vários tipos histológicos de carcinoma de mama em estágios iniciais, utilizando três diferentes plataformas em DNA *microarray*. A caracterização destes dois subtipos revelou que mecanismos distintos podem ser pré-programados, em estágios iniciais, nestes diferentes subtipos da doença. Os resultados observados produziram maiores evidências que tais subtipos representam entidades biologicamente distintas, e que podem necessitar de estratégias terapêuticas diferentes.

2.4.1 O fenótipo basalóide

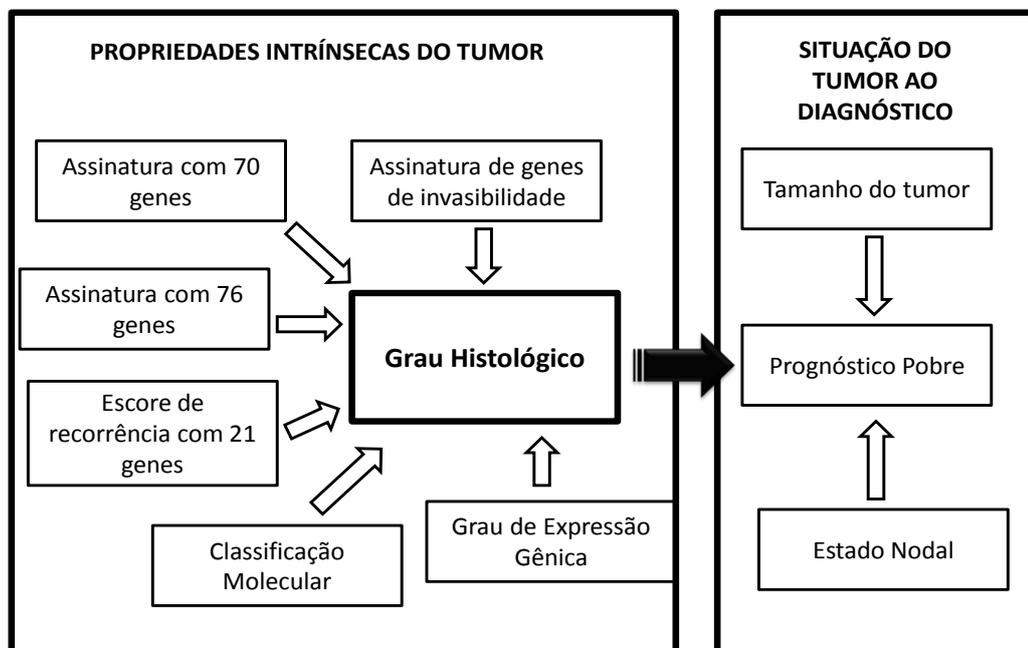
O subgrupo de carcinoma Basalóide foi assim designado por estudo de perfil de expressão gênica, por apresentarem genes que são identificados em células basais/mioepiteliais normais dos ductos e ácinos mamários, sendo considerado padrão ouro para a identificação de carcinomas basalóides como uma classe molecular específica de câncer de mama.

Considerando que os genes para se expressarem, necessitam que o RNA mensageiro produza suas proteínas, a utilização da imunistoquímica para identificação dessas proteínas é de inestimável importância clínica, já que podem ser utilizadas na prática diária, estão disponíveis em larga escala para uso clínico e proporcionam estudos retrospectivos usando amostras fixadas em formalina e incluídas em parafina. Portanto, a histopatologia e os “microarrays” gênicos não são

métodos excludentes, nenhum substitui o outro e ambos trazem informações que se complementam (NIELSEN *et al.*, 2004).

A importância da associação de métodos moleculares de ponta e a histopatologia pode ser comprovada também pelas assinaturas genéticas para câncer de mama, que dividem os tumores de acordo com a sua agressividade. Os estudos sobre assinaturas genéticas (SOTIRIOU *et al.*, 2006; FOEKENS *et al.*, 2006; FAN *et al.*, 2006; DESMEDT *et al.*, 2007), apesar de terem adicionado informações prognósticas independentes, refletem também características morfológicas, centralizadas principalmente no grau histológico que, unido ao tamanho do tumor e estado nodal, refletem o comportamento biológico dos tumores (quadro 3). Independente dos genes estudados por cada grupo de assinaturas genéticas, os carcinomas que expressam fenótipo basalóide estão com maior frequência representados nos grupos de pior prognóstico.

QUADRO 3 – VARIÁVEIS MORFOLÓGICAS ASSOCIADAS ÀS ASSINATURAS GÊNICAS NA DETERMINAÇÃO PROGNÓSTICA



O fenótipo basalóide estudado por imunohistoquímica teve seus primórdios na década de 80, quando Moll *et al.* (1982) estudaram um catálogo de citoqueratinas em carcinomas de mama, na mama normal e em cultura de células. Num total de 55 carcinomas, salientaram a identificação de 3 deles com expressão de CK6, entretanto não discutiram o significado clínico deste achado.

Posteriormente, Knight *et al.* (1985) identificaram pela primeira vez CK5 (citoqueratina ácida) e CK14 (citoqueratina básica) na camada basal da pele, que foram então denominadas como citoqueratinas basais.

Em 1986, Nagle *et al.* pesquisaram duas citoqueratinas (CK5 e CK19) em carcinomas de mama, subdividindo-os em de origem luminal (CK19 positivas) e basal (CK 5 positivas), nos quais 7% representavam carcinomas com fenótipo basal.

Em 1990, o grupo de Domagala *et al.* publicaram 3 artigos onde associaram marcadores basais e vimentina com comportamento biológico mais agressivo (recidiva local, alto grau histológico, RE negativo e elevado índice proliferativo).

E, finalmente, no mesmo ano em que Perou *et al.* (2000) publicaram o estudo de perfil gênico, o grupo de Tsuda *et al.*, (2000) publicaram interessante artigo descrevendo as características morfológicas dos tumores com diferenciação mioepitelial e sua associação com metástases precoces para pulmão e cérebro, que incluíam carcinomas de alto grau histológico com zona central acelular.

De fato, os estudos mais atuais confirmaram e refinaram os achados das décadas de 80 e 90. A expressão de marcadores basais tem sido observada em 2-18% de todos os carcinoma ductais e em mais de 25% dos carcinomas grau III. A maioria destes tumores são de alto grau histológico, apresentam necrose central, por vezes apresentam células fusiformes ou metaplasia escamosa, têm alto índice proliferativo e são negativos para receptores hormonais e HER-2. Foi reportado que estes tumores estão associados a alto risco de metástases cerebrais e pulmonares, e por óbito devido ao câncer independente do estatus nodal e do tamanho do tumor (VAN DE RIJN, 2002; JONES, 2004; ABD EL-REHIM, 2004; NIELSEN, 2004).

Ainda não há consenso nas definições de carcinoma basalóide. Tem sido proposto que a expressão de citoqueratinas de alto peso molecular incluindo CK 5, 14 e 17 podem ser utilizadas para a identificação destas lesões em material fixado em formalina e parafinado (VAN DE RIJN, 2002; JONES, 2004; ABD EL-REHIM, 2004).

Nielsen *et al.* (2004) desenvolveram um painel imunoistoquímico para identificação de carcinomas basalóides. De acordo com a definição proposta, carcinomas basalóides são negativos para receptor de estrógeno e HER-2 e são positivos para citokeratinas basais, EGFR (ou HER-1) e/ou c-KIT.

Jones *et al.* (2004) analisaram uma série de carcinomas ductais de alto grau divididos em basalóides e não-basalóides definidos pela expressão imunoistoquímica de citoqueratina CK14 utilizando Hibridização Genômica Comparativa (CGH). Identificaram um subgrupo com características genéticas moleculares específicas que tinham comportamento biológico mais agressivo, onde estavam incluídos a maioria dos casos de carcinoma RE negativos e CK14 positivos. Não realizaram estudo citogenético em relação aos RE positivos.

Tendo como base a heterogeneidade dos carcinomas basalóides do ponto de vista molecular e o fato de que estes tumores freqüentemente apresentam áreas de células fusiformes e metaplasia escamosa, foi investigado e comprovado por diversos autores que os carcinomas metaplásicos da mama fazem parte do grupo de carcinomas basalóides. De fato, 93% de todos os carcinomas metaplásicos mostraram perfil basalóide em estudo de Reis-Filho *et al.* (2005).

Além do carcinoma metaplásico da mama, acredita-se que outros tipos histológicos de carcinoma mamário também façam parte do espectro de lesões basalóides. Os carcinomas secretores, que têm se mostrado negativos para RE, RP e HER2, também foram estudados de acordo com sua expressão de citoqueratinas basais e p63. Apesar destes tumores apresentarem características morfológicas e perfil molecular genético distintos dos demais carcinomas basalóides, sugere-se que eles representem o componente de baixo grau no compartimento destas lesões. Estudo de Jacquemier *et al.* (2005) encontrou alta diferenciação basal em carcinomas medulares da mama aplicando um pool de 18 anticorpos já descritos em lesões basalóides, sugerindo que este tipo especial também pode ser incluído nesta categoria.

Todos esses dados agrupados sugerem que o grupo de carcinomas basalóides compreende não apenas uma entidade única, carcinomas ductais de alto grau citoqueratinas basais positivo e RE e HER2 negativo, mas um espectro de lesões variando desde o carcinoma metaplásico até o carcinoma secretor. Mesmo o grupo de carcinomas ductais de alto grau com fenótipo basal parece ser

heterogêneo do ponto de vista molecular, genético e de comportamento clínico (JONES *et al.*, 2004).

Além da implicação prognóstica da determinação do fenótipo basal, estudos recentes têm também demonstrado que estas lesões estão associadas ao câncer mamário hereditário.

Laakso *et al.* (2005) mostraram que o uso do anticorpo combinado de citoqueratinas CK5/14 foi fidedigno para caracterização deste fenótipo quando relacionado a casos com mutação de BRCA 1. Lakhani *et al.* (2004) utilizando os marcadores basais CK 14, CK 5/6, CK17 e EGFR encontraram relação significativa entre carcinoma basalóide e mutação de BRCA 1, afirmando que esta caracterização tem alta acurácia na predição de câncer hereditário por mutação do BRCA 1. A mesma freqüência não foi encontrada para os casos de mutação do BRCA 2. A alta percentagem de casos desse subgrupo que apresenta positividade para o EGFR indica também um possível benefício do uso de terapias específicas anti-tirosino-quinase. Palacios *et al.* (2005) utilizaram como marcadores de células basais em carcinomas de mama os anti-corpos CK 5/6 e P-cadherin, encontrando também correspondência significativa entre os casos hereditários relacionados a BRCA-1. Estes achados sugerem que a utilização de painel imunoistoquímico para identificação de carcinomas basalóides auxilia na caracterização do câncer familiar como entidade biológica distinta do câncer esporádico, podendo ser uma ferramenta útil para selecionar mulheres que deveriam submeter-se ao rastreamento de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2.

Em 2007, Fadare e Tavassoli revisaram o conceito e os painéis utilizados por 150 autores sobre carcinoma basalóide de mama. Todos utilizavam critérios distintos e portanto encontraram percentuais diferentes destes carcinomas, mostrando que o critério imunoistoquímico para definição deste fenótipo ainda é controverso e requer um consenso entre os pesquisadores.

Rakha *et al.* (2009) em artigo de revisão, discutem as várias combinações imunoistoquímicas propostas para definição de carcinoma basalóide e a falta de consenso internacional sobre os marcadores que definem um Carcinoma Basalóide. Ressalta que, a própria definição sugerida pelos estudos de perfil gênico, é incompleta e possui algumas faltas consideráveis. Assim, alguns autores requerem a não reatividade para receptores hormonais e a HER2 para considerarem um tumor como carcinoma basalóide. Estes autores consideram essa definição bem

específica, mas muito falha em termos de sensibilidade para a detecção de tumores basalóides. Em adição, outros marcadores que também servem como requisitos mínimos para a definição de um carcinoma basalóide são o EGFR, c-kit, P-caderina, nestina, osteonectina, vimentina e laminina. Citaram o estudo de Tang, Wang e Bourne (2008), que comparou diferentes definições imunoistoquímicas de tumores basalóides em 195 cânceres de mama e mostraram que as taxas de tumores definidos como basais variavam de 14%-40%; 19%- 76% para tumores de algo grau e 1%-7% para carcinomas que não fossem de alto grau. Em todas as classificações, carcinomas basalóides se relacionavam fortemente com a graduação do tumor. Concluem que essas classificações relacionam-se, mas não são intercambiáveis. Conseqüentemente essa variabilidade nas definições imunoistoquímicas criou certo grau de discordância e de resultados contraditórios entre diferentes estudos a respeito de definição de classes, seu significado prognóstico e seu comportamento. A esse respeito, o próprio câncer de mama basalóide não é único, já que muitas outras variáveis prognósticas e mesmo diagnósticas já estabelecidas vêm sofrendo mudanças ao longo do tempo. Por exemplo, não se conseguiu um consenso sobre o índice de positividade para RE, evidências recentes levaram a mudança do critério para a positividade de HER2 e não há um consenso universal a respeito da avaliação de RP em cânceres de mama. Portanto é importante mencionar que a classe basalóide veio à luz a alguns anos atrás e pesquisas estão sendo feitas com o objetivo de identificar os melhores critérios para a identificação desses tumores, e quais podem oferecer os melhores significados biológicos e clínicos em termos de biologia, prognóstico, predição de comportamento e resposta a terapia específica.

2.4.2 EGFR (HER1/c-erbB1)

A família de receptores conhecidos como “fator de crescimento epidérmico”, é constituída por quatro receptores da tirosina-kinase, que são o receptor do fator do crescimento epidérmico (EGFR/HER1/c-erbB1), o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2/c-erbB2), o HER3 (c-erbB3) e o HER4 (c-erbB4) (REIS-FILHO *et al.*, 2005).

O gene do EGFR está localizado no cromossomo 7p11.2-p12 e compreende 28 exons. Foi o primeiro receptor transmembrana a ser ligado diretamente com o câncer em humanos (HYNES; LANE, 2005). O EGFR é uma proteína existente na

superfície celular, que quando ativada pelo fator de crescimento epidérmico (EGF), desencadeia a atividade da tirosina-quinase. O fator de crescimento epidérmico (EGF) é um peptídeo que induz a proliferação celular pela ativação do EGFR, o qual tem um domínio na tirosina quinase citoplasmática, um domínio único transmembranáceo e um extracelular envolvido na ligação do EGF e dimerização do receptor. A amplificação deste gene tem sido descrita em diferentes tumores, principalmente em sistema nervoso central, pulmão e estômago (MARQUEZ *et al.*, 2004; TAKEHANA *et al.*, 2003; GIACCONE *et al.*, 2005) Recentemente, a expressão da proteína do EGFR foi descrita nos carcinomas de mama (REIS-FILHO *et al.*, 2005), sobretudo no carcinoma metaplásico, que embora seja menos freqüente, encontra-se inserido na via de diferenciação da célula progenitora/mioepitelial da carcinogênese mamária (REIS-FILHO *et al.*, 2003, 2006). Os carcinomas metaplásicos de mama são tumores de subtipo basal que apresentam superexpressão da proteína e amplificação do gene do EGFR (HER1/c-erbB1), e não exibem do HER2/c-erbB2, em análises de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) e na imunistoquímica (REIS-FILHO *et al.*, 2005).

Em 2005, Nielsen e colaboradores estudaram 21 casos de carcinomas basalóides e encontraram positividade para EGFR tanto pelo perfil de expressão gênica quanto por imunistoquímica. A expressão do EGFR mostrou positividade quando corava focal ou difusamente citoplasma e/ou membrana. Encontraram também 3 casos de carcinoma basalóide com positividade para RE.

A mutação ativadora do EGFR, como observada no câncer de pulmão e que valida o uso de uma pequena molécula com atividade inibidora de tirosino-quinase anti-HER1 e HER2, lapatinib (Tykerb, GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA), para tratamento não foi observada em estudo com carcinoma metaplásico da mama por Reis-Filho e colaboradores em 2006. Mas os autores questionaram se esses tumores não poderiam ser tratados, já que alguns cânceres de pulmão que não apresentam mutação ativadora, mas apresentam superexpressão respondem ao inibidor de EGFR. Mais recentemente resultados sugeriram melhora na evolução clínica de pacientes com doença avançada da mama quando adicionada ao lapatinib esquemas com capecitabina (GEYER *et al.*, 2006). Foi posteriormente demonstrado em 2007 por Katz *et al.* que Lapatinib poderia inibir o poder metastático conferido pela molécula cten nos casos de câncer de mama com superexpressão de EGFR. Atualmente esta droga já foi aprovada no Brasil pela ANVISA para uso em

carcinomas metastáticos de mama que progrediram mesmo após tratamento com trastuzumab.

Estas recentes perspectivas de terapia alvo com inibidores do EGFR requerem que mais estudos sejam feitos na população brasileira para se caracterizar o perfil das pacientes, com suas peculiaridades regionais e disponibilizar exames mais acurados para a indicação destas terapias no nosso meio.

2.4.3 Citoqueratinas

O citoesqueleto, uma rede complexa de filamentos intermediários (FI) que se estendem do núcleo até a membrana citoplasmática, possui propriedades estruturais intrínsecas de auto-organização e reação a estímulos externos que lhe conferem características muito peculiares e versáteis, é crítico para a mobilidade celular, sustentação da membrana celular, formação de vias de transporte de organelas e outros elementos através do citossol, sofrendo constantes rearranjos que podem produzir movimentos celulares (ALBERTS *et al.*, 2002; LODISH *et al.*, 2000).

Os elementos do citoesqueleto interagem com as forças mecânicas externas exercidas sobre a superfície das células, absorvendo parte dos impactos e transformando sua estrutura molecular, acionando vias de sinalização intracelulares que promovem a adaptação das células aos agentes externos. Conforme a duração, natureza e intensidade desses agentes externos, as células podem sofrer alterações de maior ou menor intensidade, transformando algumas de suas características a fim de aumentar sua resistência e manter sua estabilidade frente às agressões. Ainda não são conhecidos todos os mecanismos dessa complexa rede de sinalizações intra, extra e intercelulares que afetam a organização do citoesqueleto, as funções metabólicas e a multiplicação celular (STIEPCICH, M. M. A., 2007).

As citoqueratinas (CK) são proteínas dos filamentos intermediários codificados por genes *KRT* que estão agrupadas em regiões do braço do cromossomo 12q (*KRT* 1-8) e 17q (*KRT* 9-25) (BIRNBAUM *et al.*, 2004).

Estas proteínas podem ser distinguidas de duas formas, pela massa molecular em baixo peso e alto peso, e pelo ponto de vista isoelétrico, dividido pelo tipo I ácido (CK 10-20) e tipo II básico (CK1-9) (BIRNBAUM *et al.*, 2004).

As ceratinas ácidas (tipo I) e básicas (tipo II) são tipicamente expressas nas células epiteliais e constituem a classe mais ampla e variada de FI, com numerosas

isoformas divididas em dois grupos. Cerca de 10 ceratinas são específicas dos epitélios mais resistentes, tais como unhas, cabelos e pêlos. Outras 20 ceratinas, chamadas de citoceratinas (CKs), são geralmente encontradas nos epitélios que revestem as cavidades internas do organismo. Seus pesos moleculares variam de 40 a 68 kD. Doze delas formam a classe de CK ácidas e oito moléculas compõem a classe das CKs básicas. Essas duas classes de CKs são constituídas por um grupo complexo de polipeptídios que formam heterodímeros, agrupados em filamentos heteropoliméricos de ceratina, onde a CK básica tem maior peso molecular (MOLL, 1992).

As rápidas alterações na expressão das ceratinas nos processos de cicatrização e metástases, que repetem parcialmente os mecanismos do desenvolvimento epitelial embrionário e fetal, evidenciam a necessidade de estudos sobre o papel crucial que desempenham nas vias de controle e regulação celular. Se considerarmos que a forma e as diferentes propriedades das células e tecidos são resultado de uma rede de interações protéicas, é provável que as ceratinas, capazes de se auto-organizar e de interagir com outras proteínas, sejam parte primordial das vias de sinalização intra e extracelulares (ALBERTS *et al.*, 2002).

As CK são empregadas como marcadores específicos para diferenciar os tipos de células epiteliais. O perfil de expressão de citoqueratinas e outros filamentos intermediários tem aplicação prática diária na diferenciação de tumores metastáticos de origem desconhecida e atualmente estão sendo utilizadas com grande interesse para marcar as células da glândula mamária (BOCKER *et al.*, 2002; BIRNBAUM *et al.*, 2004). Sabe-se que os anticorpos para citoqueratinas do tipo II (CK5 e 6) e do tipo I (CK14) coram as células basais e/ou mioepiteliais, ao passo que os anticorpos para citoqueratinas do tipo II (CK7 e 8) e do tipo I (CK 18 e 19) se associam com as células epiteliais luminiais/glandulares (BOCKER *et al.*, 2002).

Os padrões de expressão das CK são conservados durante a oncogênese, desta forma, carcinomas de mama podem ser classificados de acordo com a expressão das suas citoqueratinas (BIRNBAUM *et al.*, 2004). Assim, os carcinomas geralmente expressam o padrão de CKs que, ao menos parcialmente, representa as células de origem; entretanto, alguns tumores apresentam expressão anômala de CKs. Nos carcinomas de mama as CKs expressas são geralmente aquelas do epitélio luminal, mas a expressão de CK de padrão mioepitelial (ou basal) indica dediferenciação tumoral, correlacionando-se com comportamento biológico mais

agressivo (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; VAN DE RIJN *et al.*, 2002; NIELSEN *et al.*, 2004; ABD EL-REHIM *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006).

Atualmente, muitos trabalhos na literatura têm dedicado atenção à expressão dos marcadores epiteliais e sua correlação com fatores prognósticos bem estabelecidos. Foram demonstradas grandes superposições dos padrões de expressão gênica em linhagens de células de câncer de mama e no parênquima mamário normal (SORLIE *et al.*, 2001; NIELSEN *et al.*, 2004; ABD EL-REHIM *et al.*, 2005; FAN *et al.*, 2006).

Entretanto, ainda é necessária uma maior compreensão dos mecanismos através dos quais as diferenças na expressão gênica atuam nas vias de sinalização molecular, levando a padrões diversos de expressão de citoqueratinas nos tecidos mamários normal e neoplásico.

Dessa forma, a análise do perfil de expressão das citoqueratinas CK5/6 e CK14 constitui-se numa interessante proposta de ferramenta adicional para auxiliar na identificação dos casos de carcinomas que apresentam comportamentos biológicos diferentes, dentro dos grandes grupos de carcinomas já reconhecidos, os RH positivos e os triplo negativos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Trata-se de um estudo observacional, analítico e transversal da avaliação da prevalência da expressão de fenótipo basal por imunohistoquímica nos casos de carcinomas ductais mamários Luminais A (LA) e Triplo Negativos (TN) e sua relação com a idade, grau histológico e envolvimento linfonodal.

3.2 DESENHO DO ESTUDO, SELEÇÃO E TAMANHO DA AMOSTRA

Os casos deste estudo são provenientes da Unidade de Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças (UM-HNSG), em Curitiba, reconhecida pelo SenoNetwork, entidade ligada à Sociedade Européia de Oncologia e Sociedade Européia de Mastologia, por estar de acordo com o *“European Guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis”*. Iniciou-se o estudo consultando o banco de prontuários da UM-HNSG onde foram selecionadas as pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasor (SOE) submetidas à mastectomia ou cirurgia conservadora de mama, sem tratamento quimioterápico neoadjuvante, constando os dados completos de idade, grau histológico, estado linfonodal e exames anátomo-patológicos e imuno-histoquímicos para receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e superexpressão de HER2 do período de janeiro de 1996 a dezembro de 2007. A partir desta lista, foram recuperados dos arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do HNSG, os respectivos blocos de parafina disponíveis que pudessem ser utilizados sem que todo o material parafinado se esgotasse, dando preferência aos exames mais recentes e aos casos triplo negativos, que eram o escopo deste estudo. Em parceria com o laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUC-PR), construiu-se um banco de tecidos pela técnica de Microarranjos de Tecido Artesanal (TMA) a partir desses blocos doadores. A descrição da técnica de montagem dos TMA encontra-se no apêndice 1 e os mapas de cada TMA numerados em algarismos romanos de I a X e com as coordenadas de localização de cada caso encontram-se no apêndice 2.

As 150 amostras contidas nos 10 TMA foram submetidas à imunoistoquímica para os marcadores EGFR, CK5/6 e CK 14. Para a contagem dos casos de acordo com o perfil imunoistoquímico, foram desconsiderados os controles de mama normal, as amostras em duplicata e os casos em que o corte descolou da lâmina em mais de uma reação, resultando um total de 115 casos. Estes 115 casos foram então classificados de acordo com o perfil imunoistoquímico previamente realizado pelo Serviço de Anatomia Patológica do HNSG, resultando em: 42 casos (36,5%) triplo negativos (RE-, RP-, HER2-), 40 casos (34,7%) Luminal A (RE+ e/ou RP+ e HER2-), 24 casos (20,8%) Luminal B (RE+ e/ou RP+ e HER2 +) e 9 casos (7,8%) subtipo superexpressão HER2 (RE-, RP-,HER2+). A distribuição final das 150 amostras dos TMA realizados encontram-se resumidos no quadro 4 para melhor visualização.

QUADRO 4 - DISTRIBUIÇÃO FINAL DAS 150 AMOSTRAS DOS 10 TMA.

TOTAL	CD	CM	AD	L A	L B	HER	TN
150	9	5	21	40	24	9	42

- CD: Cortes que descolaram da lâmina em mais de uma reação imunoistoquímica
- CM: Amostras controle de mama normal
- AD: Amostras em duplicatas
- LA: Casos Luminais A
- LB: Casos Luminais B
- HER: Casos de superexpressão do HER-2
- TN: Casos triplo negativos

Os 82 casos de carcinomas ductais invasores (SOE) subdivididos em 40 Luminais A e 42 Triplo Negativos correspondem ao nosso material do tamanho amostral final para este estudo.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO

Critérios de inclusão:

- Carcinomas ductais invasores (SOE) Luminais A e Triplo Negativos

Critérios de exclusão:

- Carcinomas ductais invasores (SOE) Luminais B e do subtipo superexpressão de HER2.

3.4 VARIÁVEIS E CONCEITOS

1) Luminal A:

Carcinomas ductais com expressão de RE e/ou RP+, e ausência de superexpressão de HER2.

2) Triplo Negativo:

Carcinomas ductais com ausência de expressão de RE e de RP e ausência de superexpressão de HER2.

3) Marcadores de fenótipo basalóide:

Os marcadores EGFR, CK5/6 e CK14 foram classificados, de acordo com a ausência ou presença de expressão imunoistoquímica, em negativo ou positivo, respectivamente.

4) Luminais A basais:

Casos de carcinomas ductais Luminais A que expressaram fenótipo basal pela positividade de um ou mais dos marcadores estudados (CK 5/6 e/ou CK 14 e/ou EGFR).

5) Triplo Negativo basal / Carcinoma Basalóide:

Casos de carcinomas ductais triplo negativos que expressaram fenótipo basal pela positividade de um ou mais dos marcadores estudados (CK 5/6 e/ou CK 14 e/ou EGFR).

6) Idade:

A idade das pacientes foi classificada em 2 grupos: até 50 anos e mais de 50 anos.

7) Grau histológico:

Os casos foram classificados em grau I ou II ou III segundo o Sistema de Gradação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis, 1991 (Nottingham modificado) conforme recomendado e descrito no Manual de Padronização de Laudos da SBP (2005).

8) Envolvimento Linfonodal:

Os casos foram classificados em: 1) negativo quando da ausência de metástase para linfonodos e 2) positivo quando da presença de metástases para 1 ou mais linfonodos.

3.5 MÉTODO IMUNOISTOQUÍMICO

Foram utilizados os resultados dos exames imunoistoquímicos para RE, RP e HER2 realizados na época do diagnóstico original, pelo método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase. A expressão imunoistoquímica para os marcadores moleculares RE e RP foi considerada positiva quando observada marcação nuclear de intensidade fraca, moderada ou forte em mais de 1% das células marcadas. Para a avaliação da marcação do HER2 levou-se em consideração a percentagem de células com marcação de membrana. A positividade do HER2 foi avaliada de acordo com o método recomendado pelo kit Herceptest (DAKO) em quatro categorias (0, +, ++, +++). Foi considerado positivo quando os resultados englobavam a categoria +++.

Para o estudo imunoistoquímico da expressão dos marcadores EGFR, CK5/6 e CK14, os casos foram processados de acordo com o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, com anticorpos comerciais conforme as especificações no quadro 5. A técnica foi realizada segundo o protocolo estabelecido e padronizado pelo setor de imunoistoquímica do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

QUADRO 5 – ANTICORPOS E PROTOCOLOS DE REAÇÃO UTILIZADOS.

Anticorpo	Marca	Clone	Diluição	Solução recuperante	Método recuperação	Sistema amplificação
EGFR	DAKO	H11	1/40	CITRATO pH 6,0	banho maria	ENVISION
CK5/6	DAKO	D5/16B4	1/50	EDTA/TRIS pH 9,0	banho maria	ENVISION
CK14	Biogenex	LL002	1/100	CITRATO pH 6,0	banho maria	ENVISION

As lâminas foram analisadas por dois patologistas simultaneamente (APMS e LN), em microscópio de multiobservação (Olimpus). A avaliação das reações imunoistoquímicas destes marcadores (EGFR, CK5/6 e CK14) foi feita de forma semiquantitativa, considerando-se neste trabalho o número e distribuição de células marcadas classificadas em focal (1 a 10% de células tumorais positivas) ou difuso (acima de 10% de células tumorais positivas) e de acordo com o padrão de expressão esperado para estes anticorpos (citoplasmático e/ou de membrana).

3.6 CONSTRUÇÃO DO BANCO DE DADOS

Foi construído um banco de dados que não continha o nome das pacientes e que foram numerados em ordem seqüencial de acordo com a inclusão no TMA. Todos os dados que foram progressivamente sendo obtidos pela pesquisadora (lista das pacientes com respectivas idades, grau histológico, estado linfonodal, número dos blocos doadores, resultados imunoistoquímicos para RE, RP, HER2, CK5/6, CK14 e EGFR) foram transcritos manualmente. A digitação do banco foi realizada com conferência bimanual, na ordem em que foram incluídos, em planilha eletrônica (Microsoft Excel®), conferidos e exportados para posterior análise estatística (apêndice 3).

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Os resultados obtidos no estudo foram expressos por médias e desvios padrões (variáveis quantitativas) ou por frequências e percentuais (variáveis qualitativas). Para o cálculo amostral, considerou-se os 42 casos TN com percentual mínimo de 7% da carcinomas basalóides, resultando uma amostra mínima de 30 casos TN, com nível de segurança de 95%. Para a comparação de grupos em relação a variáveis quantitativas considerou-se o teste t de Student para amostras independentes. Para a comparação de grupos em relação a variáveis qualitativas politômicas considerou-se o teste de Qui-quadrado. Já para a comparação de dois grupos em relação a variáveis qualitativas dicotômicas foi considerado o teste exato de Fisher ou o teste binomial. Para avaliação da qualidade de cada uma das proteínas para a classificação de fenótipo basal, foi estimada a sensibilidade da proteína e construído intervalo de 95% de confiança. Valores de $p < 0,05$ indicaram significância estatística. Valores de p entre 0,05 e 0,10 indicam que existe tendência. Os dados foram organizados em planilha Excel e analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

O projeto do trabalho utilizando blocos de parafina foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (anexo).

4 RESULTADOS

4.1 RESULTADOS QUALITATIVOS

A revisão histológica confirmou o diagnóstico de carcinoma ductal invasor em todas as amostras, seguindo as normas da Classificação Internacional dos Tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS) (TAVASSOLI; DEVILLEE, 2003).

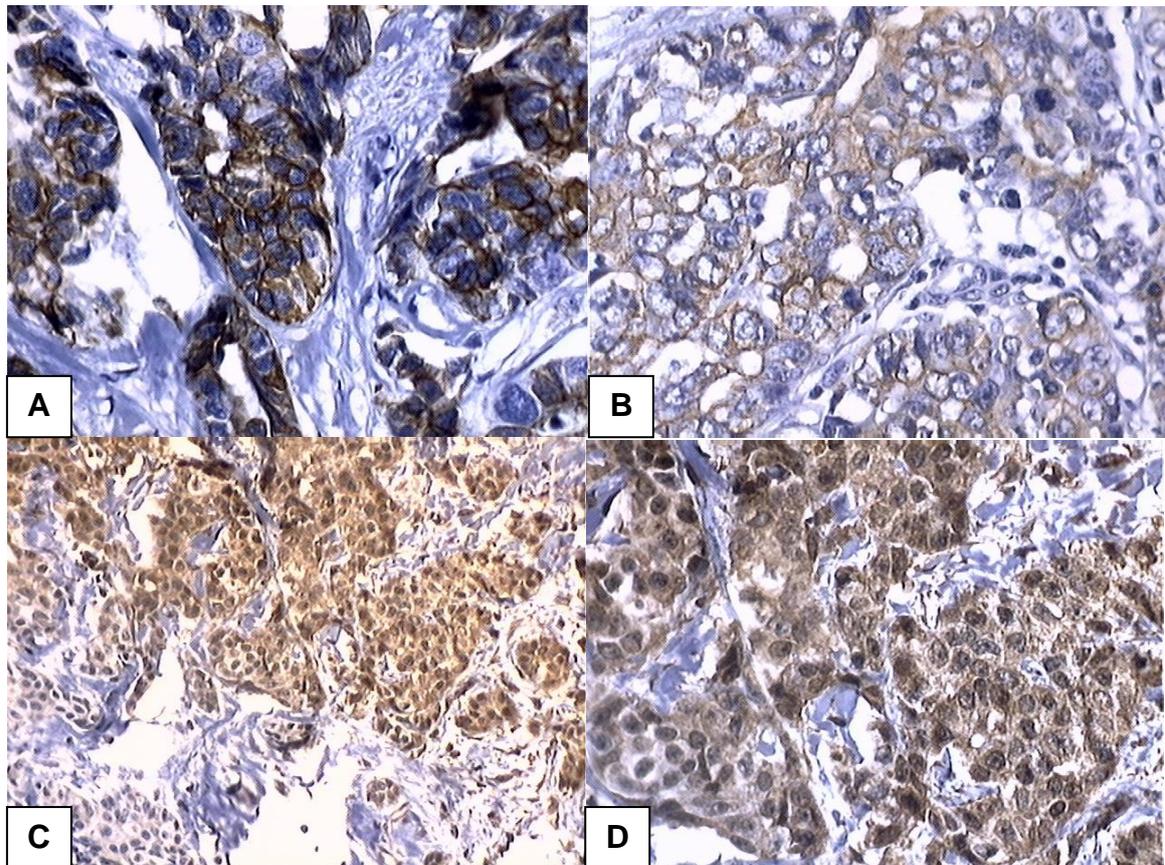


FIGURA 1- PADRÕES DE EXPRESSÃO DA CK14 NO CARCINOMA DUCTAL INVASOR

- A- TMA IV/2C Coloração positiva difusa de membrana para CK14 em carcinoma ductal invasor grau III -40x
- B- TMA X/3E Coloração positiva difusa de membrana para CK14 em carcinoma ductal invasor grau II -40x
- C- TMA VI/1A Coloração difusa de citoplasma para CK14 em carcinoma ductal invasor grau II – 20x
- D- TMA II/3D Coloração difusa de citoplasma e membrana para CK14 em carcinoma ductal invasor grau II -40x

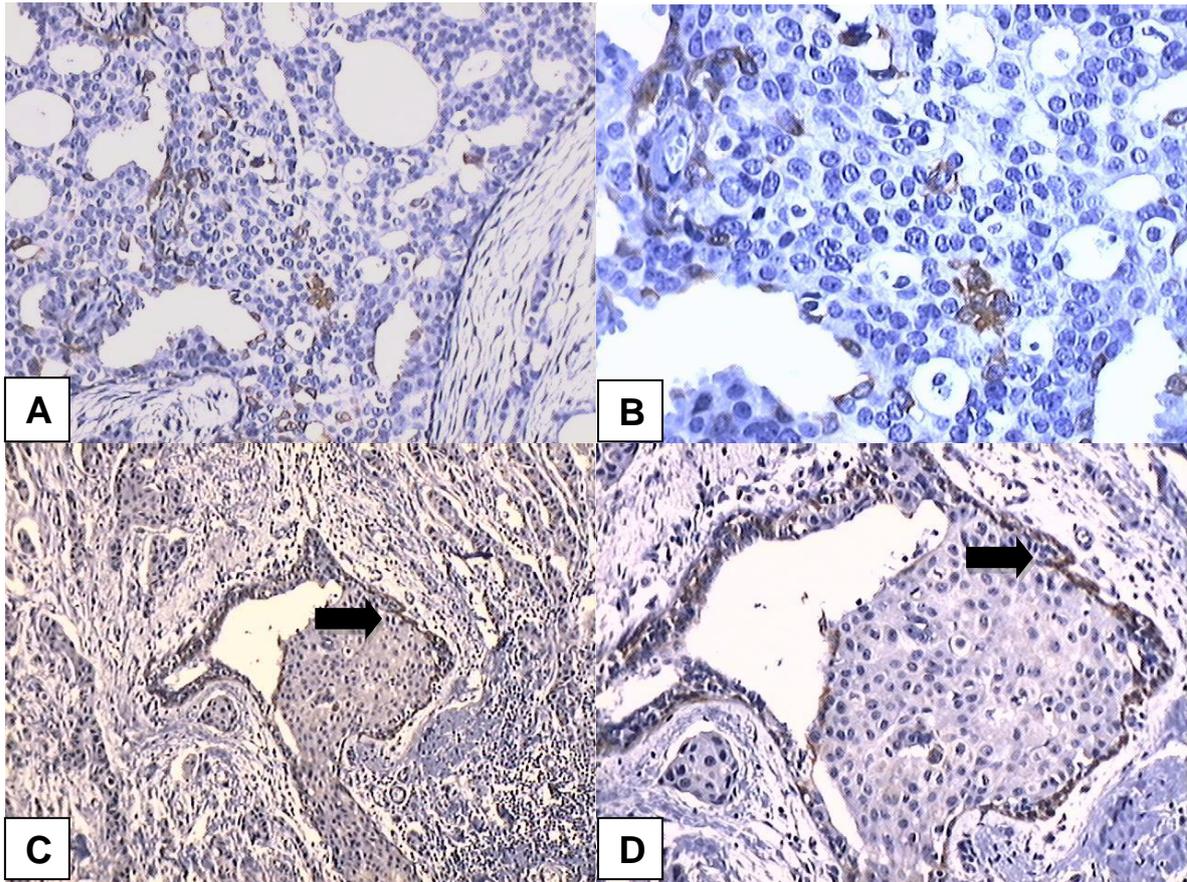


FIGURA 2 - PADRÕES DE EXPRESSÃO DA CK14 NO CARCINOMA DUCTAL IN SITU E NO MIOEPITÉLIO NORMAL

- A- TMA IV/3E Coloração positiva focal de citoplasma e membrana para CK14 no componente in situ. O componente invasor foi negativo -20X
- B- TMA IV/3E Coloração positiva focal de citoplasma e de membrana para CK14 no componente in situ. O componente invasor foi negativo -40X
- C- TMA VI/3C Coloração positiva de citoplasma e membrana para CK14 nas células mioepiteliais normais (seta) em área de hiperplasia ductal atípica. O componente invasor foi negativo -10X
- D- TMA VI/3C Coloração positiva de citoplasma e membrana para CK14 nas células mioepiteliais normais (seta) em área de hiperplasia ductal atípica. O componente invasor foi negativo -20X

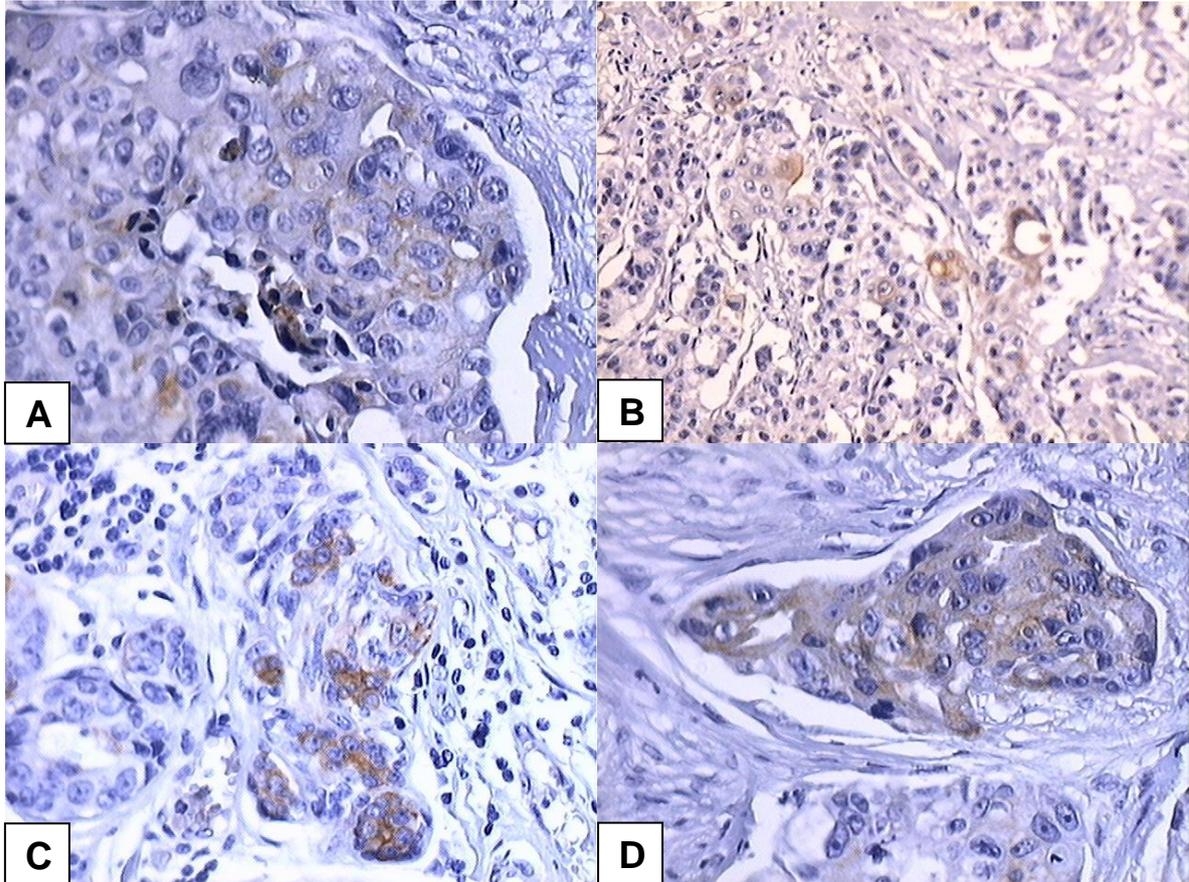


FIGURA 3 - PADRÕES DE EXPRESSÃO DA CK5/6 NO CARCINOMA DUCTAL INVASOR

A- TMA II/3D Coloração focal de citoplasma para CK5/6 em carcinoma ductal invasor grau II - 40x

B- TMA X/3A Coloração focal de citoplasma para CK5/6 em carcinoma ductal invasor grau II-10x

C- TMA II/3B Coloração focal de membrana para CK5/6 em carcinoma ductal invasor grau I-20x

D- TMA IV/2C Coloração focal de citoplasma para CK5/6 em carcinoma ductal invasor grau III - 40x

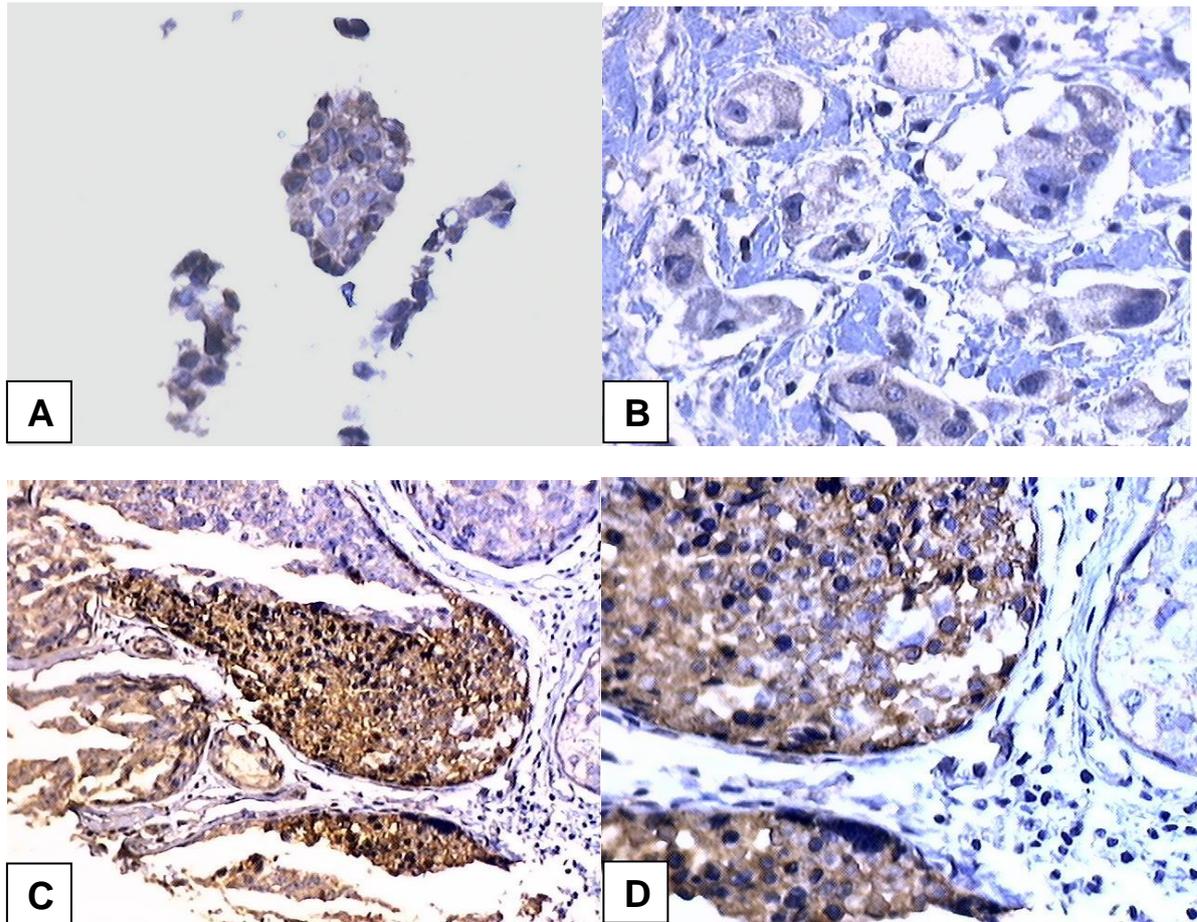


FIGURA 4 - PADRÕES DE EXPRESSÃO DO EGFR NO CARCINOMA DUCTAL INVASOR

- A- TMA I/1E Coloração focal de citoplasma para EGFR em carcinoma ductal invasor grau I-40x
- B- TMA IV/3A Coloração focal de citoplasma para EGFR em carcinoma ductal invasor grau II - 40x
- C- TMA V/3E Coloração difusa de citoplasma para EGFR em carcinoma ductal invasor grau III- 40x
- D- TMA VI/3E Coloração difusa de citoplasma e membrana para EGFR em carcinoma ductal invasor grau III-40x

4.2 RESULTADOS QUANTITATIVOS

Constituíram a amostra deste estudo 82 pacientes brancas do sexo feminino com média de idade de $54,6 \pm 14,2$ anos, distribuídas em dois grupos de estudo de acordo com o subtipo de carcinoma ductal mamário: 40 (48,8%) com fenótipo Luminal A (LA) e 42 (51,2%) com fenótipo Triplo Negativo (TN), com média de idade de $58,0 \pm 15,3$ anos e $51,4 \pm 12,3$ anos em cada grupo, respectivamente ($p=0,032$).

No total da amostra, houve predomínio de carcinomas ductais invasores grau II (45,1%) e de casos com envolvimento linfonodal negativo (52,4%).

4.2.1 Comparação entre LA e TN em relação à idade, grau histológico e linfonodos

Para cada uma das variáveis idade, grau histológico e envolvimento linfonodal, testou-se a hipótese nula de que a distribuição sobre as classificações da variável para o grupo LA é igual à distribuição sobre as classificações da variável para o grupo TN, *versus* a hipótese alternativa de distribuições diferentes.

Para a idade (quantitativa), testou-se a hipótese nula de que a média de idade para o grupo é LA igual à média de idade para o grupo TN, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes (TABELA 1).

A associação entre idade e os subtipos LA e TN mostrou que a média de idade foi menor nos TN ($p=0,032$). A comparação do grau histológico entre os subtipos LA e TN mostrou que o grau histológico I foi mais freqüente no subtipo LA e que o grau histológico III foi mais freqüente no subtipo TN ($p < 0,001$). A associação entre o envolvimento linfonodal e os subtipos de carcinoma de mama não evidenciou diferença estatisticamente significativa.

TABELA 1- COMPARAÇÃO ENTRE LA E TN EM RELAÇÃO A IDADE, GRAU HISTOLÓGICO E LINFONODOS

Variável	Classificação	LA n (%)	TN n (%)	Valor de p
Idade	Até 50	15 (37,5)	18 (42,9)	0,658 ^c
	Mais de 50	25 (62,5)	24 (57,1)	
Idade	Média ± dp	58,0 ± 15,3	51,4 ± 12,3	0,032 ^b
Grau histológico	I	9 (22,5)	1 (2,4)	<0,001 ^a
	II	22 (55,0)	15 (35,7)	
	III	9 (22,5)	26 (61,9)	
Linfonodos	Negativo	23 (57,5)	20 (47,6)	0,387 ^c
	Positivo	17 (42,5)	22 (52,4)	

^a Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$

^b Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

^c Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

4.2.2 Expressão dos marcadores EGFR, CK5/6 e CK14 nos grupos LA e TN

Para cada um dos marcadores, testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de resultado positivo no carcinoma LA é igual à probabilidade de resultado positivo no carcinoma TN, *versus* a hipótese alternativa de probabilidades diferentes (TABELA 2).

A frequência da expressão dos marcadores de células basais detectados por imunohistoquímica nos subtipos de carcinoma LA e TN mostrou que há uma tendência das citoqueratinas CK5/6 e CK14 apresentarem maior frequência positiva nos casos TN, com nível de significância limítrofe ($p = 0,06$ e $p = 0,05$, respectivamente). O marcador EGFR mostrou maior frequência positiva em casos LA, sem significância estatística.

TABELA 2 - FREQUENCIA DA EXPRESSÃO DOS MARCADORES EGFR, CK5/6 E CK14 NOS GRUPOS TN E LA

Variável	Classificação	LA n (%)	TN n (%)	Valor de p
EGFR	Negativo	36 (90,0)	40 (95,2)	0,427
	Positivo	4 (10,0)	2 (4,8)	
CK5/6	Negativo	35 (87,5)	29 (69,0)	0,062
	Positivo	5 (12,5)	13 (31,0)	
CK14	Negativo	33 (82,5)	26 (61,9)	0,05004
	Positivo	7 (17,5)	16 (38,1)	

Testou-se a hipótese nula de que a probabilidade de fenótipo basal no carcinoma TN é igual à probabilidade de fenótipo basal no carcinoma LA, *versus* a hipótese alternativa de probabilidades diferentes (TABELA 3).

Observou-se que tanto carcinomas ductais LA quanto TN podem apresentar fenótipo basal, expressando EGFR e/ou CK5/6 e/ou CK14, sendo que a maior concentração deste fenótipo foi encontrada dentro do subtipo TN, mas sem significância estatística.

Os 18 casos de carcinomas ductais invasores TN com fenótipo basal pela expressão de EGFR e/ou CK5/6 e/ou CK14, correspondem aos verdadeiros casos de Carcinoma Basalóide deste estudo.

TABELA 3- FREQUÊNCIA DE FENÓTIPO BASAL NOS GRUPOS LA E TN QUANTO A EXPRESSÃO DOS MARCADORES EGFR E/OU CK5/6 E/OU CK14

Fenótipo	LA n (%)	TN n (%)	Valor de p
Não basal	28 (70,0)	24 (57,1)	0,258
Basal	12 (30,0)	18 (42,9)	
Total	40	42	

Os três marcadores de fenótipo basal utilizados neste estudo ora se expressaram isoladamente, ora em combinação com outro marcador. Não ocorreu nenhum caso com a expressão simultânea dos 3 marcadores. A associação mais frequente ocorreu entre as citoqueratinas CK5/6 e CK14, responsável por 11 dos 18 diagnósticos de TN basais/Carcinoma Basalóide (TABELA 4).

TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO DOS RESULTADOS POSITIVOS E NEGATIVOS DOS MARCADORES BASAIS EM RELAÇÃO AOS CARCINOMAS LA BASAIS E TN BASAIS

EGFR	CK5/6	CK14	LA basais	TN basais
			n	n
+	+	+	0	0
+	+	-	0	0
+	-	+	0	2
-	+	+	4	11
+	-	-	4	0
-	+	-	1	2
-	-	+	3	3
Total			12	18

Foi avaliado o desempenho da expressão isolada dos marcadores EGFR, CK5/6 e CK14 na determinação do fenótipo basal entre os TN, ou seja, na identificação de casos de Carcinoma Basalóide. Nesta avaliação foi considerada como padrão ouro a classificação de fenótipo basal caracterizada por ter pelo menos um dos marcadores positivo (EGFR e/ou CK5/6 e/ou CK14). Desta forma, na análise de cada marcador considerou-se a positividade deste marcador (para qualquer resultado das outras duas) *versus* o resultado do padrão ouro.

Ao todo, nos carcinomas do subtipo TN, de acordo com o padrão ouro, foram observados 18 casos de Carcinoma Basalóide. Considerando a proteína CK14, observamos que em 16 casos houve expressão deste marcador (independentemente da expressão observada nos outros dois marcadores, se

positivos ou negativos). Desta forma, para este marcador, estima-se que 88,9% dos casos de Carcinomas Basais de acordo com o padrão ouro, apresentarão resultado positivo para este marcador. Há 95% de confiança de que o intervalo de 74,4% a 100% contenha a verdadeira proporção de casos classificados como positivos por este marcador quando o carcinoma é um Carcinoma Basalóide (TABELA 5).

TABELA 5 - AVALIAÇÃO DA SENSIBILIDADE DOS MARCADORES, ISOLADAMENTE, NA DETERMINAÇÃO DE FENÓTIPO BASAL NOS CARCINOMAS TN

Expressão do marcador	EGFR	CK5/6	CK14
Negativo	16	5	2
Positivo	2	13	16
Total	18	18	18
Sensibilidade	11,1%	72,2%	88,9%
IC 95%	0% - 25,6%	51,5% - 92,9%	74,4% - 100%

4.2.3 Estudo dos carcinomas LA e TN quanto à expressão de fenótipo basal em relação à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal

Para cada uma das variáveis idade, grau histológico e presença de linfonodos, testou-se a hipótese nula de que a distribuição sobre as classificações da variável para carcinomas LA com fenótipo basal é igual à distribuição sobre as classificações da variável para carcinomas LA com fenótipo não basal, versus a hipótese alternativa de distribuições diferentes. Para a idade (quantitativa), testou-se a hipótese nula de que a média de idade para os casos de carcinomas LA com fenótipo basal é igual à média de idade para os casos de fenótipo não basal, versus a hipótese alternativa de médias diferentes (TABELA 6).

Observamos que a média de idade nos LA basais foi menor do que nos LA não basais (sem significância estatística) e que houve tendência das pacientes acima de 50 anos não expressarem fenótipo basal.

Em relação ao grau histológico, ambos os subtipos do carcinoma LA mostraram predomínio de casos grau II, não havendo associação entre expressão de fenótipo basal em carcinomas LA e o grau histológico.

Não houve associação entre o envolvimento linfonodal e a expressão de fenótipo basal em casos LA. Já os não basais apresentaram mais casos linfonodos negativos, com frequência de 60,7%, sem diferença estatística significativa.

TABELA 6 - COMPARAÇÃO ENTRE LA NÃO BASAL E BASAL EM RELAÇÃO À IDADE, GRAU HISTOLÓGICO E LINFONODOS

Variável	Classificação	LA-Não basal n (%)	LA-basal n (%)	Valor de p
Idade	Até 50	8(28,6)	7 (58,3)	0,091 ^c
	Mais de 50	20 (71,4)	5(41,7)	
Idade	Média ± dp	60,6 ± 15,0	52,0 ± 14,9	0,103 ^b
Grau histológico	I	5 (17,9)	4 (33,3)	0,473 ^a
	II	17 (60,7)	5 (41,7)	
	III	6 (21,4)	3 (25,0)	
Linfonodos	Negativo	17 (60,7)	6 (50,0)	0,728 ^c
	Positivo	11 (39,3)	6 (50,0)	

^a Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$

^b Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

^c Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

Para cada uma das variáveis idade, grau histológico e presença de linfonodos, testou-se a hipótese nula de que a distribuição sobre as classificações da variável para o TN fenótipo basal é igual à distribuição sobre as classificações da variável para o fenótipo não basal, *versus* a hipótese alternativa de distribuições diferentes. Para a idade (quantitativa), testou-se a hipótese nula de que a média de idade para os casos de fenótipo basal é igual à média de idade para os casos de fenótipo não basal, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes (TABELA 7).

Observou-se que a média de idade nos TN basais foi menor do que nos TN não basais (sem significância estatística) e que a frequência de distribuição das idades entre estes dois grupos foi muito semelhante.

Em relação ao grau histológico, entre os casos TN basais predominou o grau III enquanto que nos TN não basais a distribuição dos casos entre os graus II e III foi mais homogênea. Observa-se que, proporcionalmente, houve mais casos grau III no TN basal (72,2%) do que no TN não basal (54,2%), mas sem diferença estatística significativa.

A associação entre o envolvimento linfonodal e o subtipo do carcinoma TN evidenciou que os casos sem fenótipo basal apresentaram maior número de casos com pelo menos um linfonodo comprometido com frequência de 58,3%, mas sem significância estatística.

TABELA 7- COMPARAÇÃO ENTRE TN NÃO BASAL E BASAL EM RELAÇÃO À IDADE, GRAU HISTOLÓGICO E LINFONODOS

Variável	Classificação	TN-Não basal n(%)	TN-basal n(%)	Valor de p
Idade	Até 50	10 (41,7)	8 (44,4)	1 ^c
	Mais de 50	14 (58,3)	10(55,6)	
Idade	Média ± dp	53,0 ± 13,0	49,2 ± 11,3	0,325 ^b
Grau histológico	I	1 (4,2)	0 (0)	---
	II	10 (41,7)	5 (27,8)	
	III	13 (54,2)	13 (72,2)	
Linfonodos	Negativo	10 (41,7)	10 (55,6)	0,533 ^c
	Positivo	14 (58,3)	8 (44,4)	

^a Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$

^b Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

^c Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

Para cada uma das variáveis idade, grau histológico e presença de linfonodos, testou-se a hipótese nula de que a distribuição sobre as classificações da variável para o carcinoma TN com fenótipo basal é igual à distribuição sobre as classificações da variável para o carcinoma LA com fenótipo basal, versus a hipótese alternativa de distribuições diferentes. Para a idade (quantitativa), testou-se a hipótese nula de que a média de idade para os casos de carcinoma TN com

fenótipo basal é igual à média de idade para os casos de carcinoma LA com fenótipo basal, *versus* a hipótese alternativa de médias diferentes (TABELA 8).

Observamos que a média de idade nos TN basais foi menor do que nos LA basais (sem significância estatística) e que a distribuição dos casos por faixa etária foi muito semelhante nos dois grupos.

Quando comparamos a expressão de fenótipo basal entre os grupos LA e TN em relação ao grau histológico, observamos que há um predomínio significativo de casos grau III nos TN basais, o que não ocorre entre os LA basais.

Em relação ao envolvimento linfonodal, distribuição de casos positivos e negativos foi semelhante nos dois grupos.

TABELA 8- COMPARAÇÃO ENTRE OS CARCINOMAS LA E TN QUANDO AMBOS EXPRESSAM FENÓTIPO BASAL, EM RELAÇÃO A IDADE, GRAU HISTOLÓGICO E LINFONODOS

Variável	Classificação	LA basal n (%)	TN basal n (%)	Valor de p
Idade	Até 50	7(58,3)	8 (44,4)	0,710 ^c
	Mais de 50	5 (41,7)	10(55,6)	
Idade	Média ± dp	52,0 ± 14,9	49,2 ± 11,3	0,559 ^b
Grau histológico	I	4 (33,3)	0 (0)	0,009 ^a
	II	5 (41,7)	5 (27,8)	
	III	3 (25,0)	13 (72,2)	
Linfonodos	Negativo	6 (50,0)	10 (55,6)	1 ^c
	Positivo	6 (50,0)	8 (44,4)	

^a Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$

^b Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

^c Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

Para cada uma das variáveis idade, grau histológico e presença de linfonodos, testou-se a hipótese nula de que a distribuição sobre as classificações da variável para o carcinoma TN não basal é igual à distribuição sobre as classificações da variável para o carcinoma LA não basal, *versus* a hipótese alternativa de distribuições diferentes. Para a idade (quantitativa), testou-se a hipótese nula de que

a média de idade para os casos de carcinoma TN não basal é igual à média de idade para os casos de carcinoma LA não basal, versus a hipótese alternativa de médias diferentes (TABELA 9).

Observamos que a média de idade nos TN não basais foi menor do que nos LA não basais ($p=0,058$), com mais casos abaixo de 50 anos no grupo TN não basal.

Quando comparamos a ausência de expressão de fenótipo basal entre os grupos LA e TN em relação ao grau histológico, observamos que há um predomínio significativo de casos grau III nos TN não basais, e de grau I e II nos LA não basais.

Em relação ao envolvimento linfonodal, há mais casos com comprometimento de linfonodos nos TN não basais do que nos LA não basais, sem diferença estatística significativa.

TABELA 9 - COMPARAÇÃO ENTRE OS CARCINOMAS LA E TN QUANDO AMBOS NÃO EXPRESSAM FENÓTIPO BASAL, EM RELAÇÃO A IDADE, GRAU HISTOLÓGICO E LINFONODOS

Variável	Classificação	LA não basal n (%)	TN não basal n (%)	Valor de p
Idade	Até 50	8 (28,6)	10 (41,7)	0,388 ^c
	Mais de 50	20 (71,4)	14 (58,3)	
Idade	Média ± dp	60,6 ± 15,0	53,0 ± 13,0	0,058 ^b
Grau histológico	I	5 (17,9)	1 (4,2)	0,033 ^a
	II	17 (60,7)	10 (41,7)	
	III	6 (21,4)	13 (54,2)	
Linfonodos	Negativo	17 (60,7)	10 (41,7)	0,266 ^c
	Positivo	11 (39,3)	14 (58,3)	

^a Teste de Qui-quadrado, $p<0,05$

^b Teste t de Student para amostras independentes, $p<0,05$

^c Teste exato de Fisher, $p<0,05$

A associação entre idade e os subtipos LA e Carcinoma basalóide mostrou que a média de idade foi menor nas Carcinomas Basalóides ($p=0,032$).

Na comparação do grau histológico, os LA tiveram predomínio de casos grau I e II enquanto os carcinomas basalóides tiveram predomínio de casos grau III ($p=0,001$).

A associação entre o envolvimento linfonodal e os subtipos de carcinoma de mama não evidenciou diferença estatisticamente significativa (TABELA 10).

TABELA 10- COMPARAÇÃO ENTRE OS CARCINOMAS LUMINAIS A E CARCINOMAS BASALÓIDES EM RELAÇÃO A IDADE, GRAU HISTOLÓGICO E LINFONODOS

Variável	Classificação	LA n=40 n (%)	TN basal n=18 n (%)	Valor de p
Idade	Até 50	15(37,5)	8 (44,4)	0,773 ^c
	Mais de 50	25 (62,5)	10 (55,6)	
Idade	Média ± dp	58,0 ± 15,3	49,2 ± 11,3	0,032 ^b
Grau histológico	I	9 (22,5)	0 (0)	0,001 ^a
	II	22 (55,0)	5 (27,8)	
	III	9 (22,5)	13 (72,2)	
Linfonodos	Negativo	23 (57,5)	10 (55,6)	1 ^c
	Positivo	17 (42,5)	8 (44,4)	

^a Teste de Qui-quadrado, $p<0,05$

^b Teste t de Student para amostras independentes, $p<0,05$

^c Teste exato de Fisher, $p<0,05$

Observamos que a média de idade nos carcinomas com fenótipo basal, independente de serem LA ou TN, foi menor do que nos não basais ($p=0,036$).

A associação entre a expressão de fenótipo basal em carcinomas ductais LA e/ou TN com o grau histológico e envolvimento linfonodal não evidenciou diferença estatisticamente significativa (TABELA 11).

TABELA 11- COMPARAÇÃO ENTRE OS CARCINOMAS QUE NÃO EXPRESSARAM FENÓTIPO BASAL (LA + TN) E OS QUE EXPRESSARAM (L A + TN) EM RELAÇÃO A IDADE, GRAU HISTOLÓGICO E LINFONODOS

Variável	Classificação	Não basal n=52	Basal n=30	Valor de p
Idade	Até 50	18 (34,6)	15 (50,0)	0,242 ^c
	Mais de 50	34 (65,4)	15 (50,0)	
Idade	Média ± dp	57,1 ± 14,5	50,3 ± 12,7	0,036 ^b
Grau histológico	I	6 (11,5)	4 (13,3)	0,251 ^a
	II	27 (51,9)	10 (33,3)	
	III	19 (36,5)	16 (53,3)	
Linfonodos	Negativo	27 (51,9)	16 (53,3)	1 ^c
	Positivo	25 (48,1)	14 (46,7)	

^a Teste de Qui-quadrado, $p < 0,05$

^b Teste t de Student para amostras independentes, $p < 0,05$

^c Teste exato de Fisher, $p < 0,05$

5 DISCUSSÃO

O desafio em estudar câncer de mama reside no fato de serem tumores muito heterogêneos e com características moleculares que variam de um caso para outro, dificultando o estabelecimento de uma classificação onde todos os casos se enquadrem dentro de uma determinada categoria. Por isso a abordagem de pacientes com carcinoma de mama deve ser tão individualizada quanto possível.

As análises de expressão gênica em tecido mamário por diferentes autores (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; VAN'T VEER *et al.*, 2002) permitiram a separação dos casos em 5 categorias de risco com diferentes perfis moleculares globais, sendo as duas mais relevantes designadas de grupos “*hormone-expressing*” (ou “luminal A”) e “basalóide”, com perfis de expressão e evolução clínica distintos, sendo o “basalóide” o grupo com pior prognóstico.

A validação desses achados em grandes séries de casos tem sido testada por diferentes grupos de pesquisa (VAN'T VEER *et al.*, 2002; SORLIE *et al.*, 2003; SORLIE *et al.*, 2006; RAKHA *et al.*, 2007; SORLIE, 2007). Entretanto, estes estudos incluem casos com diferentes tipos histológicos, não apenas ductais invasores, mas casos de carcinomas lobulares, carcinomas *in situ*, carcinomas mucinosos, carcinomas metaplásicos, entre outros. Só recentemente, os artigos têm questionado que, mesmo a classificação molecular, apresenta limitações e exceções na identificação de grupos de pacientes com riscos diferentes. Inclusive, no último simpósio da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) em San Francisco (2009), a oncologista Martine Piccart-Gebhart palestrante da sessão de abertura, fez referência a classificação molecular: “muito se pesquisa, mas há tanta controvérsia e tanto viés nos estudos que, do ponto de vista prático, pouca evolução ocorreu”.

Com o advento desses estudos genéticos, o papel do patologista não se restringe a classificar morfológicamente o tumor dentro dos 20 tipos descritos pela OMS (TAVASSOLI; DEVILEE, 2003). É necessário informar fatores prognósticos e preditivos que tenham relevância, para conseqüentemente orientar no melhor entendimento da biologia do tumor e no planejamento terapêutico.

Os fatores prognósticos são determinados pelas características clínicas das pacientes (como a idade ao diagnóstico) e pelos aspectos patológicos/biológicos dos tumores, que permitem prever a evolução clínica da doença ou a sobrevida da

paciente no momento do diagnóstico inicial. Por outro lado, os fatores preditivos são as características clínicas, patológicas e biológicas utilizadas para estimar a probabilidade de resposta do tumor a um tipo específico de terapia adjuvante.

Dentro deste intuito, procurou-se estudar dois grupos de carcinomas ductais invasores de relevância definida, os Luminais A (“*hormone-expressing*”) e os Triplo Negativos e a influência da expressão dos marcadores basais EGFR, CK5/6 e CK14 nestes carcinomas utilizando como parâmetros de comparação a idade, o grau histológico e o envolvimento linfonodal. Não utilizamos como parâmetro, neste momento, o tamanho tumoral, por ser considerado um fator de prognóstico tempo dependente (ELSTON; ELLIS; PINDER, 1999), que reflete apenas parcialmente as características intrínsecas da lesão.

O trabalho foi iniciado com a comparação dos LA e TN quanto à idade, grau histológico e envolvimento linfonodal, sem a interferência do fenótipo basalóide. Avaliou-se como os marcadores basais em estudo se distribuíam nestes dois grupos, definindo quatro novos subgrupos, LA com e sem fenótipo basal, TN com e sem fenótipo basal. Dessa forma, foram encontrados os casos de Carcinomas Basalóides da nossa amostra, que corresponderam ao TN com fenótipo basal. Estabelecemos qual dos marcadores era mais sensível para identificar este subgrupo. Posteriormente foram comparados os 4 subgrupos com a idade, o grau histológico e o envolvimento linfonodal, para sabermos qual a influência do fenótipo basalóide sobre estes parâmetros prognósticos já estabelecidos.

O ponto de corte para estratificação das idades das pacientes foi de 50 anos por ser próxima a idade média da menopausa relatada pela Organização Mundial de Saúde através de estudos que demonstraram que nos países industrializados a idade média da menopausa é de 51 anos (WHO, 1994). Estudos nacionais relatam médias de 51,2 (Pedro *et al.*, 2003) e de 48,6 anos (Aldrighi *et al.*, 2005). A literatura refere que o estado menstrual é importante fator prognóstico clínico: melhor prognóstico na pós-menopausa e inferior na pré-menopausa (BARROS; BUZAID, 2007).

5.1 AMOSTRA E MÉTODO

Foi objetivo do estudo a comparação entre os subtipos Luminais A e Triplo Negativos devido às divergências moleculares, clínicas, terapêuticas e prognósticas

descritas entre eles. Portanto, durante a seleção dos casos, procurou-se enfatizar a procura de triplo negativos, o que resultou numa amostra equilibrada entre os dois grupos do estudo, com 42 casos TN e 40 LA. Não foi objetivo deste estudo reclassificar casos consecutivos de carcinomas de mama dentro da proposta da classificação molecular. Por este motivo, a amostra de 115 casos do TMA não foi considerada como uma casuística da Unidade de Mama do HNSG, e sim, como amostras para testar marcadores para este estudo e posteriores.

A validação de todos os achados dos estudos biomoleculares pelas técnicas convencionais de imunistoquímica é trabalhosa, cara e demorada. Dado o seu alto grau artesanal e as dificuldades para manter sua realização em condições idênticas de temperatura, concentração de reagentes, mesmo com a automação de algumas das etapas envolvidas, há inúmeros resultados conflitantes nos relatos de literatura. O uso dos arranjos teciduais em matriz (*tissue microarrays* - TMA) tem facilitado muito a verificação rápida e reprodutível da relevância dos genes e moléculas candidatos a marcadores preditivos e prognósticos em amostras constituídas por grande número de casos. É uma técnica relativamente simples, cuja validação em relação às técnicas convencionais tem se consolidado cada vez mais, tendo rapidamente se difundido nos grandes centros mundiais de pesquisa (VAN DE RIJN; GILKS, 2004; STIEPCICH, M. M. A., 2007).

Um dos parâmetros que pouco se pode alterar, tanto na análise convencional quanto nos TMA, é a fixação inicial das amostras originais dos tecidos e tumores. Cada paciente é operado em tempos diferentes, e as condições de fixação e manipulação das peças cirúrgicas acabam tendo uma grande variabilidade (concentração do formol, tamponamento da solução, tempo de fixação, tempo de processamento, qualidade dos alcoóis e xilol no processamento histológico, qualidade e temperatura da parafina, tempo de armazenamento nos blocos) (STIEPCICH, M. M. A., 2007). A homogeneidade do tipo histológico no nosso estudo, assim como a procedência comum dos casos (UM-HNSG, mesmo grupo de cirurgiões e mesmo laboratório, portanto submetidos às mesmas condições de fixação e processamento) permitiu uma avaliação mais acurada e homogênea da expressão imunistoquímica, além de excluir o viés de agrupar nas análises tumores que freqüentemente têm perfil basalóide, porém apresentam comportamento biológico menos agressivo, tais como os carcinomas adenóide cístico, o medular e os secretores. Também excluiu as variáveis técnicas chamadas de pré-analíticas,

que são a causa de muitas discordâncias imunoistoquímicas entre laboratórios e os centros de referência para qualificação como College of American Pathologists (CAP) e o UK Neqas (GOBBI *et al.*, 2008).

Os TMAs deste estudo foram montados com fragmentos de 4mm de diâmetro. Isso propiciou uma amostra contínua maior de tumor, que permitiu melhor avaliação da expressão dos marcadores imunoistoquímicos (focal/difuso).

A validação da técnica e da comparabilidade dos resultados da imunoistoquímica com uso de TMA com os cortes convencionais já foi estabelecida em diversos estudos (TORHORST *et al.*, 2001; VAN DEN EYNDEN 2004; RUIZ *et al.*, 2006) e tem mostrado valor substancial na agilização da análise, correlação e aplicação das novas informações geradas pelos estudos genômicos e proteômicos nas pesquisas e na prática clínica. A escolha prévia de áreas mais representativas do tumor pelo patologista aumenta a qualidade da amostragem nos TMA. A realização das reações IIQ em diferentes níveis de cada cilindro nos cortes seriados (ou em duplicata) tem mostrado excelente correlação dos resultados obtidos com os TMA com aqueles das reações em cortes convencionais (TORHORST *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003), minimizando os efeitos da heterogeneidade tumoral e da amostragem relativamente reduzida dos TMA.

Durante a realização das reações imunoistoquímicas pode ocorrer descolamento do tecido das lâminas, tanto nos preparados convencionais quanto nos TMA, sendo que na literatura são referidas perdas de 5 a 20% dos cortes dos cilindros dos arrays (TORHORST *et al.*, 2001). No total da nossa amostra estudada (150 amostras) a porcentagem de perdas por descolamento foi de 7,3% (11/150). Houve representação adequada de células tumorais no corte para controle histológico pela hematoxilina-eosina e nos cortes para as reações imunoistoquímicas realizadas, reforçando a qualidade técnica dos TMA montados manualmente por este autor de acordo com a técnica orientada pelo Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Não consideramos necessária a repetição dos marcadores RE, RP e HER2 já que estes haviam sido lidos pelo mesmo patologista (LFBT) devidamente titulado pela Sociedade Brasileira de Patologia e que o Serviço de Anatomia Patológica do HNSG é regularmente certificado para a realização deste procedimento. Aliado a esses motivos devemos considerar que estas pacientes já haviam sido tratadas a partir destes resultados.

Neste trabalho, foram analisadas apenas características morfológicas (carcinomas do tipo ductais e seus respectivos graus histológicos) e características imunoistoquímicas. É preciso ressaltar que, embora não haja correspondência exata e consensual entre os perfis geneticamente estabelecidos por microarranjos de DNA e a imunoistoquímica, existe uma boa aproximação entre eles (NIELSEN *et al.*, 2004; LIVASY *et al.*, 2006). Podemos constatar que na prática, para fins terapêuticos, a abordagem dos carcinomas mamários é feita discriminando-os nos 3 perfis imunoistoquímicos: 1) RH positivos, 2) HER2 positivo e RH negativos e 3) TN. Estes perfis refletem de certa maneira o subtipo genético intrínseco. Neste contexto, o estudo foi iniciado baseado em imunoistoquímica, a princípio esperando um predomínio estatisticamente significativo de expressão de fenótipo basalóide entre os triplo negativos, o que observamos que não ocorreu.

5.2 A EXPRESSÃO QUALITATIVA E A AVALIAÇÃO SEMI-QUANTITATIVA DOS MARCADORES DE FENÓTIPO BASAL EGFR, CK5/6 E CK14

Para a definição de fenótipo basal de um carcinoma de mama, a maioria dos estudos preconiza como critério de positividade “qualquer positividade” citoplasmática das citoqueratinas, pois significam que a célula possui tais filamentos intermediários no seu citoplasma e que esta distribuição pode ser irregular (KORSCHING *et al.*, 1991; ABD EL-REHIM *et al.*, 2004; NIELSEN *et al.*, 2004). Outros autores estabelecem critérios semiquantitativos mais apurados, exigindo positividade em pelo menos 5% (MALZUHN *et al.*, 1998), 10% (OTTERBACH, 2000) ou 20% (LAAKSO, 2005) das células tumorais. Van de Rijn *et al.* (1996) consideraram coloração citoplasmática e membranar como critério de positividade para expressão de CK5/6 e CK17, identificando grupo de pior prognóstico e descrevendo que a expressão mostrou sempre ser focal.

No presente estudo considerou-se como critério de positividade para as citoqueratinas basais e para o EGFR qualquer marcação citoplasmática ou de membrana no componente invasor, acima de eventual coloração de fundo. A positividade para CK5/6 foi focal em 6/18 casos (33,4%) e difusa em 12/18 (66,6%) enquanto que para CK14 foi focal em 11/23 (48,8%) e difusa em 12/23 (52,2%), sendo que a marcação por CK14 demonstrou ser a mais consistente, pois foi mais intensa e homogênea (figura 1A).

O uso de CK5/6 pode complementar a análise morfológica e ser utilizada como ferramenta de ensino no reconhecimento de lesões mamárias proliferativas intraductais (Mac Grogan et al, 2008). Este marcador tem mostrado positividade difusa e intensa nas proliferações intraductais floridas sem atipias, enquanto que, nas hiperplasias atípicas e no carcinoma in situ de baixo grau nuclear podem se mostrar ausentes ou com positividade focal (Figura 2 A,B,C e D). No entanto, alguns carcinomas in situ de alto grau nuclear têm demonstrado positividade difusa para citoqueratinas basais, sugerindo ser a lesão precursora dos carcinomas basalóides da mama (LIVASY *et al.*, 2007).

5.3 RESULTADOS QUANTITATIVOS

Ao compararmos as idades das pacientes ao diagnóstico, observamos que no grupo TN a média de idade das pacientes é significativamente menor ($p=0,032$) do que no grupo LA (tabela 1). Este achado corrobora o proposto na literatura, de que pacientes jovens têm baixa positividade para RE e sobrevida livre de doença inferior ao das pacientes idosas (ANDERS *et al.*, 2008).

Carcinomas RE negativos têm mostrado comportamento clínico mais agressivo, o que pudemos constatar quando observamos que dentre os triplo negativos predominam carcinomas grau III (61,9%) e que quando comparado com os LA (22,5%) este achado é significativo. A maioria dos casos TN mostrou metástases para linfonodos (52,4%) enquanto a maioria dos LA foi negativo (57,5%), evidenciando a maior agressividade das lesões em que os RH são negativos (tabela 1).

Quando testamos os marcadores basais, observamos uma tendência de que as CK 5/6 e CK14 ocorram com mais frequência entre os carcinomas triplo negativos (tabela 2). Já o EGFR mostrou positividade maior entre os LA (10%) do que entre os TN (4,8%). Dentre os casos LA, 1 foi grau histológico I, 2 casos foram grau II e 1 caso foi grau III.

A partir destes resultados observamos que tumores com RH positivos podem também expressar fenótipo basal, o que ocorreu em 30%, quando consideramos a positividade de pelo menos um dos marcadores EGFR e/ou CK5/6 e/ou CK14 (tabela 3).

Jumppanen *et al.* (2007) também relataram o achado de positividade para citoqueratinas basais em casos RH positivos por imunoistoquímica. Em 48 casos positivos para um coquetel de CK5 e 14, 13 deles eram RE positivo, mas a positividade estava significativamente relacionada com negatividade para o *status* hormonal.

Ainda pudemos identificar os verdadeiros carcinomas chamados de “basalóides” na literatura, os que são triplo negativos e expressam algum marcador basal. Apesar de termos encontrado maior expressão de fenótipo basal entre os TN (42,9% *versus* 30%), este achado não foi estatisticamente significativo (tabela 3). Cabe ressaltar também que, a maioria dos casos TN não expressaram fenótipo basalóide, e que nenhuma diferença estatística foi encontrada na comparação entre TN basais e não basais (tabela 7).

Analisando a distribuição dos resultados positivos e negativos dos marcadores (tabela 4), a combinação de positividade de CK5/6 e CK14 foi a mais freqüente entre os TN e se igualou a positividade isolada do EGFR nos LA. Esta variação na positividade dos marcadores é uma das causas de viés encontrados na literatura e que resultam em resultados tão conflitantes. Quando o critério para carcinoma basalóide inclui apenas um marcador, a porcentagem de casos aumenta. Quanto mais aditivo for este critério, menos casos são identificados. Por exemplo, em nosso estudo se tivéssemos utilizado o critério de Ersahin *et al.* (2009) que condiciona o conceito de carcinoma basalóide apenas aos casos positivos para EGFR e pelo menos duas citoqueratinas basais positivas, nós não teríamos nenhum caso na nossa amostra. Este refinamento no critério e a correlação com fatores prognósticos e sobre vida é essencial para que a classificação molecular possa realmente ser aplicada na rotina.

O EGFR foi um dos genes testados junto com um rol de outros e que mostraram associação com prognóstico quando agrupados com as citoqueratinas basais. Nos últimos anos, esta família de receptores, conhecidos como “fator de crescimento epidérmico”, teve grande destaque (REIS-FILHO *et al.*, 2005), e tem sido estudada em vários tipos de tumores, entretanto este marcador raramente encontra-se expresso em estudos experimentais de carcinoma de mama (BHARGAVA *et al.*, 2005; REIS-FILHO *et al.*, 2006). Por conseguinte, nossos resultados são concordantes com estudos que demonstram a inativação do gene EGFR no carcinoma de mama (BHARGAVA *et al.*, 2005 ; REIS-FILHO *et al.*, 2006;

VIEIRA, D. S. C., 2007). Por outro lado, este gene tem manifestado expressão nos carcinomas metaplásicos, considerados um tipo de carcinoma basalóide e estudos mais amplos são necessários para elucidar a via da carcinogênese mamária dependente do EGFR (REIS-FILHO *et al.*, 2006). Em nossa amostra, tivemos baixa positividade para EGFR, ocorrendo marcação isolada em 4 casos LA e em nenhum caso TN. Este marcador foi positivo também em mais 2 casos, associado a CK14, no grupo TN. Observamos que em 4 dos 6 casos EGFR positivos do nosso estudo, ocorreram metástase para linfonodos (apêndice 3), sendo que 3 deles eram LA. Acreditamos que a positividade para EGFR seja indicativo de maior agressividade e que alerte para a possibilidade de terapia alvo direcionada, entretanto, em nosso estudo este marcador pareceu não contribuir na identificação de casos de carcinomas basalóides.

Quando testados os 3 marcadores deste estudo quanto à sensibilidade em identificar um carcinoma basalóide em meio aos TN (TABELA 5), detectamos a CK14 como o mais sensível (88,9%). Este seria o marcador de escolha em nossa unidade para ser utilizado nos casos TN como um recurso inicial para identificação de possíveis Carcinomas Basalóides. Não avaliamos a especificidade dos marcadores porque, pelo padrão ouro, se as 3 proteínas são negativas então o carcinoma é classificado como não basal. Portanto, todos os não basais pelo padrão ouro terão CK14, CK5/6 e EGFR negativos, o que levará à especificidade igual a 100%. Por exemplo, para a CK14, ocorreram 52 casos negativos nos carcinomas não basais; pela fórmula de especificidade $52/52=1$ ou 100%.

Particularmente, há grande interesse no estudo dos casos com negatividade para os receptores hormonais e para a proteína HER2, onde as opções terapêuticas são mais restritas.

Quando comparamos a expressão de fenótipo basal entre os triplo negativos (tabela 7), observamos que a média de idade é menor entre os casos de carcinoma basalóide, nos quais também ocorreram mais casos de carcinomas graus III (72,2% *versus* 54,2%), sem significância estatística. Já em relação ao envolvimento linfonodal, os TN sem fenótipo basal apresentaram mais metástases para pelo menos um linfonodo, sem significância estatística.

Seriam os Carcinomas Basalóides agressivos por serem negativos para receptores hormonais ou por expressarem fenótipo basal (CK basais e/ou expressão de EGFR)? Apesar de termos detectado diferenças entre os grupos, estas não foram

significativas, sugerindo que a maior agressividade destes tumores está realmente mais associada à negatividade dos RH. Esta idéia também é fortalecida em outras duas situações 1) quando, ao compararmos Carcinomas Basalóides (TN basais) com LA basais (tabela 8), encontramos predominância de grau III entre os carcinomas basalóides, com significância estatística; 2) quando, ao compararmos LA não basais com TN não basais, também evidenciarmos a mesma predominância entre TN não basais, com significância estatística (tabela 9). Estes nossos achados são também suportados por estudos com resultados semelhantes. Jumppanen *et al.* (2007) encontraram diferenças da sobrevida em carcinomas basais e não-basais na população em geral, mas isto não foi verdadeiro dentro do grupo RE negativo. Sugerem que a expressão de citoqueratinas basais não é um fator prognóstico independente. Malzahn *et al.* em 1998 e Potenski *et al.* em 2005 também não encontraram nenhuma diferença na sobrevida entre carcinomas basais dentre casos RE negativos. Compartilhamos da conclusão destes autores de que, todos os carcinomas RE negativos podem ser classificados como tendo um prognóstico relativamente pobre, independente da composição das citoqueratinas.

Ersahin *et al.* (2009) enfatizaram o achado de 23 (23/91) casos de carcinoma ductal invasor de alto grau histológico com fenótipo basalóide em mulheres brancas acima de 40 anos e a importância do seu reconhecimento nesta faixa etária, por fornecer informação prognóstica relevante. O comportamento biológico também foi diferente quando comparadas as pacientes acima de 40 anos e as abaixo de 37 anos, onde as primeiras mostraram tumores maiores e mais linfonodos positivos; e os casos estavam associados com mutação do BRCA1.

Outro ponto relevante a ser discutido é o conceito de carcinoma basalóide, o qual tem como principal parâmetro a negatividade para receptores hormonais e para superexpressão do HER2. Ou seja, casos de carcinomas positivos para receptores hormonais ou para superexpressão do HER não podem então ser chamados de carcinoma basalóide. No entanto, a positividade destes marcadores associada a positividade de citoqueratinas basais já vem sendo descrita mas o seu significado clínico ainda permanece uma incógnita. Laakso *et al.* (2006) descreveram um tipo de carcinoma basal que chamaram de basoluminal, devido a coloração parcialmente positiva da membrana celular para CK5 e 14; muitos destes casos mostraram amplificação do HER2.

Comparamos carcinomas LA com e sem fenótipo basalóide pela positividade de EGFR e/ou CK5/6 e/ou CK14 com 3 fatores importantes para o prognóstico, a idade, o grau histológico e o envolvimento linfonodal, na busca de uma possível correlação. Os LA que expressaram marcadores basais tiveram uma tendência de ocorrer em pacientes mais jovens, abaixo de 50 anos (58,3% nos que expressaram fenótipo basal *versus* 28,6% nos não basais), mas não conferiram maior agressividade em relação ao grau histológico e ao envolvimento linfonodal (TABELA 6). Pesquisar fenótipo basal em casos LA parece não trazer nenhuma informação prognóstica adicional, exceto pelo fato de ocorrer em pacientes mais jovens.

Bori e Czerni (2009) encontraram proporção maior de linfonodos negativos em casos de carcinoma com fenótipo basal do que sem fenótipo basal, mas sem significância estatística, utilizando como critério de fenótipo basal a negatividade para RE e HER2, e a positividade para CK5 e/ou EGFR e/ou CK14 e/ou p63. Em nosso estudo encontramos pequena proporção de linfonodos positivos nos carcinomas basalóides quando comparados com luminais A (44% versus 42,5%).

Encontramos diferenças estatisticamente significativas em relação a média de idade e a presença de grau histológico III quando comparamos os grupos LA (sem considerar a expressão de fenótipo basal) e o grupo de carcinomas basalóides (tabela 10). Carcinomas basalóides ocorrem em pacientes com média de idade menor e são carcinomas pouco diferenciados. Estes carcinomas têm tendência a dar metástases para cérebro e pulmão mais precocemente e independente do envolvimento linfonodal. Talvez este seja o motivo de não termos encontrado diferenças em relação a presença de metástases para linfonodos entre os grupos.

Laakso *et al.* (2005), Lakhani *et al.* (2004) enfatizam a relação significativa entre carcinomas basalóides em pacientes jovens e mutação de BRCA 1, afirmando que esta caracterização tem alta acurácia na predição de câncer hereditário por mutação do BRCA 1. Estes dados nos sugerem que a relação entre o fator idade precoce e fenótipo basalóide tem significado quando as pacientes são portadoras da mutação do BRCA1, sendo este um grupo mais homogêneo do ponto de vista tanto morfológico quanto prognóstico. Na ausência desta mutação, o fenótipo basalóide pode se expressar em qualquer idade, num grupo heterogêneo de carcinomas ductais, mas que carregam um prognóstico também mais reservado e limitações de terapias alvo-direcionadas.

Ao compararmos as tabelas 1 e 10, estes mesmos achados se repetem, novamente enfatizando que, a presença de receptores hormonais é o grande discriminador de classes diferentes de carcinomas de mama.

A relevância dos receptores hormonais como fator prognóstico e preditivo foi amplamente estudado e evidenciado. Para a adequada avaliação destes receptores na prática clínica, deve-se priorizar a excelência do processamento anatomopatológico, desde a fixação em tempos adequados, com formol corretamente diluído, representação adequada do tumor para o exame microscópico, dissecação cuidadosa dos linfonodos axilares, avaliação microscópica minuciosa, relatando todos os achados em laudo que siga os protocolos recomendados pela maioria dos serviços de referência mundiais em câncer de mama.

Finalmente, a única variável em que a presença de marcadores basais mostrou relevância, foi em relação a média de idade, quando, ao compararmos todos os casos que não expressaram fenótipo basal (independente da expressão de receptores hormonais) com os casos que expressaram esse fenótipo, encontramos média de idade significativamente menor entre os casos com expressão de fenótipo basal (tabela 11).

Van de Rijn *et al.* (2002) demonstraram que a expressão de CK 17 e/ou CK 5/6 em 600 casos testados com TMA correlacionou-se com comportamento clínico desfavorável, independentemente do tamanho e grau histológico do tumor nos casos sem metástase nodal.

Millikan *et al.* (2008) em estudo com ênfase epidemiológico, utilizando imunistoquímica, ao observar carcinomas *in situ* com fenótipo basal, sugeriu que o fenótipo é estabelecido numa fase precoce da carcinogênese, refletindo diferentes etiologias para os grupos luminal A e basalóide. Encontraram que a prevalência de fenótipo basalóide é maior entre americanas afro-descendentes, na pré-menopausa, enquanto que o luminal A foi mais comum entre mulheres brancas na pós-menopausa. O painel utilizado neste estudo para definir o subtipo LA foi RE e/ou RP positivo e HER2 negativo e para o basal-símile foi RE negativo, RP negativo HER2 negativo, EGFR e/ou CK5/6 positivo. Não comentou o significado epidemiológico das lesões triplo negativas isoladamente, ou seja, aquelas que não expressaram também nenhum dos marcadores EGFR e CK5/6. Também não comentou o achado de positividade para RH e HER2 na vigência de positividade para EGFR e/ou CK5/6.

Acreditamos que o papel da expressão de fenótipo basal ainda é uma controversa devido às diferentes metodologias aplicadas na literatura, o que dificulta a comparação adequada dos resultados.

6 CONCLUSÕES

- 1- A média de idade foi menor em pacientes com carcinoma ductal Triplo Negativo do que Luminal A. O grau histológico I foi mais freqüente em Luminais A, assim como o grau III foi mais freqüente nos Triplo Negativos. Não houve diferença significativa entre os grupos Luminal A e Triplo Negativo em relação a classificação das idades e a presença de envolvimento linfonodal.
- 2- Ambos os grupos Luminal A e Triplo Negativo expressaram fenótipo basalóide com os marcadores EGFR, CK5/6 e CK 14, sendo que houve tendência maior de ocorrer expressão de CK5/6 e de expressão significativa de CK14 no grupo Triplo Negativo. Na dependência da expressão isolada ou combinada dos marcadores estudados, ocorreu variação na freqüência de casos de Carcinoma Basalóide, sendo que a CK14 mostrou maior sensibilidade para identificá-los.
- 3- Entre os casos LA, houve tendência de que pacientes maiores de 50 anos apresentassem carcinoma ductal luminal A não-basal. A presença deste fenótipo não determinou diferenças significantes em relação à média de idade, ao grau histológico e ao envolvimento linfonodal.
- 4- Entre os casos TN, a presença de fenótipo basal não determinou diferenças significantes em relação à idade, ao grau histológico e ao envolvimento linfonodal.
- 5- Houve mais casos de carcinomas ductais grau III entre os TN basais do que entre os LA basais, sugerindo que a condição de Triplo Negativo (presença de receptores hormonais negativos) foi mais importante do que a presença de fenótipo basal na determinação de maior agressividade em relação ao grau histológico. A média e classificação das idades, o grau histológico e o envolvimento linfonodal não apresentaram diferenças significantes entre os grupos.

- 6- Houve mais casos de carcinomas ductais grau III entre os TN não-basais do que entre os LA não-basais, sugerindo novamente que a condição de Triplo Negativo (presença de receptores hormonais negativos) foi mais importante do que a presença de fenótipo basal na determinação de maior agressividade em relação ao grau histológico. A média e classificação das idades, o grau histológico e o envolvimento linfonodal não apresentaram diferenças significantes entre os grupos.
- 7- Houve diferença significativa entre os carcinomas Luminais A e os Carcinomas Basalóides em relação à média de idade e ao grau histológico, com média de idade menor e predomínio de Grau histológico III nos Carcinomas Basalóides. Não houve diferença significativa entre a classificação das idades e o envolvimento linfonodal entre os grupos.
- 8- A média de idade foi significativamente menor nos carcinomas com expressão de fenótipo basal, independente de ser LA ou TN. A classificação das idades, o grau histológico e o envolvimento linfonodal não apresentaram diferenças significantes entre os grupos.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-REHIM, D.M. *et al.* Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast cancer. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.203, p.661-671, 2004.
- ABD EL-REHIM, D.M. *et al.* High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancerconfirming recent cDNA expression analyses. **Int. J. Cancer**, Philadelphia, v.116, p.340-350, 2005.
- ALBERTS, B. *et al.* **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science, 2002. p.907-982.
- ALDRIGHI, J.M. *et al.* Tabagismo e antecipação da idade da menopausa. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.51, n.1, p.51-53, jan./fev. 2005.
- ALLRED, DC. *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.11, p.155-168, 1998.
- ANDERS, C.K. *et al.* Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.26, p.3324-3330, 2008.
- BACCHI, C.E.; ALMEIDA, P.C.C.; FRANCO, M. **Manual de padronização de laudos histopatológicos**. 3.ed. São Paulo: Reichmann&Autores, 2005.
- BARDOU, V.J. *et al.* Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.21, p.1973-1979, 2003
- BARROS, A.C.S.D.; BUZAID, A.C. (Ed.). **Câncer de mama: tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Dendrix Edição e Design, 2007.
- BERTUCCI, F. *et al.* Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. **Hum. Mol. Genet.**, Oxford, v.9, p.2981-29 91, 2000
- BHARGAVA, R. *et al.* EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFRactivating mutations. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.18, p.1027-1033, 2005.
- BIRNBAUM, D. *et al.* Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **Int. J. Oncol.**, Athens, v.25, n.2, p.249-258, 2004.
- BORI, R.; CSERNI, G. Basal phenotype in breast carcinoma occurring in women aged 35 or younger. **Pathol. Oncol.Res.**, Budapest, v.15, p.41-45, Mar. 2009.

BÖCKER, W. *et al.* Common Adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.82, p.737-746, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. **Estimativa 2010**: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2008. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em: 20 março, 2010.

CAULIN, C. *et al.* Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. **J. Cell Biol.**, New York, v.149, p.17-22, 2000.

DANDACHI, N. *et al.* Co-expression of tenascin C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.193, p.181-189, 2001.

DENDUKURI, N. *et al.* Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. **CMAJ**, Ottawa, v.176, p.1429-1434, 2007.

DESMEDT, C. *et al.* Strong time dependence of the 76-gene prognostic signature for node-negative breast cancer patients in the TRANSBIG Multicenter Independent Validation Series. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.13, n.11, p.3207-3214, 2007.

DI SAVERIO, S. *et al.* 259 patients with DCIS of the breast applying USC/Van Nuys prognostic index: a retrospective review with long term follow up. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.109, p.405-416, 2008.

DICKSON, R.B.; LIPPMAN, M.E. Molecular basis of breast cancer. In: MENDELSON, J. *et al.* (Ed.). **Molecular basis of cancer**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders, 2001. p.313-342.

DOMAGALA, W. *et al.* Vimentin expression appears to be associated with poor prognosis in node-negative ductal NOS breast carcinomas. **Am. J. Pathol.**, New York, v.137, n.6, p.1299-1304, 1990.

DOMAGALA, W. *et al.* Vimentin is preferentially expressed in high-grade ductal and medullary, but not in lobular breast carcinomas. **Am. J. Pathol.**, New York, v.137, n.5, p.1059-1064, 1990.

DOMAGALA, W. *et al.* Vimentin is preferentially expressed in human breast carcinomas with low estrogen receptor and high Ki-67 growth fraction. **Am. J. Pathol.**, New York, v.136, n.1, p.219-227, 1990.

DUNNWARD, L.K. *et al.* Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Res.**, London, v.9, R6, 2007.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I.O.; PINDER, S. E. Pathological prognostic factors in breast cancer. **Crit. Rev. Oncol./Hematol.**, Cleveland, v.31, n.3, p.209-223, 1999.

EORTC BREAST CANCER COOPERATIVE GROUP *et al.* Breast-conserving treatment with or without radiotherapy in ductal carcinoma-in-situ: ten-year results of European Organization for Research and Treatment of Cancer randomized phase III trial 10853 - a study by the EORTC Breast Cancer Cooperative Group and EORTC Radiotherapy Group. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.24, p.3381-3387, 2006.

ERŞAHIN, C. *et al.* Basal-like subtype breast cancers in women older than 40 years of age. **Int. J. Surg. Pathol., New York**, v.18, n.1, p.42-47, Feb. 2010.

FADARE, O.; TAVASSOLI, F.A. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. **Adv. Anat. Pathol.**, Baltimore, v.14, n.5, p. 358-73, 2007.

FAN, C. *et al.* Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.355, p.560-566, 2006.

FERGENBAUM, J.H. *et al.* Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, Philadelphia, v. 13, p.667-72, 2004.

FITZGIBBONS, P.L. *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.124, p.966-978, 2000.

FOEKENS, J.A. *et al.* Multicenter validation of a gene expression–based prognostic signature in lymph node–negative primary breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.24, p.1665-1671, 2006.

FOULKES, W.D. *et al.* Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.95, p.1482-1485, 2003.

FRANZÉN, B. *et al.* Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: downregulation of cytokeratins. **Br. J. Cancer.**, London, v. 73, p.1632-1638, 1996.

GEYER, C.E. *et al.* Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 355, p.2733-2743, 2006.

GIACCONE, G. Epideral growth factor receptor inhibitors in the treatment of nonsmall-cell lung cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.23, p. 3235-3242, 2005.

GOBBI, H. *et al.* Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with tumor grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. **Histopathology**, London, v. 36, p. 168-177, 2000.

GOBBI, H. *et al.* Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. **J Bras Patol Med Lab**, v. 44, n. 2, p. 127-36, 2008.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary of early therapy of breast cancer 2007. **Ann. Oncol.**, Dordrecht, v.18, n.7, p. 1133-1144, 2007.

GOLDHIRSCH, A. *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2009. **Ann. Oncol.**, Dordrecht, v.20, n.8, p.1319–1329, 2009.

GUSTERSON, B.A. *et al.* Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, London, v.7, p.143-148, 2005.

HAY, E.D. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anat.**, Basel, v.54, p.8-20, 1995.

HAYES, D.F.; THOR, A.D. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. **Semin. Oncol.**, New York, v.29, p.231-245, 2002.

HENSON, D.E. *et al.* Hutter Rv, for the Cancer Committee CAP: College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.119, p.1109-1112, 1995.

HORTOBAGYI, G.N. Opportunities and challenges in the development of targeted therapies. **Sem. Oncol.**, New York, v.31, p.21-27, 2004.

HUTCHESON, I.R. *et al.* Inductive mechanisms limiting response to anti-epidermal growth factor receptor therapy. **Endocr. Rel.Cancer**, Bristol, v.13S, p.89-97, 2006.

HYNES, N.E.; LANE, H.A. ERBB receptors and cancer: the complexity of targetedinhibitors. **Natl. Rev. Cancer**, New York, v.5, p.341-54, 2005.

JACQUEMIER, J. *et al.* Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.207, n.3, p.260-268, 2005.

JONES, C. *et al.* CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation. **Br. J. Cancer.**, London, v.85, p.422-427, 2001.

JONES, C. *et al.* Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.10, p.5988-5997, 2004.

JOOSS, K., MULLER, R. Deregulation of genes encoding microfilament-associatedproteins during Fos-induced morphological transformation. **Oncogene**, New York, v. 10, p.603-608, 1995.

JØRGENSEN, J.T.; NIELSEN, K.V.; EJLERTSEN, B. Pharmacodiagnosics and targeted therapies - a rational approach for individualizing medical anticancer therapy in breast cancer. **Oncologist**, Dayton, v.12, p.397-405, 2007.

JUMPPANEN, M. *et al.* Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. **Breast Cancer Res.**, Dordrecht, v.9, n.1, p.R16, 2007.

KAY, E. *et al.* Use of tissue microarray for interlaboratory validation of HER2 immunocytochemical and FISH testing. **J. Clin. Pathol.**, London, v.57, p.1140-1144, 2004.

KATZ, M. *et al.* A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. **Natl. Cell Biol.**, London, v.9, n.8, p.961-969. 2007.

KNIGHT, J.*et al.* Monoclonal antibodies specific for subsets of epidermal keratins: biochemical and immunocytochemical characterization-applications in pathology and cell culture. **J. Pathol.**, London, v.145, n.4, p.341-54, 1985.

KORSCHING, E. *et al.* Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. **Lab. Invest.**, Baltimore, v.82, p.1525-1533, 2002.

LAAKSO, M. *et al.* Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA 1 tumors. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.18, p.1321-1328, 2005.

LAAKSO, M. *et al.* Basolumental carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v. 12, p. 4185-4191, 2006

LAKHANI, S.R. *et al.* Breast Cancer Linkage Consortium. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.11, p. 5175-5180, 2004.

LeROY, X. *et al.* Decrease of c-erbB-2 and c-myc mRNA levels in tamoxifen-treated breast cancer. **Oncogene**, New York, v.6, p.431, 1991.

LIVASY, C.A. *et al.* Phenotypic evaluation of basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod. Pathol.**, Baltimore, v.19, p.264-271, 2006.

LIVASY, C.A. *et al.* Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.38, n.2, p.197-204, 2007.

LODISH, H. *et al.* **Molecular cell biology.** 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2000. p.795-847.

MACGROGAN, G. *et al.* Impacto f imunohistochemical markers, CK5/6 and E-cadherin on diagnostic agreement in non-invasive proliferative breast lesions. **Histopathology**, London, v.52, p.689-697, 2008.

MAKRETSOV, N. *et al.* A fluorescence in situ hybridization study of ETV6-NTRK3 fusion gene in secretory breast carcinoma. **Genes Chrom. Cancer**, New York, v.40, p.152-157, 2004.

MANSOUR, E.G.; RAVDIN, P.M.; DRESSLER, L. Prognostic factors in early breast carcinoma. **Cancer**, Philadelphia, v.74, p.381-400, 1994.

MALZAHN, K. *et al.* Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. **Virchows Arch.**, Berlin, v.433, p.119-129, 1998.

MARQUEZ, A. *et al.* Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic *In situ* Hybridization (CISHTM) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. **Diagn. Mol. Pathol.**, Philadelphia, v.13, p.1-8, 2004.

MATOS, I. *et al.* Cytokeratin 5, and cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Arch.**, Berlin, v.447, p. 688-694, 2005.

MILLIKAN, R.C. *et al.* Epidemiology of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.109, n.1, p.123-139, 2008.

MOLL, R., KREPLER, R., FRANKE, W.W. Catalog of human cytokeratins of expression in normal epithelia, tumor and cultured cells. **Cell**, v.31, p.11-24, 1982.

MOLL, R. Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation. **Acta Histochem.**, Jena, v.41, Suppl., p.117-27, 1992.

MOLL, U.M., SLADE, N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. **Mol. Cancer Res.**, New York, v.2, p.371-86, 2004.

MOLINO, A., *et al.* Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of imunohistochemical and biochemical methods. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.45, p.241-249, 1997.

MONTEAGUDO, C. *et al.* Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. **Am. J. Pathol.**, New York, v.136, p.585, 1990.

MUNSTER, P.N., NORTON, L. Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer. **Breast Cancer Res.**, Dordrecht, v. 3, p. 361-4, 2001.

MURPHY, L.J. Estrogen induction of insulin-like growth factors and myc protooncogene expression in the uterus. **J. Steroid. Biochem. Mol. Biol.**, Oxford, v.40, p.223, 1991.

NAGAHATA, T. *et al.* Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray. **Cancer Sci.**, Philadelphia, v.95, p.218-25, 2004.

NAGLE, R.B. *et al.* Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. **J. Histochem. Cytochem.**, New York, v.34, p.869-881, 1986.

NIELSEN, T.O. *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.10, p.5367-5374, 2004.

O'GRADY, A. *et al.* HER-2 analysis in tissue microarrays of archival human breast cancer: comparison of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, Philadelphia, v.11, p.177-82, 2003.

OSBORNE, C.K. Steroid hormone receptors in breast cancer management. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.51, p.227-38, 1998.

OSBORNE, C.K. *et al.* Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.95, p.353-361, 2003.

OSBORNE, C.K. *et al.* Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. **Clin. Cancer Res.**, Philadelphia, v.11, p. 865s-70s, 2005.

OTTERBACH, F. *et al.* Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. **Histopathology**, London, v.37, p.232-240, 2000.

OYAMA, T. *et al.* The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. **Breast Cancer**, v.14, New York, p.182-188, 2007.

PAGE, D.L. *et al.* Continued local recurrence of carcinoma 15-25 years after a diagnosis of low grade ductal carcinoma in situ of the breast treated only by biopsy. **Cancer**, Philadelphia, v.76, p.1197-200, 1995.

PALACIOS, J. *et al.* Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.90, p.5-14, 2005.

PARAMIO, J.M.; JORCANO, J.L. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? **Bioessays**, London, v.24, p.836-844, 2002.

PARKIN, D. Global cancer statistics in the year 2000. **Lancet Oncol.**, London, v.2, p. 533-543, 2001.

PEDRO, A.O. *et al.* Idade de ocorrência da menopausa natural em mulheres brasileiras: resultados de um inquérito populacional domiciliar. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, V.19, n.1, p.17-25, jan./fev. 2003.

PEROU, C.M. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, London, v.406, n.6797, p.747-752, Aug.17, 2000.

PERRY, N. *et al.* **European guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis**. 4th ed. Luxembourg: Office for Official Publications of the European Communities, 2006.

RAKHA, E A. *et al.* Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. **Histopathology**, London,; v.50, p.434-8, 2007.

RAKHA, E.A.; ELLIS, I.O. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**, New South Wales, v.41, p.40-47, Jan. 2009.

RAMASWAMY, S. *et al.* Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.98, p.15149–15154, 2001.

REINER, A. *et al.* Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. **Cancer Res.**, Dordrecht, v.50, p.7057-7061, 1990.

REIS-FILHO, J S. *et al.* Novel and classic myoepithelial/stem cell markers in metaplastic carcinomas of the breast. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, Hagerstown, v.11, p.1-8, 2003.

REIS-FILHO, J S. *et al.* Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. **Breast Cancer Res.**, Dordrecht, v.7, p.R1028-R1035, 2005.

REIS-FILHO, J S. *et al.* Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. **Histopathology**, London, v.49, n. 1, p.10-21, 2006.

REIS-FILHO, J S. *et al.* EGFR amplification and lack of activation mutations in metaplastic breast carcinomas. **J. Pathol.**, Edinburgh, v.209, p.445-453, 2006.

ROSS, J.S., FLETCHER, J.A. HER-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. **Am. J Clin. Pathol.**, Baltimore, v.112, n.1, p. S53-67, 1999.

ROSS, J.S., *et al.* Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. **Mol. Cell Proteomics**, London, v.3, p.379-398, 2004.

RUIZ, C. *et al.* Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. **Int. J. Cancer**, New York, v.118, p.2190-2194, 2006.

SCHNITT, S.J.; JACOBS, T.W. Current status of HER2 testing: caught between a rock and a hard place. **Am. J Clin. Pathol.**, Baltimore, v.116, p.806-810, 2001.

SALOMON, D.S. *et al.* Epidermal growth factor related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit. Rev. Oncol. Haematol.**, Limerick, v.19, p.183-232, 1995.

SLAMON, D.J. *et al.* Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, Washington, v.235, p.177-82, 1987.

SLAMON, D.J, *et al.* Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.344, p.783-792, 2001.

SLAMON, D.J, *et al.* Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (ACT) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (ACTH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study [Abstract]. **Breast Cancer Res. Treat.**, Dordrecht, v.94, p.S5, 2005.

SORLIE, T. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.98, p.10869-10874, 2001.

SORLIE, T. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.100, p.8418-8423, 2003.

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v.40: p.2667-2675, 2004.

SORLIE, T. *et al.* Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, London, v.7, p. 127, 2006.

SORLIE, T. Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. **Meth. Mol. Biol.**, Totowa, v.360, p.91-114, 2007.

SOTIRIOU, C. *et al.* Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. **J. Natl. Cancer Inst.**, Washington, v.98, n.4, p.262-272, Feb. 15, 2006.

STIEPCICH, M. M. A. Perfil de citoceratinas e sua relação com diferenciação e fatores clinicomorfológicos em carcinomas ductais soe de mama estudados em “array de tecido” (TISSUE MICROARRAY – TMA)- (Tese de Doutorado). São Paulo: Fundação Antônio Prudente, Curso de Pós-Graduação em Ciências-Área de concentração:Oncologia, 2007.

STERNBERG, S.S. **Histology for Pathologists**. Pennsylvania: Lippincott-Raven Publishers, 1991.

STIERER, M. *et al.* Comparison of immunohistochemical and biochemical measurement of steroid receptors in primary breast cancer: evaluation of discordant findings. **Breast Cancer Res. Treat.**, London, v. 50, p.125- 134, 1998.

TAGLE, R.B. *et al.* Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. **J. Histochem. Cytochem.**, Baltimore, v.34, n.7, p.869-881, 1986.

TAKEHANA, T. *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. **Clin. Gastroenterol. Hepatol.**, New York, v.14, p.1438-1445, 2003.

TANNER, M. *et al.* Practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect her-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v. 157, n. 5, p.1467-1472, 2000.

TANG, P.; WANG, J.; BOURNE, P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.39, p.506–513, 2008.

TAVASSOLI, F.A.; DEVILEE, P. **Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs**. Lyon: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer, 2003.

TOGNON, C. *et al.* Expression of the ETV6-NTRK3 gene fusion as a primary event in human secretory breast carcinoma. **Cancer Cell**, Cambridge, v.2, p.367-376, 2002.

TORHORST, J. *et al.* Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.159, p.2249-2256, 2001.

TRASK, D.K. *et al.* Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, Washington, v.87, p.2319-2323, 1990.

- TSUDA, H. *et al.* Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. **Am. J. Surg. Pathol.**, Philadelphia, v.24, p.197-202, Feb. 2000.
- VAN DEN EYNDEN, G.G., VAN DER AUWERA, I., VAN LAERE, S., *et al.* Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.**, London, v. 85, p.13-22, 2004.
- VAN DE RIJN, M. *et al.* Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. **Am. J. Pathol.**, New York, v.161, p.1991-1996, 2002.
- VAN DE RIJN M, GILKS CB. Applications of microarrays to histopathology. **Histopathology**, London, v.44, p.97-108, 2004.
- VAN'T VEER, L.J., DAI, H.Y., VAN DE VIJVER, M.J., *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, London, v.415, p.530-536, 2002.
- VIEIRA, D. S. C. Desempenho dos marcadores egfr, ck5, ck14, p63 e p-caderina para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama (Tese de Mestrado). Florianópolis: Mestrado em Ciências Médicas, Universidade Federal de Santa Catarina, 2007.
- VOGEL, C.L. *et al.* Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **J. Clin. Oncol.**, New York, v.20, p.719-726, 2002.
- WHO SCIENTIFIC GROUP ON RESEARCH ON THE MENOPAUSE IN THE 1990S. **Research on the menopause**: report of WHO Scientific Group. Geneva: WHO, 1994.
- WOLLF, A.C. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, Chicago, v.13, n.1, p.18, 2007.
- YAMASHITA, H. *et al.* Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. **Breast Cancer**, Norwell, v.13, p.74-83, 2006.
- YAMAUCHI, H.; STEARNS, V.; HAYES, D.F. The role of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. **Breast Cancer**, Norwell, v.8, p.171-183, 2001a.
- YAZIJI, H. *et al.* HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. **JAMA**, Chicago, v.291, p.1972-1977, 2004.

ZHANG, D. *et al.* Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.34, p.362-368, 2003.

APÊNDICES

APÊNDICE I - TMA

Construção do TMA

A partir dos blocos de tecidos doadores, foram realizados cortes histológicos de 4 micrômetros para coloração Hematoxilina-Eosina (HE). As novas lâminas foram seqüencialmente analisadas ao microscópio óptico por um patologista (APMS), e uma ou duas áreas morfológicamente significativas do componente tumoral invasor foram selecionadas na lâmina de vidro. Posteriormente, foram delimitados dois círculos (correspondentes às áreas significativas) em cada bloco doador sobrepondo as lâminas marcadas, para assim marcar a área de extração do material dos blocos doadores.

Montagem dos TMA

A partir do número de áreas selecionadas em cada bloco doador, foram construídos mapas com as coordenadas de localização de cada caso nos blocos receptores seguindo criteriosamente a confecção dos TMA. Um fragmento de tecido renal foi incluído acima da posição 3E, usado como marcador de coordenada.

Os blocos receptores do TMA foram construídos manualmente no Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, composto por um molde de 15 cilindros e por uma “seringa extratora” (*punch-extractor*). De cada bloco doador foram extraídos um ou dois cilindros de 4mm de diâmetro e depositados nos blocos receptores, previamente preparados.

Depois de depositados todos os cilindros, os 10 blocos receptores, agora TMA (figura 5A), foram colocados na estufa a 37°C durante 1 hora com a face de corte virada para baixo e sobre uma lâmina de vidro. A cada intervalo de uma hora os blocos foram pressionados para promover a homogeneização dos mesmos. Deste modo, os cilindros de tecido ficaram aderidos às paredes do bloco receptor e a superfície de corte ficou homogênea através do contato com a lâmina.

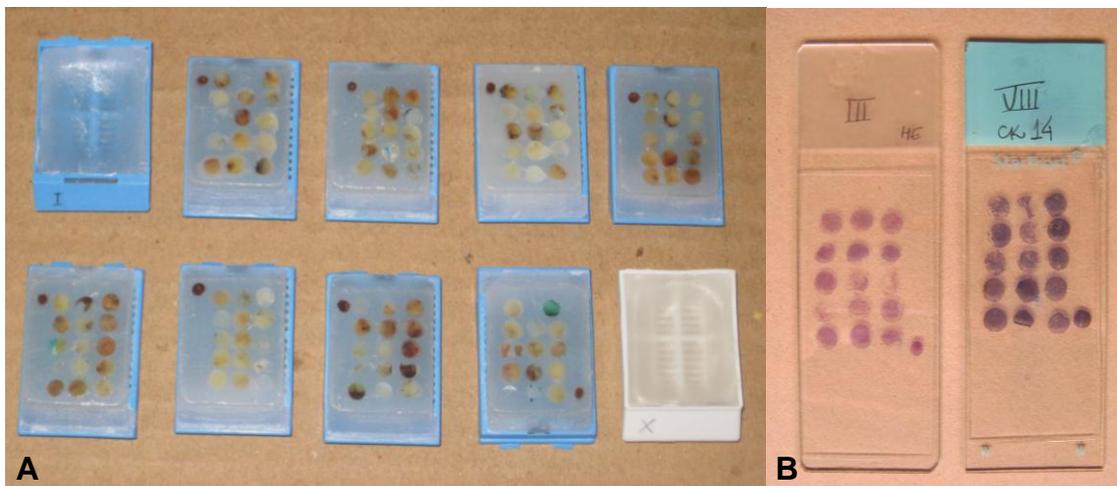
Corte do Bloco de TMA

Antes de realizar os cortes histológicos, os TMAs foram esfriados a 10°C negativos durante 30 minutos para após realizar-se o corte seqüencial de 4µm

(micra) de espessura. A espessura dos cortes histológicos é idêntica. Foi feita a coloração HE, do primeiro corte de cada TMA, para controle morfológico da presença de tumor e graduação histológica (figura 5B).

Foram utilizados uma placa fria (Leica EG1130, Germany) e um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Germany) para a realização dos cortes histológicos. Foram usados dois tipos de lâminas, conforme o destino dos cortes histológicos: para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) lâminas de vidro para microscópio, lapidadas, marca PERFECTA e para imunohistoquímica lâminas eletricamente carregadas, marca StarFrost Adesivas Poly-L-Lysine, apresentando estas um maior poder de adesão.

FIGURA 5 - BLOCOS DE PARAFINA DOS MICROARRANJOS DE TECIDOS E EXEMPLO DE LÂMINAS EM HE E IMUNOISTOQUÍMICA



APÊNDICE 2 - MAPA TMA

I					tecido renal
3	03-1805-14	03-23-14	03-598	03-1140-15	03-2847-12
2	06-6623-12	02-4108-1	3244-11	02-7171-24	02-4923-2
1	02-4984*	02-4984*	02-1506-2	5312-24	6824-1
	A	B	C	D	E

II					tecido renal
3	05-1805-2	05-2795-15	05-3372-1*	05-3372-1*	05-3685
2	04-4041*	04-4041*	05-36-12A*	05-36-12A*	05-234
1	03-6824-44	04-599-2	04-1079-3	04-9214-16	04-4270-15
	A	B	C	D	E

III					tecido renal
3	06-912-22	06-952-33	06-1134-12	06-1249-12	06-1273
2	06-785-15	03-7092-1	03-4236-22	02-1930	02-6784
1	05-4272-12	06-85-32	06-419-6	06-542-12	06-575
	A	B	C	D	E

IV					tecido renal
3	06-3003-2	06-3022-3*	06-3022-3*	06-3061-121	06-3430-22
2	06-2360-15	06-2779-35	06-2881-12	06-2901-32	06-2914-22
1	06-1504-12	06-1588-15	06-1596	06-1630-1	06-2631-12
	A	B	C	D	E

V					tecido renal
3	06-4256-15	06-4266	06-4574	06-5055-2	06-5240-12
2	06-3962-16	06-3983	06-3985-12*	06-3985-12*	06-4075-35
1	06-3444-24	06-3679-5	06-3805-32	06-3891-12A	06-3891-12C
	A	B	C	D	E

VI					tecido renal
3	06-3123	06-3565-12	06-3602-22	06-4195-14	06-4246-6
2	06-1030	06-1214-32	06-1639-12	06-2477	06-2806
1	06-6259-12	06-6294-13	06-6623-12	05-2579-36*	05-2579-36*
	A	B	C	D	E

VII					tecido renal
3	98-2627*	controle	98-2627*	O2-2057*	OO-4696
2	O6-3983	controle	96-337	O2-2057*	OO-4696
1	O6-3955	controle	O2-5669*	O2-5669*	O5-2799
	A	B	C	D	E

VIII					tecido renal
3	O6-4014	O7-2743	O7-1912	O7-4135-1.2*	O7-4135-1.2*
2	O7-3416-1.2*	controle	controle	O7-4921-2*	O7-4921-2*
1	O6-6888*	O6-6888*	O7-2395	O7-83-1.2*	O7-83-1.2*
	A	B	C	D	E

IX					tecido renal
3	O6-2405-	O7-4366	O3-6124	O3-3842	O7-6443-2
2	O7-1701-2	O4-1352-1.6	O3-3310-1	O3-2847-1.2	O2-7887
1	O7-1293	O3-3061	O5-615*	O3-2189	O5-615*
	A	B	C	D	E

X					tecido renal
3	O4-3865	O6-2881	O6-2914	O7-4114	O6-4256
2	O6-6611	O5-4015	O5-4015	O5-615	O7-4135
1	O5-3372	O4-6807	O6-309	95-2526	O7-83
	A	B	C	D	E

APÊNDICE 3-BANCO DE DADOS

	TMA/posição	# bloco doador	idade	RE	RP	HER	EGFR	CK5/6	CK14	GRAU	linfonodo
1	I/1A	02-4984	46	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	NEG
2	I/1B	02-4984*	DUPLICATA								
3	I/1C	02-1506-2	52	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
4	I/1D	5312-24	65	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	III	NEG
5	I/1E	6824-1	58	POS	POS	NEG	POS F/C	NEG	NEG	I	NEG
6	I/2A	06-6623-12	52	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	NEG
7	I/2B	02-4108-1	40	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
8	I/2C	3244-11	70	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	NEG
9	I/2D	02-7171-24	75	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
10	I/2E	02-4923-2	74	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	I	POS
11	I/3A	03-1805-14	DUPLICATA								
12	I/3B	03-23-14	40	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	I	NEG
13	I/3C	03-598	57	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
14	I/3D	03-1140-15	68	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	I	NEG
15	I/3E	03-2847-12	52	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	I	NEG
16	II/1A	03-6824-44	DUPLICATA								
17	II/1B	04-599-2	54	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	NEG
18	II/1C	04-1079-3	84	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
19	II/1D	04-9214-16	73	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
20	II/1E	04-4270-15	51	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	NEG
21	II/2A	04-4041	53	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS F/C	I	NEG
22	II/2B	04-4041*	DUPLICATA								
23	II/2C	05-36-12A	72	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	I	NEG
24	II/2D	05-36-12A *	DUPLICATA								
25	II/2E	05-234	50	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
26	II/3A	05-1805-2	88	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
27	II/3B	05-2795-15	49	POS	POS	NEG	NEG	POS F/M	POS F/C+M	I	NEG
28	II/3C	05-3372-1*	DUPLICATA								
29	II/3D	05-3372-1	56	NEG	NEG	NEG	NEG	POS F/C	POS F/C+M	II	POS
30	II/3E	05-3685	47	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	II	NEG
31	III/1A	05-4272-12	54	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	POS
32	III/1B	06-85-32	43	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	POS
33	III/1C	06-419-6	51	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	III	NEG
34	III/1D	06-542-12	43	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	I	NEG
35	III/1E	06-575	78	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	III	NEG
36	III/2A	06-785-15	43	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS F/C	II	POS
37	III/2B	03-7092-1	67	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
38	III/2C	03-4236-22	41	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	NEG

71	V/3A	06-4256-15	41	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
72	V/3B	06-4266	46	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	nãoconsta
73	V/3C	06-4574	66	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	III	NEG
74	V/3D	06-5055-2	72	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
75	V/3E	06-5240-12	51	NEG	NEG	NEG	POS D/C	NEG	POS F/C	III	POS
76	VI/1A	06-6259-12	44	POS	POS	POS	NEG	NEG	POS D/C	II	NEG
77	VI/1B	06-6294-13	73	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	NEG
78	VI/1C	06-6623-12	52	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	II	NEG
79	VI/1D	05-2579-36*									
80	VI/1E	05-2579-36*									
81	VI/2A	06-1030	62	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
82	VI/2B	06-1214-32	55	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	I	NEG
83	VI/2C	06-1639-12	41	NEG	NEG	POS	NEG	POS F/M	NEG	III	POS
84	VI/2D	06-2477	72	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	I	NEG
85	VI/2E	06-2806	45	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	POS D/C+M	III	POS
86	VI/3A	06-3123	60	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
87	VI/3B	06-3565-12	52	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
88	VI/3C	06-3602-22	52	NEG	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	III	POS
89	VI/3D	06-4195-14	74	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
90	VI/3E	06-4246-6	49	POS	POS	NEG	POS D/C+M	NEG	NEG	III	POS
91	VII/1A	06-3955	35	POS	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
92	VII/1B	controle									
93	VII/1C	O2-5669	55	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
94	VII/1D	O2-5669*									
95	VII/1E	O5-2799	27	NEG	NEG	NEG	NEG	POS F/M	POS F/M	III	NEG
96	VII/2A	O6-3983	57	POS	POS	POS	NEG	NEG	NEG	III	NEG
97	VII/2B	controle									
98	VII/2C	96-337	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	NEG
99	VII/2D	O2-2057	51	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
100	VII/2E	OO-4696	67	NEG	NEG	NEG	NEG	POS D/C	POS D/M	III	NEG
101	VII/3A	98-2627*									
102	VII/3B	controle									
103	VII/3C	98-2627	52	NEG	NEG	NEG	NEG	POS D/C	POS D/M	III	NEG

131	IX/3A	O6-2405-1.2	43	NEG	NEG	NEG	NEG	POS F/C	NEG	III	POS
132	IX/3B	O7-4366/6443	DUPLICATA								
133	IX/3C	O3-6124	85	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
134	IX/3D	O3-3842	73	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
135	IX/3E	O7-6443-2	52	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
136	X/1A	O5-3372	56	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
137	X/1B	O4-6807	62	NEG	NEG	NEG	NEG	POS D/C+M	POS F/C+IS	II	NEG
138	X/1C	O6-309	69	POS	POS	NEG	NEG	POS D/C	NEG	III	POS
139	X/1D	95-2526	51	NEG	NEG	NEG	NEG	POS D/C	POS D/M	III	NEG
140	X/1E	O7-83	39	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
141	X/2A	O6-6611	Excluído CK5/6 e EGFR desgrudaram								
142	X/2B	O5-4015	57	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
143	X/2C	O5-4015	DUPLICATA								
144	X/2D	O5-615	60	NEG	NEG	NEG	NEG	POS D/C	POS F/M	III	POS
145	X/2E	O7-4135	61	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	POS
146	X/3A	O4-3865	54	NEG	NEG	NEG	NEG	POS F/C	POS D/M	II	POS
147	X/3B	O6-2881	40	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
148	X/3C	O6-2914	68	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	NEG	II	NEG
149	X/3D	O7-4114	50	NEG	POS	NEG	NEG	NEG	NEG	III	POS
150	X/3E	O6-4256	41	POS	POS	NEG	NEG	NEG	POS D/M	II	POS

 Amostras desconsideradas

 Casos Luminais B e Subtipo Superexpressão HER2

 Amostra final deste estudo

ANEXO



1959/2009

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ
Núcleo de Bioética
Comitê de Ética em Pesquisa
Ciência com Consciência

PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA

Parecer Nº **0003469/09**Protocolo CEP Nº **5365**

Título do projeto **ESTUDO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO EM DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA**

Grupo
Versão **1**

Protocolo CONEP **0480.0.084.000-09**Pesquisador responsável **IRIS RABINOVICH**Instituição **PUCPR-CCBS - Curitiba**

Objetivos

Estudar a expressão de marcadores de células tronco em amostras de carcinomas ductais utilizando a técnica de tissue microarrays, correlacionando a expressão dos marcadores com os subtipos moleculares do câncer de mama.

Específicos:

- Estabelecer correlação entre o fenótipo CD44+/CD24- e o subtipo Basal.
- Estabelecer correlação entre o fenótipo CD44-/CD24+ e o subtipo HER2.
- Estabelecer correlação entre as variáveis: grau histológico, status linfonodal, e idade da paciente e a expressão de CD44, CD44v6, e CD24.

Comentários e considerações

Pesquisa justificada pela evidência em estudos que demonstram "que a expressão de marcadores de células tronco nos tumores mamários tem implicação prognóstica". Parte da questão norteadora: Existe associação entre os marcadores imunohistoquímicos de células tronco mamárias e os diferentes subtipos moleculares do câncer de mama (com ênfase no fenótipo basal e HER-2)? Para respondê-la pretende analisar 160 lâminas de carcinomas ductais mamários de mulheres que tiveram diagnóstico em um centro de patologia no município de Curitiba, no período de janeiro de 1998 a julho de 2009.

Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.

TCUD de acordo com a pesquisa e liberado acesso aos dados para as pesquisadoras: Ana Paula Martins Sebastião e Iris Rabinovich

Conclusões

Aprovado sob o quesito ético

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **04/11/2009**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.

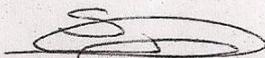
Parecer Nº **0003469/09**Protocolo CEP Nº **5365**Título do projeto **ESTUDO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO EM DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA**Grupo
Versão **1**Protocolo CONEP **0480.0.084.000-09**Pesquisador responsável **IRIS RABINOVICH**Instituição **PUCPR-CCBS - Curitiba****Situação Aprovado**

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 04 de Novembro de 2009.



Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa