



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE – ICS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



CLÁUDIA LEAL MACÊDO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DOS SUBTIPOS
MOLECULARES DO CARCINOMA INFILTRANTE DA MAMA
E CORRELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO.**

Salvador, BA
2013

CLÁUDIA LEAL MACÊDO

**CARACTERIZAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA DOS SUBTIPOS
MOLECULARES DO CARCINOMA INFILTRANTE DA MAMA
E CORRELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em
Imunologia da Universidade Federal da Bahia, como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor em Imunologia.

Orientadora: Prof. (a) Dra. Ivana Lucia Oliveira Nascimento
Co-orientador: Prof. Dr. Marco Antônio Vasconcelos Rêgo

Salvador, BA
2013

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Universitária de
Saúde, SIBI - UFBA.

M141 Macêdo, Cláudia Leal

Caracterização imunoistoquímica dos subtipos moleculares dos carcinoma infiltrante da mama e correlação com o prognóstico / Cláudia Leal Macêdo – Salvador, 2013.

Orientadora: Prof^a Dr^a Ivana Lúcia Oliveira Nascimento.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal da Bahia.
Instituto de Ciências e Saúde , 2013.

1. Imunoistoquímica. 2. Câncer de mama 3. Patologia. I. Nascimento, Ivana Lúcia Oliveira. II. Universidade Federal da Bahia. III. Título.

CDU 618.19



UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA



ATA DA SESSÃO PÚBLICA DO COLEGIADO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO
EM IMUNOLOGIA PARA JULGAMENTO DO TRABALHO DE TESE DA DOUTORANDA
CLAUDIA LEAL MACEDO


Aos vinte e oito dias do mês de junho do ano de dois mil e treze, às 09:00 horas no auditório Ophélia Gaudenzi no 3º andar do Instituto de Ciências da Saúde, se reúne em sessão pública, a Banca Examinadora composta pelos Professores: Dra. Ivana Lúcia Oliveira Nascimento orientadora, Dr. Roque Pacheco de Almeida, Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo, Dr. Daniel Abensur Athanázio e Dr. Murilo Pedreira Neves Júnior, com a finalidade de discutir, avaliar e julgar o trabalho de Tese intitulado "Caracterização Imunoistoquímica dos Subtipos Moleculares do Carcinoma Infiltrante da Mama e correlação com o prognóstico" da Doutoranda Claudia Leal Macedo. Após a apresentação, foram feitos os comentários pelos examinadores. Havendo cumprido as exigências para a defesa, a Banca Examinadora conclui que a Doutoranda teve a sua defesa de Tese APROVADA emitindo pareceres individuais que serão anexados à ata. Nada mais havendo a tratar, é encerrada a sessão, e lavrada a presente ata que após lida e aprovada vai assinada pelos componentes da Banca examinadora, pela Doutoranda e pelo Coordenador do Programa de Pós-Graduação. Salvador, vinte e oito de junho do ano de dois mil e treze.


Prof. Dra. Ivana Lúcia Oliveira Nascimento
Orientadora



Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida
Banca Examinadora


Prof. Dr. Daniel Abensur Athanázio
Banca Examinadora


Prof. Dra. Iguaracyra Barreto de Oliveira Araujo
Banca Examinadora


Prof. Dr. Murilo Pedreira Neves Júnior
Banca Examinadora


Claudia Leal Macedo
Doutoranda


Prof. Dr. Lucas Pedreira Carvalho
Vice - Coordenador do PPGIm
ICS/UFBA

À Deus, obrigada por me permitir sonhar
mais esse sonho.....

AGRADECIMENTOS

A professora e minha eterna orientadora Dr (a) Helenemarie Schaer Barbosa, pela motivação e disponibilidade em guiar este trabalho, da maneira simples e prática e principalmente pela sua amizade sincera e franca;

A minha orientadora e professora Ivana Lúcia Nascimento por ter me aceito como orientanda e pela tranquilidade em lidar com os meus momentos de desespero.....

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Marco Rêgo por toda a disponibilidade e paciência em me guiar nos caminhos da estatística e principalmente por me fazer querer entendê-la.

Ao meu eterno Prof Dr. Aristides Cheto de Queiroz, obrigada sempre, sem você esta meta nunca seria atingida;

Aos meus pais, pela maior torcida de todos os tempos.....

Aos meus filhos ,Lorena e Victor, vocês são a razão de tudo, obrigada por vocês existirem na minha vida.....

À Marcos, obrigada por estar sempre ao meu lado

A todos os funcionários do arquivo do Hospital Aristides Maltez em especial ao Sr. Demerval e Sra Cristina, pelo grande esforço em garantir o acesso aos prontuários.

À todos os funcionários do Laboratório de Anatomia Patológica e Imunohistoquímica do Hospital Aristides Maltez, pela disponibilidade em todos os momentos....

“Se uma pessoa fizesse apenas o que entende, jamais avançaria um passo”.

Clarice Lispector

RESUMO

MACÊDO, Cláudia Leal. **Caracterização imunoistoquímica dos subtipos moleculares do carcinoma infiltrante da mama e correlação com o prognóstico.** [Tese – Doutorado]. Salvador: Universidade Federal da Bahia – UFBA / Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

O carcinoma infiltrante da mama apresenta características clínicas, morfológicas e evolutivas diversas que parecem traduzir a heterogeneidade tumoral. Semelhanças entre padrões de expressão gênica e imunoistoquímica dos receptores hormonais, do HER2 e das citoqueratinas basais e luminais permitiram agrupar tumores com padrões morfológicos e imunofenotípicos diferentes, identificando subtipos: luminal A (RE+,RP+,HER2-); luminal B (RE+,RP+,HER2+); HER2 + (RE-,RP-,HER2+); triplo-negativo (RE-,RP-,HER2-); basal-*símile* (RE-,RP-,HER2-CK5/6+ e/ou EFGR+) e “mama normal” (RE-,RP-,HER2-CK5/6- e/ou EFGR-). No presente estudo buscou-se correlacionar características clínico-patológicas e evolutivas com perfil imunoistoquímico dos subtipos moleculares em mulheres mastectomizadas. Nas análises estatísticas empregaram-se os métodos de Kaplan-Meier e a regressão de Cox. Utilizaram-se receptores hormonais, *anti-c-erbB-2*, *anti-CK5/6*, *anti-EGFR*, *anti-CK8*, *anti-p63*. Calcularam-se as associações entre variáveis pelas razões de prevalência. Observaram-se média de idade inferior a dos países desenvolvidos além de maior frequência de tumores pT2, de grau II e do ductal infiltrante e elevada frequência de metástases axilares. A sobrevida global foi de 80,1% em um período de dez anos. Comprometimento das margens cirúrgicas, metástases à distância e *status* menopausal foram variáveis importantes na sobrevida. Observou-se frequência elevada dos subtipos triplo-negativo e basal-*símile* e associações significantes entre estes subtipos e o HER2 + com tumores de maior dimensão (pT3) e grau histológico III confirmando que tem pior prognóstico. Expressão positiva de CK5/6 e EGFR foi a única diferença entre o subtipo basal-*símile* e o triplo-negativo, indicando que a subdivisão do triplo-negativo não seria necessária. Concluiu-se que os subtipos podem ser caracterizados pela avaliação dos fatores clínico-patológicos somados ao perfil imunoistoquímico.

Palavra-chave: Câncer de mama. Imunoistoquímica. Patologia. Prognóstico. Sobrevida.

ABSTRACT

MACÊDO, Cláudia Leal. **Immunohistochemical characterization of molecular subtypes of infiltrating breast carcinoma and correlation with prognosis.** [Thesis - Doctorate]. Salvador: Universidade Federal da Bahia – UFBA / Instituto de Ciências da Saúde, 2013.

The infiltrating breast carcinoma presents several clinical, morphological and evolutionary characteristics, which seems to show the tumoral heterogeneity. The similarities between gene expression patterns and the immunohistochemistry of the hormone receptors, of the HER2 and of the luminal and basal cytokeratins, have permitted grouping the tumors with different morphological and immunophenotypical standards, identifying the subtypes, as follows: luminal A (RE+,RP+,HER2-); luminal B (RE+,RP+,HER2+); HER2 + (RE-,RP-,HER2+);triple-negative (RE-,RP-,HER2); basal-*símile* (RE-,RP-,HER2-CK5/6+ and/or EGFR +) and “normal breast” (RE-,RP-,HER2-CK5/6- and/or EGFR -). In the present study, we sought to correlate the clinicopathological and evolutionary characteristics, with the immunohistochemical profile of the molecular subtypes, in a population of women with mastectomies. In the statistical analyses, the Kaplan-Meier methods and the Cox regression were employed. We used hormone receptors, anti-c-erbB-2, anti-CK5 / 6, anti-EGFR, and anti-CK8, anti-p63. The associations between variables were calculated through the prevalence ratios. It was observed that the a mean age was lower than the mean age in developed countries, besides a higher frequency of *pT2* tumors, grade II, and that of infiltrating ductal type, as well as high frequency of axillary metastases. The overall survival rate was 80.1% in a period of ten years. The surgical margin involvement, distant metastases, and menopausal status were significant variables for survival. High frequency of triple-negative and basal-*símile* subtypes and meaningful associations between these subtypes and the HER2 + with the larger-sized tumors (*pT3*), histological grade III, was observed, confirming thereby, a worse prognosis. The positive expression of the CK5 / 6 and EGFR was the only difference between the basal-*símile* subtype and the triple negative, indicating that the subdivision of the triple negative would not be necessary. It was concluded that the subtypes can be characterized through the evaluation of the clinicopathological factors added to the immunohistochemical profile.

Keywords: Breast cancer. Immunohistochemistry. Pathology. Prognosis. Survival

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

ARTIGO 1

Figura 1	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo tamanho tumoral em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	95
Figura 2	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo status axilar em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	96
Figura 3	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pela metástase à distância em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	97
Figura 4	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pela metástase à distância em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	98
Figura 5	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pela idade em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	99
Figura 6	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo status menopausal em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	100
Figura 7	Curva de sobrevida em dez anos estratificada por recidiva tumoral em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	101
Figura 8	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo grau histológico em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	102
Figura 9	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo tipo histológico ductal infiltrante x tipos histológicos especiais em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	103
Figura 10	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelos subtipos em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	104
Figura 11	Curva de sobrevida em dez anos estratificada pela quantidade de tratamento em pacientes com carcinoma infiltrante da mama	105
Figura 12	Análise de resíduos para o status menopausal	106
Figura 13	Análise de resíduos para o comprometimento das margens cirúrgicas	107
Figura 14	Análise de resíduos para metástase à distância	108
Figura 15	Análise de resíduos para o subtipo luminal A	109
Figura 16	Análise de resíduos para o subtipo luminal B	110

Figura 17	Análise de resíduos para o subtipo HER2 +	111
Tabela 1	Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as características clínicas	91
Tabela 2	Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as características patológicas e tratamento	92
Tabela 3	Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as funções de sobrevida não ajustada das pacientes e as variáveis do estudo	94
Tabela 4	Sobrevida de pacientes com carcinoma infiltrante da mama, Hazard Ratio e respectivos intervalos de confiança (90%) na análise multivariada de Cox.	106

ARTIGO 2

Figura 1	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal A (caso 7) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica negativa de membrana para o HER2.	134
Figura 2	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal B (caso 72) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2.	135
Figura 3	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular HER2 + (caso 132): coloração pela hematoxilina-eosina (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP (10x) e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2 (40x).	136
Figura 4	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular triplo-negativo (caso 14) (10x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE; expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP;	137

expressão imunoistoquímica negativa de membrana para o HER2.

Tabela 1	Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características clínicas	139
Tabela 2	Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características patológicas e tratamento	140
Tabela 3	Associações entre as características clínicas e subtipos do carcinoma infiltrante da mama	142
Tabela 4	Associações entre as características patológicas e subtipos do carcinoma infiltrante da mama	143
Tabela 5	Associações entre as características clínicas e os dois subtipos de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama	144
Tabela 6	Associações das características patológicas e os dois subtipos de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama	145

ARTIGO 3

Figura 1	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal A (caso 7) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica negativa para o HER2.	172
Figura 2	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal B (caso 72) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2.	173
Figura 3	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular HER2 + (caso 132): coloração pela hematoxilina-eosina (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP (10x) e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2 (40x).	174
Figura 4	Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular basal-	175

símile (caso 35): coloração pela hematoxilina-eosina (10x); expressão imunohistoquímica negativa nuclear para RE (10x); expressão imunohistoquímica negativa nuclear para RP (10x) e expressão imunohistoquímica negativa para o HER2 (10x); expressão imunohistoquímica positiva de membrana da CK5/6; expressão imunohistoquímica positiva de membrana do EGFR.

Figura 5	Estudo histopatológico e imunohistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular mama normal (caso 97) (10x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunohistoquímica negativa nuclear para RE; expressão imunohistoquímica negativa nuclear para RP; expressão imunohistoquímica negativa para o HER2; expressão imunohistoquímica negativa de membrana da CK5/6; expressão imunohistoquímica negativa de membrana do EGFR.	176
Figura 6	Estudo histopatológico e imunohistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular basal- <i>símile</i> (caso 144) (40x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunohistoquímica positiva nuclear para p63; expressão imunohistoquímica positiva de membrana para CK8 e expressão imunohistoquímica positiva de membrana para a CK5/6; expressão imunohistoquímica positiva de membrana do EGFR.	182
Quadro 1	Clones, diluição, fabricante dos anticorpos e recuperação antigênica dos anticorpos utilizados na imunohistoquímica.	170
Tabela 1	Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características clínicas	178
Tabela 2	Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características patológicas e tratamento	180
Tabela 3	Distribuição dos marcadores imunohistoquímicos nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama	183
Tabela 4	Associações entre as características clínicas e os subtipos do carcinoma infiltrante da mama	185
Tabela 5	Associações entre as características patológicas e os subtipos do carcinoma infiltrante da mama	186
Tabela 6	Associações entre características clínicas e o subtipos de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama	188
Tabela 7	Associações das características patológicas e o subtipo de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama	188

LISTA DE SIGLAS

ALDH1	Aldeído-desidrogenase 1
ALDH3	Aldeído-desidrogenase 3
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
BRCA 1	Gene do câncer de mama tipo 1 (Breast Cancer tipo 1)
bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
DNA	Acido desoxirribonucleico
CAP	Colégio Americano de Patologistas
Cdna	Acido desoxirribonucleico complementar
c-KIT	Receptor tirosina-quinase tipo III (<i>Tyrosine-protein kinase Kit</i>)
c-myc	<i>Myelocytomatosis viral oncogene</i>
CD10	Anti "Common Acute Lymphoblastic Leukemia Antigen";
CD20	Anticorpo monoclonal anti-linfócitos B
CD24	Antígeno do carcinoma de pequenas células do pulmão para o cluster de diferenciação 4
CD44	Antígeno de matriz extracelular- receptor de hialuronato
CD59	Fator inibidor do complexo de ataque à membrana
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CISH	Hibridização cromogênica <i>in situ</i>
CK	Citoqueratina
CK5	Citoqueratina 5
CK5/6	Citoqueratina 5/6
CK8	Citoqueratina 8
CK14	Citoqueratina 14
CK17	Citoqueratina 17
CK18	Citoqueratina 18
CXCR4	<i>Chemokine (C-X-C motif) receptor 4</i>
E- caderina	Caderina epitelial
EGF	Fator de crescimento epidérmico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
ERBB2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (avian).</i>
Fase S	Fase de síntese
FISH	Hibridização por fluorescência <i>in situ</i>
FOXA1	<i>Forkhead box A1</i>
GATA3	<i>Globin transcription factor 3</i>
HAM	Hospital Aristides Maltez
HER2 (c-erB-b2)	receptor 2 do fator de crescimento epidérmico
H.E	Hematoxilina-eosina
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confiança
IFN-γ	Interferon gama
IL-8	Interleucina 8
Ki-67	Anticorpo monoclonal -antinucleoproteína relacionado à proliferação celular
KRT	<i>Queratin gene</i>

miRNA	microRNA
MKI67	Antígeno identificado pelo anticorpo Ki-67
PARP	Poli-ADP-ribose
PCNA ciclina	Antígeno nuclear de proliferação celular-ciclina
Proteína S-100	Proteína Solúvel 100
pTNM	TNM patológico
pT	Tamanho de tumor primário segundo o TNM
p63	Proteína tumoral p63
p53	Proteína tumoral p53
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
RP	Razão de prevalência
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa
qRT-PCR	Reação em cadeia da polimerase com transcrição reversa em tempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RP	Razão de prevalência
SFRP1	<i>Secreted frizzled-related protein 1</i>
SOE	Sem outras especificações
STAT1	<i>Signal transducer and activator of transcription 1</i>
TMA	Microarranjos de tecido
TN	Triplo-negativo
TNM	T=tumor, N=número de linfonodos acometidos pela neoplasia, M=ocorrência de metástases à distância
TGF α	Fator de transformação de crescimento α
TP53	Proteína tumoral p53
TRAIL	Tumor necrosis factor-related-apoptosis-inducing ligand
UICC	União Internacional contra o Câncer

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	18
1.1	PROPOSIÇÃO	22
1.1.1	Objetivo Geral	22
1.1.2	Objetivos Específicos	22
2	REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1	ESTRUTURA HISTO-EMBRIOLÓGICA DO TECIDO MAMÁRIO	23
2.1.1	Morfologia	23
2.1.2	Perfil imunoistoquímico do epitélio mamário normal	25
2.2	HETEROGENEIDADE NO TECIDO MAMÁRIO	26
2.2.1	Heterogeneidade no epitélio mamário normal	26
2.2.2	Heterogeneidade tumoral no câncer de mama	27
2.2.3	Heterogeneidade tumoral e alterações gênicas	29
2.3	HISTORIA NATURAL DO CANCER DE MAMA	31
2.4	MARCADORES PROGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS	32
2.5	MARCADORES MOLECULARES DE EXPRESSÃO GÊNICA	35
2.6	MARCADORES MOLECULARES IMUNOISTOQUÍMICOS	38
2.6.1	Receptores hormonais	38
2.6.2	Proteína HER2	42
2.6.3	Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)	46
2.6.4	Citoqueratinas	49
2.6.5	Proteína p63	51
2.7	SUBTIPOS MOLECULARES DO CARCINOMA INFILTRANTE DA MAMA	52
2.7.1	Subtipos moleculares e expressão gênica	52
2.7.2	Subtipos moleculares e a expressão imunoistoquímica	59
2.7.2.1	Classificação imunoistoquímica	59
2.7.2.2	Marcadores imunoistoquímicos nos subtipos moleculares	62
2.7.2.3	Características clínicas e patológicas nos subtipos moleculares	67
2.7.2.4	Carcinomas mamários de subtipo molecular triplo-negativo	73
2.7.2.4.1	Aspectos gerais	73
2.7.2.4.2	Características clínicas e patológicas	75
2.7.2.5	Carcinomas mamários de subtipo molecular basal- <i>simile</i>	77
2.7.2.5.1	Marcadores imunoistoquímicos	77
2.7.2.5.2	Características clínicas	80
2.7.2.5.3	Características patológicas	82
3	ARTIGO 1	85
3.1	INTRODUÇÃO	86
3.2	MATERIAIS E MÉTODOS	87
3.2.1	Tipo de investigação e população do estudo	87
3.2.2	Coleta de dados e variáveis estudadas	88
3.2.3	Análise estatística	89
3.3	RESULTADOS	90

3.3.1	Características clínicas	90
3.3.2	Características patológicas dos tumores e tratamento	91
3.3.3	Seguimento clínico e sobrevida global	93
3.4	DISCUSSÃO	111
3.5	REFERÊNCIAS	116
3.6	APÊNDICE	120
3.7	ANEXOS	121
4	ARTIGO 2	128
4.1	INTRODUÇÃO	129
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS	130
4.2.1	Tipo de investigação e população do estudo	130
4.2.2	Coleta de dados e variáveis estudadas	131
4.2.3	Técnica histopatológica	132
4.2.4	Estudo imunoistoquímico	132
4.2.4.1	Critérios para interpretação da imunoistoquímica	133
4.2.4.2	Critérios imunoistoquímicos para classificação dos subtipos moleculares	133
4.2.5	Análise estatística	138
4.3	RESULTADOS	138
4.3.1	Características clínicas e patológicas	138
4.3.2	Descrição das associações entre as características clínico-patológicas e subtipos moleculares	141
4.3.3	Descrição das associações entre características clínico-patológicas e os subtipos moleculares de pior prognóstico	143
4.4	DISCUSSÃO	145
4.5	REFERENCIAS	151
4.6	APÊNDICE	156
4.7	ANEXOS	157
5	ARTIGO 3	165
5.1	INTRODUÇÃO	166
5.2	MATERIAIS E MÉTODOS	167
5.2.1	Tipo de investigação e população do estudo	167
5.2.2	Coleta de dados e variáveis estudadas	168
5.2.3	Técnica histopatológica	169
5.2.4	Estudo imunoistoquímico	169
5.2.4.1	Anticorpos utilizados	169
5.2.4.2	Técnica de imunoistoquímica	170
5.2.4.3	Critérios para interpretação da imunoistoquímica	170
5.2.4.4	Critérios imunoistoquímicos para classificação dos subtipos moleculares	171
5.2.5	Análise estatística	177
5.3	RESULTADOS	177
5.3.1	Características clínicas e patológicas	177
5.3.2	Marcadores imunoistoquímicos	181
5.3.3	Descrição das associações entre características clínico-patológicas e os subtipos moleculares	184
5.3.4	Descrição das associações entre as características clínico-	187

5.4	patológicas e os subtipos moleculares de pior prognóstico	189
5.4	DISCUSSÃO	189
5.5	REFERENCIAS	194
5.6	APÊNDICE	199
5.7	ANEXOS	200
6	CONCLUSÃO GERAL	210
7	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	213

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a neoplasia mais freqüente em mulheres no Brasil e no mundo, com crescentes taxas de incidência e mortalidade. Os carcinomas infiltrantes da mama representam um grupo de tumores heterogêneos com um amplo espectro de tipos morfológicos e de padrões evolutivos distintos. A heterogeneidade destes tumores está relacionada à célula de origem e às suas alterações de expressão gênica (BERTUCCI, 2008). Considerando o modelo hierárquico da oncogênese mamária, as células tronco-progenitoras podem se diferenciar em células luminais bem diferenciadas ou devido a um bloqueio na diferenciação, dar origem a células basais, contribuindo desta forma para a diversidade e progressão tumorais (BIRNBAUM, 2004).

As alterações genéticas que ocorrem nestas células neoplásicas são múltiplas, ou seja, estão relacionadas a genes diversos. A definição destes genes bem como a identificação dos seus padrões de variações é determinante das características biológicas tumorais (PEROU, 1999). A semelhança entre os padrões de expressão gênica pode agrupar tumores com diferentes padrões morfológicos e imunofenotípicos e representam a base da classificação molecular, identificando-se assim subgrupos tumorais com características genéticas homogêneas (PEROU; 1999; 2000; SORLIE, 2000, SORLIE, 2003).

Os estudos de expressão gênica com microarranjos de *c*-DNA permitiu a identificação dos cinco subtipos, baseados na expressão dos receptores hormonais e das citoqueratinas basais e luminais. Os tumores com expressão do receptor de estrógeno demonstravam também expressão gênica das citoqueratinas luminais (8/18), sendo assim designados como subtipo luminal e aqueles que eram RE negativos e expressavam genes basais, como os das CK5/6 e do EGFR, foram identificados como subtipo basal-*símile* (PEROU, 2000; SORLIE, 2000; SOTIRIOU, 2003). Aqueles tumores com expressão negativa de todos os genes foram denominados de subtipo “mama normal”, ou não classificável (PEROU, 2000; SORLIE, 2000; SOTIRIOU, 2003). Ainda nesse grupo de RE negativo, observaram-se neoplasias com superexpressão do oncogene *Erb*-B2, sendo denominadas de subtipo HER2 +.

Outro subtipo denominado triplo-negativo se caracteriza pela expressão negativa dos receptores hormonais e do HER2. Este subtipo tem sido utilizado por muitos autores como sinônimo do subtipo basal-*símile*, pois se considera que este último seja composto quase que inteiramente de tumores que são triplo-negativos (DENT, 2007; RAKHA, 2007a; RAKHA, 2008; IRWIN, 2008). Existem, porém, outros estudos que demonstram diferenças na expressão gênica e no perfil imunoistoquímico entre o triplo-negativo e o basal-*símile* (KREIKE, 2007; BERTUCCI, 2008).

A estratificação dos tumores mamários nestes grupos moleculares pode ajudar na caracterização de grupos de risco, já que pacientes com características clínicas e morfológicas semelhantes podem evoluir de forma diferente, sugerindo-se assim que fatores moleculares podem ter implicações prognósticas e preditivas, determinando a evolução da doença, bem como estar associados às características biológicas tumorais (REIS-FILHO, 2005). Contudo, apesar dos ensaios de perfil gênico nos carcinomas mamários serem considerados padrão “ouro”, o seu uso em larga escala na rotina clínica ainda é limitado devido ao alto custo e as dificuldades técnicas no uso de amostras parafinadas, já que estas ainda são o principal material biológico usado nos laboratórios responsáveis pelo diagnóstico histopatológico (CHEANG, 2008; BLOWS, 2010).

Na patologia mamária o estudo imunoistoquímico tem ampla utilização e engloba desde a determinação dos fatores preditivos e prognósticos no carcinoma infiltrante até mais recentemente, a categorização dos tumores em subtipos moleculares com expressão fenotípica semelhante (VIEIRA, 2008; KIM, 2006; CAREY, 2006; IRIGOYEN, 2011). Apesar dos ensaios imunoistoquímicos não se correlacionarem tão precisamente com a biologia tumoral como os perfis de expressão gênica, observou-se em alguns estudos, correlação positiva entre o perfil de expressão gênica e da imunoistoquímica, sendo caracterizado no trabalho de Nielsen et al. (2004), taxas elevadas de sensibilidade e especificidade deste último método (NIELSEN, 2004).

Posteriormente, muitos autores tem utilizado a expressão imunoistoquímica como substituto para classificação dos subtipos moleculares (CAREY, 2006; LERMA, 2007; YANG, 2007; CHEANG, 2008; ADEBAMOWO, 2008; AWALDEKARIM, 2008; NGUYEN, 2008; SPITALE, 2009; BHARGAVA, 2009; BLOWS, 2010). Além dos marcadores tumorais já descritos acima, outros foram

adicionados na determinação dos subtipos, tais como o KI67, CK14, a p63, a p-caderina, c-kit, dentre outros (NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; CHEANG, 2008; SHAO, 2012).

A classificação dos carcinomas mamários em subtipos moleculares representa uma tentativa de agrupar os fenótipos tumorais, categorizando os pacientes em diferentes grupos prognósticos. Estes fenótipos determinados pela expressão dos marcadores imunoistoquímicos podem traduzir as características biológicas e evolutivas de cada grupo. Estes fatores biológicos tumorais englobam o desenvolvimento, crescimento e capacidade metastática que são traduzidas morfológicamente pelo tamanho tumoral, grau histológico e status axilar, respectivamente (PAGE, 1994).

Estes fatores prognósticos associados às características clínicas podem prever a evolução clínica e sobrevida das pacientes. Assim, os tumores com subtipo luminal, que são receptores hormonais positivos, podem estar associados com fatores de bom prognóstico, enquanto que aqueles com receptores negativos que englobam os triplo- negativo, basal-*símile* e HER2 + são geralmente pouco diferenciados e mais invasivos (PEROU, 2000; CAREY, 2006; CHEANG, 2008; BADVE, 2009).

Os tumores que mostram superexpressão do HER2 correspondem a tumores de grau histológico elevado e de maiores dimensões além de receptores hormonais negativos (BACCHI, 2001; GOBBI, 2008; DABBS, 2012). A expressão do EGFR e das CK5/6 confere aos tumores basal-*símile*, um fenótipo mais agressivo além da associação com recidiva tumoral e sobrevida curta (NIELSEN, 2004; SHAO, 2012; DABBS, 2012).

Apesar da frequência elevada dos subtipos luminais na maioria das casuísticas, o enfoque maior em relação às características clínicas e patológicas tem sido com os tumores com subtipos HER2 +, triplo negativo e basal-*símile* já que estão relacionados a fatores de pior prognóstico e consequentemente com decisões terapêuticas mais elaboradas (PEROU, 2000; SORLIE, 2003; NIELSEN, 2004; CAREY, 2006; YANG, 2007; CHEANG, 2008; MORIYA, 2010).

Os subtipos moleculares são distintos do ponto de vista biológico e clínico, salientando-se que estas diferenças são mais evidentes quando se compara os subtipos luminais, triplo-negativo basal-*símile*. Têm sido descritas associações entre os subtipos e as características clinico-patológicas, observando-se que os subtipos

luminais e os subtipos triplo-negativo e basal-*símile*, podem representar pólos opostos nesta classificação, e podem estar associados a fatores de bom e mau prognóstico, respectivamente (YANG, 2007; WEBSTER, 2008; NGUYEN, 2008; SPITALE, 2009).

Contudo, a classificação dos subtipos pelo estudo imunoistoquímico ainda é limitada devido a diversos fatores, tais como: diferenças entre populações estudadas, falta de uniformidade na definição do painel imunoistoquímico, sensibilidade dos anticorpos e diferenças nos seus critérios de positividade. No Brasil, os estudos de caracterização dos subtipos são escassos e mais especificamente na Bahia eles são inexistentes, evidenciando-se assim a necessidade de estudos de caracterização dos padrões morfológicos e clínicos dos subtipos e sua correlação com fatores de prognóstico e sobrevida. Assim, estudou-se as características clínico-patológicas e evolutivas, correlacionando-se com o perfil imunoistoquímico dos subtipos moleculares em uma população de pacientes mastectomizadas, com seguimento clínico de aproximadamente dez anos.

1.1 PROPOSIÇÃO

1.1.1 Objetivo Geral

Caracterizar pelo estudo imunoistoquímico os subtipos moleculares do carcinoma infiltrante da mama e correlacionar com as características clínicas, patológicas e evolutivas.

1.1.2 Objetivos Específicos

- Analisar a expressão imunoistoquímica do receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER2, EGFR, p63, CK5/6, CK8 nos carcinomas mamários infiltrantes da mama;
- Classificar pelo perfil imunoistoquímico os subtipos moleculares do carcinoma infiltrante da mama diagnosticados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Aristides Maltez no ano de 2002;
- Correlacionar os subtipos moleculares considerados de pior prognóstico, triplo-negativo, basal-símile e HER2 + com as características clínicas tais como: idade, *status* menopausal, paridade, história familiar, metástase à distância, recidiva tumoral e estadiamento clínico;
- Correlacionar os subtipos moleculares considerados de pior prognóstico, triplo-negativo, basal-símile e HER2 + com as características patológicas, tais como: tamanho do tumor, tipo e grau histológicos; status axilar e comprometimento das margens cirúrgicas;
- Avaliar a sobrevida e evolução das pacientes com carcinoma infiltrante da mama em um período de seguimento de aproximadamente dez anos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 ESTRUTURA HISTO-EMBRIOLÓGICA DO TECIDO MAMÁRIO

2.1.1 Morfologia

O desenvolvimento do tecido mamário, desde o seu crescimento embriológico, puberal, lactação e involução passa por etapas dependentes e independentes dos hormônios e dos fatores de crescimento. No estágio inicial embrionário, o tecido mamário é independente dos hormônios esteroides sexuais. Porém, após a décima quinta semana, observa-se influência da testosterona e no final da gestação, a mama fetal sofre influência dos hormônios esteroides placentários e da prolactina, que estimula a atividade secretória (MILLS, 2007; ROSEN, 2009).

Ainda nestes estágios iniciais, as células epiteliais que formam o broto mamário expressam o fator de transformação do crescimento (TGF α), que pode mediar o efeito do estrógeno na promoção de crescimento. Observa-se ainda imunexpressão do Ki-67 e *bcl-2*, que estão relacionados respectivamente a atividade proliferativa e a morfogênese pela inibição da apoptose (MILLS, 2007; ROSEN, 2009).

Após o nascimento e até a puberdade, a mama consiste apenas de ductos lactíferos com ramificações discretas, porém sem evidência de ácinos. Na adolescência, com a influência cíclica dos hormônios esteroides e peptídeos, ocorre o crescimento e ramificação dos ductos. A atividade do estrógeno, dos hormônios de crescimento e dos glicocorticóides estão relacionados ao crescimento ductal, espessamento epitelial e diferenciação do estroma, enquanto que a progesterona e a insulina tem ação na diferenciação e crescimento lóbulo-alveolar (MILLS, 2007; ROSEN, 2009).

O crescimento mamário ocorre em grande parte, durante a puberdade e se estende até a terceira década, porém somente na gravidez, ocorre diferenciação terminal da mama, com um aumento no número dos lóbulos, proliferação epitelial e

acúmulo de secreção. Ao final da lactação, os lóbulos involuem e o tecido mamário retornam ao estágio de repouso. Na menopausa ocorre atrofia com redução do tamanho e da complexidade dos ácinos e perda do estroma intralobular de tecido adiposo (MILLS, 2007; ROSEN, 2009).

A mama da mulher adulta é constituída por uma série de ductos, ductulos e lóbulos que estão imersos em um estroma com quantidades variáveis de tecido adiposo e fibroso. Estas estruturas se organizam em forma de lobos, que se iniciam no mamilo, com os ductos coletores que drenam dos ductos e ductulos, e se ramificam nos lóbulos. Estes últimos junto aos ductos terminais formam a unidade terminal ducto-lobular, que representa a porção estrutural e funcional da mama (MILLS, 2007; ROSEN, 2009).

O epitélio que reveste esse sistema ducto-lobular está constituído por uma dupla camada de células, uma mais interna, denominada luminal e outra mais externa, caracterizada como mioepitelial. Mais recentemente, tem sido descrita uma terceira célula, denominada basal devido a sua localização na posição basal ou suprabasal do epitélio mamário. A diferenciação celular no sistema ducto-alveolar traduz o desenvolvimento fetal inicial, onde se observa expressão diferencial das citoqueratinas (CKs) (MILLS, 2007).

As células basais demonstram propriedades de células tronco ou de células progenitoras, dando origem às células luminais e mioepiteliais. Elas expressam inicialmente a CK5 e durante o processo de diferenciação expressam também as CKs8/18/19, caracterizando a linhagem epitelial-luminal ou co-expressam a actina de músculo liso, dando origem as células mioepiteliais. As células epiteliais luminais são cuboidais ou colunares, com núcleos ovais e citoplasma pálido e eosinofílico, com várias organelas envolvidas na secreção. Estas células expressam principalmente as citoqueratinas (CKs) de baixo peso molecular, 7, 8,18,19 (MILLS, 2007).

As células mioepiteliais podem se originar das células basais entre a 23^a e 28^a semanas de gestação e parece ter um importante papel na ramificação do tecido mamário. Essas células são capazes de sintetizar alguns constituintes da membrana basal, tais como a laminina, colágeno tipo IV, fibronectina, metaloproteinases e fatores de crescimento. As células mioepiteliais podem ser achatadas, e ter um aspecto epitelioide ou uma aparência fusiforme. Essas células expressam uma variedade de marcadores imunoistoquímicos, tais como as CKs de alto peso

molecular, 5/6,14 e 17 além de *p63*, CD10, calponina, proteína S-100, actina e miosina de cadeia pesada, dentre outros (MILLS, 2007; ROSEN, 2009)

2.1.2. Perfil imunoistoquímico do epitélio mamário normal

O epitélio ductal mamário mostra variação funcional entre os lóbulos em resposta a estímulos variados, tais como o hormonal, indicando níveis diferenciais de proliferação. Essas características podem ser observadas por marcadores imunoistoquímicos, tais como receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP), Ki-67, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), HER2 e *p53* (SHAABAN, 2003).

No tecido mamário em repouso, a expressão nuclear do receptor de estrógeno α (RE α) é observada em cerca de 7% das células luminais, sendo mais frequente no epitélio acinar do que no ductal. Na fase proliferativa do ciclo menstrual, observa-se maior positividade do RE α e menor expressão na fase luteal. Ressalta-se ainda que em mulheres pré-menopausadas, as células RE α positivas não mostram expressão de marcadores de proliferação celular, como o Ki-67. As células mioepiteliais não mostram expressão do RE α , mas mostram positividade para o RE β , ambos também presentes nas células epiteliais ductais e nas células endoteliais e estromais do tecido mamário. Acredita-se ainda, que altos níveis de RE β podem estar associados à proteção contra a progressão neoplásica (SHAABAN, 2003).

O receptor de progesterona é também expresso no núcleo das células, mas ao contrário dos receptores de estrógeno, não parece variar durante o ciclo menstrual. Ocorre expressão positiva do EGFR durante a fase luteal nas células mioepiteliais e no estroma, o que pode refletir o papel desses receptores no crescimento e na diferenciação do epitélio normal em resposta aos hormônios (UEHARA, 1998).

No tecido mamário normal, observa-se rara expressão da proteína HER2 e da *p53*, mas o significado clínico desses achados ainda são incertos. Outros marcadores como a caseína, α -lactoalbumina e c-KIT mostram expressão variável

nas células epiteliais e a proteína S-100 mostra forte positividade nas células mioepiteliais e expressão variável nas células epiteliais (KRISHNAMURTHY, 2002).

2.2 HETEROGENEIDADE NO TECIDO MAMÁRIO

2.2.1 Heterogeneidade no epitélio mamário normal

O processo de organização dos tecidos epiteliais é regulado pela diferenciação das células tronco em células epiteliais, funcionais e bem diferenciadas. A mama é um órgão dinâmico e as células luminais e mioepiteliais existem em diversos estágios de maturação, expressando várias combinações de marcadores. As células basais ou progenitoras teriam a capacidade de se diferenciar em células luminais e em mioepiteliais (BÖCKER, 2002; BIRNBAUM, 2004).

Durante o processo de diferenciação, elas co-expressam a CK5 basal e as CK 8/18/19, caracterizando a linhagem epitelial- luminal (CK5 +, CK/8/18/19 +) ou da actina de musculo liso, originando a linhagem mioepitelial (CK5 +, actina de músculo liso +). Com o decorrer desse processo observa-se uma diminuição gradual das células CK5+ e um aumento das células terminais diferenciadas, ou seja, células epiteliais luminais, que expressam somente as CK8/18/19 e a linhagem mioepitelial que expressa somente a actina de músculo liso (BÖCKER, 2002; BIRNBAUM, 2004).

Assim, de acordo com a expressão desses marcadores moleculares, o tecido mamário normal consiste de cinco tipos distintos de células: tronco-basais progenitoras (CK5+); células epiteliais precursoras (CK5 +,CK/8/18/19 +) ; células mioepiteliais precursoras (CK5 +,actina de músculo liso +) ; células terminais epiteliais (CK/8/18/19 +) e células terminais mioepiteliais (actina de músculo liso +). Ressalta-se ainda que essas células ocupam espaços distintos dentro da unidade ducto-lobular, vendo-se que os lóbulos mamários estão revestidos por células terminais epiteliais e as zonas proliferativas como os ductos terminais pelas células progenitoras (CK5+) (BÖCKER, 2002; BIRNBAUM, 2004).

2.2.2 Heterogeneidade tumoral no câncer de mama

Acredita-se, que a célula tronco-progenitora, participa do processo de oncogênese mamária, e tem capacidade de proliferação ilimitada e de transformação além do controle do crescimento tumoral e metastático. Há evidências que são essas células que sofrem transformação, pois estão mais expostas a agentes cancerígenos, já que se dividem mais lentamente e tem uma vida mais longa. As células tronco-cancerígenas tem capacidade de auto renovação, de diferenciação além de ativação da telomerase e habilidade metastática (LIU, 2005).

Nas neoplasias malignas, a carcinogênese é um processo com múltiplas etapas ao nível fenotípico e genético e que resulta de múltiplas mutações. No câncer de mama, o modelo experimental de tumores de células tronco, juntamente com as mutações e as alterações epigenéticas podem contribuir para heterogeneidade celular e progressão tumoral entre diferentes pacientes (DICK,1996; LIU, 2005).

Essas células podem exibir um fenótipo positivo para CD44 e negativo para CD24 (ALL-HAJJ, 2003; HONETH, 2008; DONTU, 2008). No epitélio mamário normal, observam-se células da camada basal que são CD44+CD24- e que podem estar presentes também nos tumores basais, sugerindo-se assim que as células de origem dessas neoplasias podem ser a célula tronco-progenitora da linhagem basal (DONTU, 2008). Salienta-se, porém que essa expressão não é observada em todos os tumores basais e nem mostra correlação com a evolução clínica (ABRAHAM, 2005; DONTU, 2008).

Para o entendimento da heterogeneidade do câncer de mama, é necessário identificar a célula de origem, o tipo de alteração molecular e os genes susceptíveis. Existem possíveis correlações entre essas células e os fatores clínico-patológicos e moleculares que classificam os subtipos do câncer de mama. A tentativa de elucidar a heterogeneidade tumoral das neoplasias mamárias pode ser traduzida na classificação dos subtipos moleculares em luminais, HER2+, basal-*símile* e subtipo "mama normal". Esta classificação baseada em diversas análises moleculares tenta explicar como a heterogeneidade destes subtipos refletem as diferentes células de origem e quais são as alterações moleculares específicas de cada subtipo (BERTUCCI, 2008b).

O perfil molecular pode ser determinado pela célula de origem bem como pelo perfil das mutações, que por sua vez determina o padrão de diferenciação das células tumorais. Essas categorias definidas pelo padrão molecular podem ter implicações diagnósticas e prognósticas. A caracterização da origem e do potencial de diferenciação das células neoplásicas é primordial para o tratamento do câncer de mama. Assim o tratamento dos tumores do subtipo molecular basal-*símile* deverá ser diferente dos luminais, porém na maioria das vezes, o tratamento é eficaz na erradicação das células bem diferenciadas, enquanto que as células tronco permanecem. Assim, alvos moleculares específicos podem ser valiosos no tratamento do câncer de mama (LIU, 2005).

Os tipos celulares existentes no epitélio mamário parecem corresponder ao subtipos moleculares dos carcinomas mamários. Isso pode ser observado pelos padrões de expressão das citoqueratinas que são conservados durante a oncogênese. Os estudos moleculares, imunoistoquímicos, de cultura e purificação de células tronco clarificaram o papel das células, particularmente das progenitoras, ou basais (BÖCKER, 2002; BIRNBAUM, 2004).

O processo da oncogênese mamária pode ser explicado pelos modelos experimentais denominados aleatórios e hierárquicos que são baseados na presença das células tronco/basais. No modelo aleatório, todas as células malignas dentro do tumor, podem originar a neoplasia, porém a entrada dessas células dentro do ciclo é governada por eventos aleatórios. Assim, podem entrar no ciclo, células progenitoras ou células bem diferenciadas que vão originar respectivamente, os tumores basais e os luminais (DICK, 2003; BIRNBAUM, 2004).

Já no modelo hierárquico, os tumores são funcionalmente heterogêneos e somente um número limitado de células podem originar as neoplasias. Assim somente a célula tronco, vai dar origem as células malignas. Estas células são capazes de se diferenciar em células maduras, bem diferenciadas que dão origem aos tumores luminais ou então, devido a um bloqueio na diferenciação, dar origem a tumores imaturos, que são os basais (DICK, 2003; BIRNBAUM, 2004).

Perou et al (2000) usando microarranjos de DNA em tumores mamários, caracterizou duas classes moleculares de neoplasias, um com característica basal/mioepitelial e outro com característica luminal. Os tumores basais-*símile* demonstravam expressão gênica das CK5 e CK17 e os luminais, das CK8/18 e CK19 além dos fatores de transcrição do receptor de estrógeno. Esses autores

consideram que os tumores basais correspondem a uma mistura de células tronco, células progenitoras e mioepiteliais que podem ou não se diferenciar nas linhagens mioepiteliais ou luminais (BIRNBAUM, 2004). O gene *ERBB2* está amplificado em cerca de 20% dos tumores mamários e representam também uma subclasse, semelhante aos tumores basais (STERN, 2003).

Os mecanismos reguladores que medeiam a proliferação das células progenitoras e a diferenciação das células glandulares, explicam a heterogeneidade celular do câncer de mama. Esta é um processo progressivo que se inicia com intensa proliferação celular com bloqueio na diferenciação que caracteriza os tumores basais ou que podem progredir para tumores bem diferenciados, com fenótipos mais maduros, caracterizando os tumores luminais (BERTUCCI, 2008).

Cada etapa dessa evolução estaria associada a alterações específicas na transcrição gênica, como observado na distribuição variável dos microRNAs (miRNAs) entre os subtipos. Acredita-se também que os miRNAs estejam envolvidos na biologia das células tronco e na maturação das linhagens, participando do controle da diferenciação luminal e mioepitelial (BLENKIRON, 2007; BERTUCCI, 2008).

Observa-se que os fatores de crescimento EGFR e *ERBB2* são ativados e mantém a proliferação, impedindo também a diferenciação para as linhagens luminais. O bloqueio na diferenciação e a contínua proliferação nos tumores basais podem também ser secundários a um balanço anormal dos fatores de transcrição como o GATA3 (BIRNBAUM, 2004; BERTUCCI, 2008).

2.2.3 Heterogeneidade tumoral e alterações gênicas

As alterações genéticas observadas nas células epiteliais e mioepiteliais mamárias normais caracterizam-se como perda da heterozigosidade e alterações alélicas. O significado desses genótipos anormais ainda não está estabelecido, e podem ajudar na compreensão do papel das células progenitoras no desenvolvimento mamário e na carcinogênese (DENG,1996; LAKHANI,1999; LAARSON, 2002).

As alterações genéticas que ocorrem nas células mamárias neoplásicas contribuem para a heterogeneidade celular. As mutações, deleções, ampliações e fusões nos genes explicam a diversidade das alterações malignas no câncer de mama. Ressalta-se, porém, que alguns tumores mostram instabilidades genômicas, enquanto que outros não demonstram alterações genômicas aparentes. No grupo dos tumores de subtipo molecular basal-*simile*, que são identificados pelo alto grau e morfologia anaplásica, as instabilidades genéticas foram observadas em menor número quando comparadas com os outros grupos (CHIN, 2007; CLEATOR, 2007; BERTUCCI, 2008).

As alterações transcriptionais moleculares que traduzem a heterogeneidade morfológica e clínica no câncer de mama sugere que essa diversidade está relacionada a diferentes genes (BERTUCCI, 2000). Estudos de expressão gênica permitiram separar os tumores de mama em dois grupos em relação à resposta hormonal: receptor de estrógeno positivo e negativo, com evoluções clínicas e respostas terapêuticas distintas. Os perfis de expressão gênica parecem capazes de discriminar esses grupos, fornecendo um método mais acurado de agrupar aqueles de pior prognóstico e distinguir os grupos que vão se beneficiar da terapia adjuvante (HOCH, 1999; YANG, 1999; PEROU, 2000; BERTUCCI, 2000).

A identificação das sinalizações que controlam a células tronco no câncer de mama podem servir para o conhecimento de novas drogas. Há evidências clínicas de resistência a terapia endócrina e quimioterapia em populações tumorais de células tronco (DAVE, 2012). Esta resistência parece estar associada a uma característica das células tronco, que é a modificação de fenótipo epitelial para um mesenquimal. Esta transição envolve o aumento da capacidade de invasão e dos componentes da matriz extracelular, se relacionando também com a capacidade metastática. A identificação dessa transição fenotípica pode levar a terapias mais efetivas contra essas subpopulações que podem ser responsáveis pela recidiva tumoral (KALLURI, 2003; CREIGHTON, 2010; DAVE, 2012).

Estudos utilizando diferentes ensaios mostram que subpopulações de células tronco mostram expressão heterogênea de alguns marcadores, tais como os da família das aldeído-desidrogenase 1 e 3 (ALDH1A1 e ALDH3A3) e $\alpha 6$ integrina (GINESTIER, 2007; RESEKTOVA, 2010; MARCATO, 2011; ALI, 2011). Utilizando-se métodos imunoistoquímicos, esses marcadores mostraram diferentes padrões de expressão e de associação com fatores clínicos e moleculares, salientando-se

apenas que tiveram significância prognóstica no grupo de tumores que são receptores de estrógeno negativos (ALI, 2011).

2.3 HISTORIA NATURAL DO CANCER DE MAMA

A história natural das neoplasias malignas representa os eventos envolvidos na carcinogênese, crescimento, progressão e disseminação do tumor. A carcinogênese mamária se inicia com as alterações genéticas, representadas pela ativação de proto-oncogenes, como o HER2/*c-erbB2*/NEU, *c-myc*, *ras*, dentre outros e com a perda de bloqueio de genes supressores (MENKE, 2007; CHAGAS, 2011).

Outros fatores também contribuem para o crescimento tumoral e estão representados pelos esteróides hormonais, dentre eles, o estrógeno e a progesterona; fatores de crescimento, como o EGFR, HER2 e peptídeos. Os receptores de estrógeno e a progesterona são responsáveis pela formação e crescimento inicial do tumor, regulando genes dos fatores de crescimento e do ciclo celular (DICKSON, 1995).

Os tumores receptores positivos são geralmente bem diferenciados e as pacientes mostram melhor evolução clínica, quando comparadas com os tumores receptores negativos. Cerca de 60% dos carcinomas são receptores de estrógeno positivos, porém apenas 2/3 respondem ao tamoxifeno. O câncer de mama com receptores negativos mostra altos índices proliferativos, maior grau histológico e capacidade invasiva, além de expressão alterada de fatores de crescimento epidérmico. A expressão dos RE e RP tem valor prognóstico e preditivo para o intervalo livre de doença e sobrevida global (DICKSON, 1995).

A presença do fator de crescimento epidérmico (EGFR) no câncer de mama se correlaciona com um pior prognóstico, independente do nível dos receptores hormonais. O HER2 está envolvido no crescimento tumoral, diferenciação e prognóstico e sua superexpressão está associada à capacidade metastática e resistência a drogas quimioterápicas e anti-hormonais. A progressão tumoral se refere à capacidade invasiva e metastática e tem forte relação com a sobrevida e o prognóstico (DICKSON, 1995; MENKE, 2007).

O câncer de mama é uma doença heterogênea com distintos padrões morfológicos e evolutivos. A história natural do câncer de mama mostra que esses padrões variam de paciente para paciente. Essas variações se correlacionam com o comportamento biológico, com a capacidade metastática e de invasão local. O carcinoma mamário apresenta características clínicas e evolutivas heterogêneas que podem traduzir a diversidade biológica tumoral (BARROS, 1999; ABREU, 2002).

2.4 MARCADORES PROGNÓSTICOS MORFOLÓGICOS

Os fatores biológicos tumorais traduzem o estágio de desenvolvimento neoplásico, caracterizado pela medida do tumor; o crescimento pela atividade mitótica e a capacidade metastática pelo *status* axilar e metástase à distância (PAGE, 1994). Esses fatores são traduzidos pelo tamanho tumoral, grau e tipo histológico além do status linfonodal. Além desses, os receptores hormonais e mais recentemente, o marcador molecular, HER2 formam o grupo de fatores prognósticos e preditivos, pois continuam direcionando as decisões terapêuticas (FITZGIBBONS, 2000; SINGLETARY, 2003).

O tamanho tumoral é uma das variáveis mais significantes do câncer de mama e representa uma aproximação do volume real do tumor. Os carcinomas mamários de maior dimensão mostram sobrevida menor e uma maior relação com metástases axilares. Em estudos de sobrevida com acompanhamento de 5 anos, tumores com menos de 2,0 cm sem metástase axilar apresentam taxa de sobrevida de 96,3%, enquanto que aqueles com 5,0 cm ou mais e com comprometimento axilar, mostravam redução da taxa, com 45,5% de sobrevida (CARTER, 1989; KOSCIELNY, 2009; ROSEN, 2009).

A graduação histológica é uma estimativa da diferenciação tumoral da porção invasiva do tumor. O grau histológico é um importante fator prognóstico e está relacionado a metástases axilares e sistêmicas, a recidiva tumoral e menor intervalo livre de doença (YOSHIMOTO, 1993; ROSEN, 2009). Os sistemas de graduações mais utilizados são o Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (ELSTON, 1991; FITZGIBBONS, 2000; ROSEN, 2009) e o de Nottingham que mostram valores preditivos semelhantes.

Eles englobam o grau nuclear, o arquitetural e a contagem de mitoses. Pela soma dos escores de 1 a 3 para cada critério, o grau tumoral é categorizado em I, II e III, correspondendo à bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciados (FITZGIBBONS, 2000; CONNOLLY, 2006). Entre grupos de pacientes estratificados pelo tamanho tumoral e *status* linfonodal, os óbitos foram influenciados pelo grau, pois 90% das pacientes com grau III foram a óbito em 8 anos e as de grau I em 40 anos (DALTON, 2000).

O grau nuclear caracteriza-se pela avaliação citológica do núcleo do tumor em comparação com o núcleo da célula epitelial normal (CUTLER, 1969). Essa graduação é dividida em três categorias: bem, moderado e pouco diferenciados. Com uso da citometria de fluxo, observou-se uma relação entre o grau nuclear e a ploidia do DNA, onde tumores de baixo grau (bem diferenciados) são diplóides, enquanto que os de alto grau, são aneuplóides. (FISHER, 1991; FRIERSON, 1993).

Observa-se ainda que esses tumores diplóides tendem a ser positivos para receptores de estrógeno, enquanto que os aneuplóides são negativos, (RABER, 1982). Ressalta-se também que nos tipos especiais de carcinoma de baixo grau nuclear, como o tubular, mucinoso e papilífero, observa-se diploidia, enquanto que no medular, esses tumores são aneuplóides (COOK, 1995).

Outros ensaios demonstram também relação do conteúdo de DNA e o prognóstico. Utilizando-se o índice de timidina, observou-se também que os seus altos níveis estavam relacionados a um pior prognóstico com recidiva e sobrevida mais curta (KLINTENBERG, 1986; PARADISO, 1995). Na quantificação da fração da fase S, observa-se que altos níveis estão correlacionados com tumores pouco diferenciados e aneuplóides. Não se observa, porém, associações significantes da fração da fase S com recidiva tumoral, metástase ou comprometimento axilar. Ressalta-se ainda que tumores com alta fração da fase S tendem também a ser receptor de estrógeno negativo (RABER, 1982; MORAN, 1984).

A atividade mitótica tumoral também faz parte do sistema de graduação histológica e pode ser considerado, isoladamente, um indicador de prognóstico. Em pacientes pré-menopausadas, com axila negativa, o índice mitótico estratificado demonstrou importância prognóstica. A marcação de proliferação pela imunistoquímica do tumor representa uma medida estática da proliferação e os alvos são as células em mitose e os núcleos em prófase (JANNINK, 1995, VAN DIEST, 1992).

O marcador utilizado para avaliar a proliferação, Ki-67 é um anticorpo monoclonal específico para células em proliferação durante todo o ciclo celular, com exceções em células com uma fase S prolongada ou em tumores já submetidos a quimioterápicos. Este anticorpo mostra associação significativa com o grau histológico, observando-se maior positividade em tumores pouco diferenciados e em comedocarcinomas (ROSEN, 2009).

Observa-se ainda que tumores RE e RP negativos mostram elevada expressão do Ki-67. Diversos estudos mostram relação inversa entre a expressão deste marcador e sobrevida total e sobrevida livre de doença (VAN DIERENDONCK, 1989; DERVAN, 1992). Outros marcadores de proliferação celular como PCNA ciclina e mitosina mostram associações variáveis com fatores prognósticos, como grau, tamanho e status axilar (PINDER, 1995; CLARK, 1997).

As variações dos tipos histológicos do carcinoma mamário podem ser correlacionadas aos diferentes comportamentos biológicos e agressividade tumoral. O carcinoma ductal infiltrante (sem outra especificação) é o mais comum e também é aquele com prognóstico menos favorável em relação aos tipos especiais, com maior envolvimento linfático e um pior prognóstico (ABREU, 2002; ROSEN, 2009).

Aproximadamente 25% dos carcinomas mamários são do tipo especial e são caracterizados por padrões distintos de crescimento e de fatores citológicos. Mais recentemente, o estudo dos perfis gênicos foi utilizado nesse grupo, observando-se que eles são similares no nível transcriptômico (WEIGELT, 2008).

No grupo dos tumores RE positivos, foram descritos dois subgrupos, um com diferenciação neuroendócrina que engloba o subtipo neuroendócrino e o mucinoso e o outro subgrupo, que se caracteriza pela evolução clínica indolente e é composto pelo carcinoma lobular infiltrante clássico e o tubular. Ressalta-se que em cada grupo, observam-se também semelhanças morfológicas e de evolução clínica (WEIGELT, 2008).

No grupo dos tumores RE negativo, o carcinoma adenóide cístico, medular e o carcinoma metaplásico demonstram expressão imunoistoquímica e gênica muito semelhantes. Essas características podem estar relacionadas a um melhor prognóstico, pois o subtipo adenóide cístico mostra baixa expressão de genes associados a resposta imune e inflamação, enquanto que carcinoma medular tem baixa expressão de genes associados a proliferação e crescimento celular além de baixos níveis de fatores promotores de metástases (WEIGELT, 2008).

O carcinoma lobular infiltrante pleomórfico e o carcinoma apócrino pode ser considerado outro subgrupo, associados a pior prognóstico. Observa-se porém, que apesar da variedade dos tipos histológicos especiais e da tendência de agrupá-los, esses tipos histológicos ainda mostram menos heterogeneidade do que o carcinoma ductal infiltrante (WEIGELT, 2008).

O comprometimento linfonodal avaliado pelo estudo do esvaziamento axilar ou do linfonodo sentinela é o fator prognóstico mais importante no câncer de mama. O tamanho e a localização da metástase e o número de linfonodos comprometidos tem valor preditivo importante para sobrevida (CHAGAS, 2011). Cerca de 20 a 30% das pacientes axila-negativas vão apresentar recidiva tumoral em 10 anos, enquanto que nas pacientes axila-positivas observa-se um aumento dessa percentagem para 70% (FITZGIBBONS, 2000). O envolvimento linfonodal está associado ao tamanho tumoral, mas não mostra associação com receptores hormonais positivos e marcadores de proliferação (MENKE, 2007).

O entendimento do prognóstico no câncer de mama é complexo, pois é necessário o conhecimento dos mecanismos da heterogeneidade e da biologia tumoral. Os fatores prognósticos morfológicos ainda são essenciais no diagnóstico histopatológico do câncer de mama, porém é necessária a adição de outros fatores que podem interagir ou ter valor preditivo, para definição da evolução clínica e terapêutica (PAGE, 1994).

2.5 MARCADORES MOLECULARES DE EXPRESSÃO GÊNICA

O prognóstico dos carcinomas mamários depende primariamente da análise morfológica que combina os aspectos macroscópicos e microscópicos do tumor. Contudo, essas avaliações mostram limitações, como a subjetividade e as variações entre os observadores. Além disso, esses aspectos morfológicos podem não traduzir completamente a heterogeneidade tumoral, onde pacientes com tumores semelhantes tem evoluções clínicas distintas. O estudo imunoistoquímico surgiu como um método complementar a análise morfológica, porém não traduz as interações complexas moleculares e suas sinalizações, já que demonstra a expressão de moléculas isoladas (ELSTON, 2000).

As características morfológicas tumorais representam o produto final da interação entre diferentes classes de genes e proteínas e tipos distintos de células (REIS-FILHO, 2005). Estudos demonstram que as principais alterações de expressão gênica no câncer de mama estão relacionadas ao processo de tumorigênese e que o perfil gênico das células não tumorais presentes nas amostras podem contaminar a avaliação. Durante esse processo há uma perda da expressão de genes relacionados à adesão, comunicação e forma celular, e ganho de outros como a expressão de enzimas metabólicas responsáveis pela proliferação celular (PEROU, 1999; MARTIN, 2000).

A heterogeneidade tumoral do câncer de mama pode ser traduzida pelas variações na expressão gênica. As definições dos genes individuais bem como a identificação desses padrões de variação podem ajudar no entendimento do câncer de mama. Essa expressão pode estar associada a tipos específicos celulares que de acordo com as condições fisiológicas e patológicas traduz as variações biológicas do tumor (PEROU, 1999).

Os estudos de expressão gênica têm demonstrado diferenças nos perfis genômicos e de transcrição entre os tumores, identificando subtipos com características homogêneas. Observa-se ainda que a análise quantitativa da expressão gênica dos padrões das metástases e dos tumores primários é semelhante, sugerindo-se que o perfil tumoral está mantido no processo metastático (PEROU, 2000; LAKHANI, 2001).

Os microarranjos de DNA complementar (*c*-DNA) e a hibridização gênica comparativa são alguns dos ensaios gênicos mais utilizados. Esse último é um método que compara o número de cópias de DNA entre as amostras e pode ser usado em material parafinado. Para análise da importância biológica de cada gene, a sua expressão individual é agrupada em classes com padrões idênticos. Os microarranjos de *c*-DNA, permitem observar a expressão de milhares de genes e comparar níveis de expressão gênica em diferentes tipos de células, bem como correlacionar com os diversos fatores fenotípicos. Estes ensaios podem revelar semelhanças e diferenças que muitas vezes, não são demonstradas na caracterização morfológica e no estudo imunoistoquímico (PEROU, 2000; LAKHANI, 2001).

Tumores de mama com o mesmo tipo histológico podem variar na resposta terapêutica e nas curvas de sobrevida. Esses ensaios gênicos podem agrupar

tumores distintos em subtipos com evoluções clínicas semelhantes e identificar novos fatores prognósticos e alvos terapêuticos (BERTUCCI, 2000). Perou et al (2000) utilizando agrupamentos hierárquicos de genes classificou os carcinomas em classes moleculares, que mostram características gênicas semelhantes. Salienta-se que uma destas classes, denominada *basal-símile*, não mostra expressão gênica dos receptores de estrógeno e estão associados com fatores morfológicos de pior prognóstico.

Observa-se que a expressão de alguns genes está relacionada a tumores de melhor e pior prognóstico. A maioria dos tumores que expressam receptores de estrógeno é de melhor prognóstico e demonstra baixa proliferação e resposta a terapia hormonal. Já os tumores RE negativos mostram pior prognóstico e não respondem a terapia hormonal (BERTUCCI, 2000).

Os outros genes estão relacionados ao receptor de estrógeno está mais associada com o fenótipo da resposta hormonal do que o próprio status do RE (BERTUCCI, 2000). Esses genes representados pelo *GATA3* e *ERBB2*, dentre outros, mostram correlação com os fatores prognósticos morfológicos. O *GATA3* regula outros genes relacionados ao fenótipo RE positivo e a expressão do *ERBB2* está relacionado a pior prognóstico e resistência à terapia hormonal (ALLRED, 1998; SPENCER, 2000; BERTUCCI, 2000; SORLIE, 2001).

As assinaturas genéticas estão representadas por genes que podem ser utilizados para reunir tumores em subtipos distintos, com implicações prognósticas e preditivas. A expressão gênica pode estar relacionada ao prognóstico, separando os tumores com assinatura gênica de bom prognóstico e outros de pior prognóstico (ALLRED, 1998; SPENCER, 2000; BERTUCCI, 2000; SORLIE, 2001). Em pacientes com axila positiva, esse perfil gênico de prognóstico pode ser um importante fator preditivo para metástase à distância (VAN DE VIJVER, 2002). Outros estudos tem demonstrado a importância das assinaturas genéticas na classificação dos tumores (PEROU, 2000; SORLIE, 2001; VANT'VEER, 2002; HUANG, 2003; CHANG, 2004; WANG, 2005).

O perfil gênico pode também estar relacionado a fatores preditivos de resposta ao tratamento (NOWAK, 2004; JANSEN, 2005). Recentemente, essas informações originadas das assinaturas gênicas com valor prognóstico e preditivo podem ser traduzidas na clínica em ensaios como o Mamma-print 70- gene, oncotype DX e simple 2- gene (LEONG, 2011).

O estudo do perfil gênico dos tumores malignos da mama ainda é considerado padrão “ouro”, dentre os ensaios biológicos para determinação do prognóstico e evolução da doença. Contudo, o uso em larga escala na rotina clínica e em pesquisas ainda é limitado devido ao custo elevado além das dificuldades técnicas no uso em amostras parafinadas, já que essas ainda permanecem como o principal material biológico usado na rotina dos laboratórios de histopatologia que são responsáveis pelo diagnóstico (CHEANG, 2008; BLOWS, 2010).

2.6 MARCADORES MOLECULARES IMUNOISTOQUÍMICOS

2.6.1 Receptores hormonais

Estudos recentes mostram que a imunodeteção dos produtos proteicos dos genes relacionados ao prognóstico é viável do ponto de vista econômico e prático, utilizando anticorpos já reconhecidos. Além disso, é um método seguro e aplicado a variados tipos de amostra, tais como preparações citológicas, amostras de tecido congelado e em material fixado e em blocos de parafina. É um método de alta sensibilidade e especificidade na identificação de raras células tumorais, bem como de células ductais normais contaminantes (HARVEY, 1999; CHEANG, 2008; LEONG, 2011).

O estudo imunoistoquímico tem a vantagem de demonstrar a expressão proteica no contexto da morfologia tumoral. Presume-se que a expressão do RNA m determinada pelo perfil de expressão gênica se correlaciona diretamente com a expressão proteica semi-quantitativa determinada pela imunoistoquímica (CHEANG, 2009; BHARGAVA, 2009).

Apesar dos ensaios de imunoistoquímica não se correlacionarem tão precisamente com a biologia tumoral como os perfis de expressão gênica, ela permite caracterizar associações entre os subtipos moleculares do câncer de mama e o seu prognóstico. Na patologia mamária a avaliação imunoistoquímica tem sido usada em diferentes situações, tais como expressão de fatores preditivos e prognósticos, pesquisa de células metastáticas em linfonodo sentinela e na origem

de neoplasias metastáticas e no diagnóstico diferencial em lesões mamárias (MUNJAL, 2009).

No câncer de mama a expressão imunoistoquímica nuclear dos receptores hormonais é observada nas células luminais dos ductos e acenos (DICKSON, 1985). A quantificação da expressão dos receptores tem relação direta com a resposta terapêutica. Tumores que expressam escores de 1% ou mais mostram significativo benefício com a terapêutica adjuvante (EIFEL, 2000; BADVE, 2009; DAABS, 2012).

A expressão dos receptores hormonais nos carcinomas mamários permanece ainda como o padrão definitivo para determinação da terapia hormonal. Inicialmente os métodos bioquímicos eram os mais utilizados, porém a exigência de material fresco, não fixado e o maior tempo de realização dificultavam a sua execução (ALVES, 1999; NOFECH-MOZES, 2012).

Posteriormente, esse método foi substituído pelo estudo imunoistoquímico, com diversas vantagens, já que este pode ser realizado em pequenas amostras fixadas e parafinadas além de se correlacionar com a histologia, já que permite determinar o sítio específico dos receptores nas células tumorais bem como a expressão no tecido mamário normal adjacente a neoplasia (ALVES, 1999).

O principal propósito da avaliação da expressão dos receptores hormonais é definir o benefício clínico de um dado tratamento no grupo das pacientes com câncer de mama. Para isso, o entendimento da funcionalidade dos receptores é essencial, já que no estudo imunoistoquímico é caracterizado apenas a presença dos receptores, não se avaliando, por exemplo, as proteínas que participam da sinalização desses receptores (ALVES, 1999).

Diante disso, surgiu mais recentemente, ensaios para avaliação da expressão gênica, como o *Oncotype DX* e *Mama pint*. que utilizam RT-PCR e microarranjos. Esses ensaios, porém, avaliam apenas a expressão do RNAm dos receptores hormonais, não caracterizando os aspectos funcionais. O surgimento de ensaios utilizando microarranjos podem explicar quais os mecanismos envolvidos na resistência a terapia endócrina no grupo de tumores RE/RP positivos (LEONG, 2011).

Os clones dos anticorpos mais utilizados na rotina diária são o 1D5, 6F11, SP1 para o RE e o 1A6 e o 312 para o RP. Esses clones são escolhidos por métodos de validação clínica que mostram correlação com a evolução e resposta terapêutica. O escore imunoistoquímico é determinado por dois parâmetros: a

percentagem de núcleos corados das células neoplásicas e a intensidade da coloração (HAMMOND, 2010; NOFECH-MOZES, 2012).

O Colégio Americano de Patologistas (CAP) e a Sociedade Americana de Oncologistas Clínicos (ASCO-*American Oncite off Clinica Oncology*) consideram como expressão positiva dos receptores, a percentagem mínima de 1% de células tumorais coradas e como expressão negativa menos de 1% das células. A intensidade da coloração deverá ser relatada como fraca, moderada e forte, usando como parâmetro, o controle interno positivo (HAMMOND, 2010; NOFECH-MOZES, 2012).

Estes dois parâmetros podem ser categorizados em escores que correspondem à percentagem de células coradas e a intensidade da coloração e que posteriormente são somados ou multiplicados, contabilizando o escore final. No critério de quantificação de Sannino e Shousha, os resultados são obtidos mediante um escore de cinco pontuações que vão do negativo até positivo com quatro cruces (++++). No escore de Allred, o escore total varia de zero (negativo) a oito, sendo considerados positivos, o escores \geq a 3 (SANNINO; SHOUSHA, 1994; ALLRED, 1998).

Esses escores compostos, porém não são recomendados pelo CAP e pela ASCO, já que por serem calculados de formas diferentes podem levar a má interpretação dos resultados. O uso dos escores simples e dos combinados, podem ter valor prognóstico e preditivo de resposta à terapia hormonal, bem como mostram associações com a sobrevida e a recidiva tumoral (FISHER, 2005; CHEANG, 2006; HAMMOND, 2010; NOFECH-MOZES, 2012).

Alguns estudos que utilizam a quantificação dos receptores se refere somente a expressão do receptor de estrógeno na associação com os outros fatores preditivos no carcinoma mamário (SCHMITT, 1992; ANDERSON, 2002; DIAZ, 2005). Porém, salienta-se que a expressão do receptor de progesterona é dependente da atividade do RE e a sua positividade na avaliação imunoistoquímica aumenta a resposta da terapia adjuvante para cerca de 80% (ARIAZI, 2002). Observa-se ainda que os tumores que são RE positivos e RP negativos (RE + e RP -) respondem menos a terapia do que aqueles que são duplos positivos (RE + e RP+) (KUUKASJARVI, 1997).

Tem se demonstrado a relevância clínica dos receptores pela imunoistoquímica além da correlação com a evolução do câncer de mama

(STIERER, 1995; HARVEY, 1999). Os dois grandes grupos do carcinoma mamário mostram diferenças em relação a fatores de risco e de prognóstico. Há uma associação positiva com a idade, observando-se que cerca de 80% das pacientes com idade acima de 50 anos são receptores positivos. Em relação ao *status* menopausal, o tumor estrógeno negativo está relacionado com a doença na premenopausa, enquanto que o receptor positivo na pós-menopausa (CLARK, 1984; ANDERSON, 2002; NADJI, 2005; PAYNE, 2008).

Os tumores receptores positivos mostram associação com fatores de bom prognóstico como tamanho tumoral menor ou igual a 2,0 cm, linfonodos negativos e baixo grau histológico. Já os negativos com fatores de pior prognóstico como tumor maior que 2,0 cm, linfonodos positivos e alto grau histológico. Em relação aos tipos histológicos especiais, o carcinoma tubular, colóide e lobular mostram expressão positiva, enquanto que o medular, metaplásico e apócrino são negativos (ANDERSON, 2002; NADJI, 2005; GOWN, 2008; NADJI, 2008).

Em pacientes com recidiva tumoral, a sobrevida foi mais curta no grupo RE negativo. Observa-se ainda que em pacientes axila -positiva a recidiva também foi maior no grupo de receptor negativo. Em relação á mortalidade, a positividade dos receptores confere baixo risco de mortalidade, porém sem associação com fatores como grau, tamanho tumoral e tipo histológico (KINNIE, 1981; DUNNWARD, 2007).

O controle hormonal exerce importante papel no desenvolvimento do câncer de mama. Assim, a expressão dos receptores hormonais pode predizer quais pacientes tem bom prognóstico e podem se beneficiar da terapia anti-hormonal. A expressão imunoistoquímica dos receptores de estrógeno e progesterona é um importante determinante na escolha da terapia adjuvante. Esses receptores funcionam melhor como fatores preditivos do que como fatores prognósticos no câncer de mama (HENRY, 2006).

Os tumores receptores positivos podem ser responsivos a terapia anti-estrogênica, enquanto que os negativos são insensíveis. O tamoxifeno se liga ao RE α e inibe o crescimento nas células tumorais, o que reduz de forma significativa a recidiva tumoral e prolonga a sobrevida nos pacientes com carcinoma invasivo da mama (DAABS, 2012). Nos tumores metastáticos observa-se redução da recorrência tumoral em cerca de 40% a 50% nos pacientes com receptores positivos enquanto que os negativos não mostram benefício com o tamoxifeno (HENRY, 2006).

Aproximadamente 75 a 80% dos cânceres de mama demonstram expressão nuclear do receptor de estrogênio, porém apenas 1/3 desses tumores respondem ao tamoxifeno (DAABS, 2012). A eficácia da terapia hormonal pode depender da ação de fatores de transcrição como o FOXA1, GATA-3 e fatores de crescimento, como o HER2 e EGFR (BADVE, 2009).

Verifica-se ainda que os receptores hormonais mostram complexas relações com outros biomarcadores, tais como o EGFR e o Ki-67, cuja expressão pode ser observada em tumores receptores positivos (CLARKE, 1997). Observa-se também relação inversa entre a expressão do EGFR e dos receptores hormonais (DEFAZIO, 2000). Em relação ao marcador de proliferação, Ki-67, observa-se que a sua co-expressão pode ser observada em tumores receptores positivos (CLARKE, 1997; DIAZ, 2005).

2.6.2 Proteína HER2

O proto-oncogene *HER2/neu (C-erbB-2)* codifica o receptor do fator de crescimento epidérmico da família da tirosina-quinase. Essa proteína funciona como receptor celular e nas células neoplásicas malignas atua como fator de crescimento, na proliferação, diferenciação e na mobilidade e adesão celular (DICKSON, 1995; PINTO, 2001; BACCHI, 2001). Na patogênese do câncer de mama, as alterações na expressão desse proto-oncogene tem efeito comprovado. Sugere-se um papel no desenvolvimento e progressão, observando-se que a sua superexpressão é maior no carcinoma *in situ* do que no carcinoma invasivo (DE POTTER, 1989; ALLRED, 1992; SCHMITT, 1995).

Observa-se que depois da amplificação do proto-oncogene, o fenótipo HER2 é mantido durante toda a história natural do câncer invasivo, já que é observado no tumor primário e nas metástases (BURSTEIN, 2005). Verifica-se ainda que a associação entre aneuploidia e o HER2 é maior nos carcinomas intraductais do que nos invasivos, demonstrando que não há uma relação linear entre o conteúdo de DNA e a progressão neoplásica (SCHMITT, 1995).

Cerca de 10 a 30% dos carcinomas ductais invasivos de alto grau, mostram superexpressão do HER2, sendo rara, porém nos tipos histológicos especiais, tais

como no lobular, tubular, mucinoso, cribiforme e papilífero (SLAMON, 1987; GUSTERSON, 1992; BACCHI, 2001; LAL, 2005; GOBBI, 2008). Ressalta-se ainda que alguns carcinomas apócrinos mostram positividade para o HER2. Observa-se, porém, que os tumores invasivos que mostram áreas de diferenciação apócrina não mostram essa superexpressão (BHARGAVA, 2009).

A expressão da proteína HER2 nos carcinomas mamários tem valor prognóstico e preditivo. Verifica-se que o carcinoma mamário HER2 positivo tem pior prognóstico do que os negativos, observando-se que a sua superexpressão está diretamente relacionada ao aumento do tamanho tumoral, principalmente ao $pT3$ (RILKE, 1991; HOFF, 2002).

Em relação ao *status* axilar, os resultados são discordantes, não se observando diferenças na sobrevida entre as pacientes que são HER2 + com axila positiva ou negativa (GULLICK, 1991). Outros estudos mostram que em pacientes axila-positiva, a positividade do HER2 pode estar associada a diminuição do tempo de sobrevida e do tempo livre de doença. Já nas pacientes axila-negativa a superexpressão pode contribuir como um marcador de alto risco nesse grupo de pacientes. (DYKINS, 1991; PATERSON, 1991; GUSTERSON, 1992). As metástases à distância para fígado e pulmões são mais comuns nos tumores positivos para HER2 do que naqueles que são receptores positivos e HER2 negativo (DABBS, 2012).

No câncer de mama, a importância da superexpressão do HER2 como fator preditivo é maior do que como fator prognóstico. O status do HER2 é um fator preditivo de resposta a diferentes tratamentos. Há uma relativa sensibilidade ou resistência a vários tipos de tratamento, tais, como terapia endócrina, quimioterapia, radioterapia e o trastuzumabe (DABBS, 2012).

O anticorpo humanizado, trastuzumabe é um tipo de terapia dirigida ao receptor HER2 das células tumorais, observando-se diminuição da progressão da doença e aumento da sobrevida. É amplamente usado em câncer de mama metastático e em pacientes com câncer de mama inicial (PAYNE, 2008; DAABS, 2012).

Tumores positivos para HER2 mostram resistência a terapia pelo tamoxifeno. No grupo de pacientes RE positivos, a superexpressão do HER2 confere um fenótipo independente do tratamento hormonal a esses pacientes. Esses tumores

podem ser resistentes aos agentes alquilantes, porém se beneficiam com a terapia com antraciclinas e taxane (YAMAUCHI, 2001).

Os tumores positivos podem ser refratários ao tratamento devido a presença do HER2, já que esse se liga aos receptores hormonais e impede a ação do tamoxifeno. O HER2 pode ativar o receptor de estrógeno pela fosforilação direta do receptor de estrógeno, de maneira independente. Isso tem sido demonstrado pela associação inversa entre o HER2 e os receptores em cultura de células, onde a introdução de cópias do HER-2/*neu* leva a uma redução da ligação com o estrógeno e redução da transcrição gênica (PIETRAS, 1995; KONECNY, 2003; DIAZ, 2005). Outro determinante da ausência de resposta está relacionado ao polimorfismo nos genes que codificam as enzimas que metabolizam as drogas anti-estrogênicas (NADJI, 2008).

Além da associação inversa entre a expressão do HER2 e os receptores hormonais, observa-se que alguns tumores positivos mostram co-expressão das duas moléculas. Estudos mostram que esses tumores RE e HER2 positivos podem estar associados à resistência ao tamoxifeno. Nesse grupo a falha no tratamento pode estar relacionada à expressão reduzida dos receptores, já que esse são o principal alvo da terapia (DEFAZIO, 2000; PINTO, 2001; ARIAZZI, 2002; KONECNY, 2003; DIAZ, 2005). Outros estudos mostram, porém resultados discordantes (ELLEDGE, 1998; BERRY, 2000).

Há vários métodos disponíveis para a detecção do HER2, com avaliação da sua amplificação e superexpressão. Os ensaios de *Northern*, *Southern* e *Western blot* são confiáveis, porém são de custo elevado e necessitam de amostras teciduais á fresco. Em amostras teciduais parafinadas, os métodos mais utilizados são o estudo imunoistoquímico, a hibridização por fluorescência ou a cromogênica *in situ* denominadas FISH e CISH, respectivamente (BACHI, 2001; DABBS, 2012).

O Colégio Americano de Patologistas (CAP) e a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO-American Society of Clinical Oncology) recomendam a determinação do status do HER2 em todos os carcinomas infiltrantes da mama, principalmente após o benefício terapêutico do trastuzumabe. Em laboratórios de histopatologia, o estudo imunoistoquímico em material emblocado em parafina tem sido o método mais usado para determinar a superexpressão da proteína do HER2/*neu* (BACHI, 2001; WOLFF, 2007; GOBBI, 2008).

Alguns procedimentos técnicos podem interferir na qualidade do exame, tais como tempo de fixação e os clones dos anticorpos. Recomenda-se que a amostra de tecido tumoral seja fixada em formol tamponado a 10% por um período de 6 a 48 horas. Os clones dos anticorpos monoclonais e policlonais CB11, 4D5, TAB250 e 4B5 são os mais usados. Posteriormente, o *kit* imunoistoquímico do Herceptest tem sido usado na rotina laboratorial, porém observam-se mais resultados falso-positivos quando comparados com os anticorpos monoclonais (BACHI, 2001; GOBBI, 2008).

A avaliação imunoistoquímica é determinada por um escore que vai do zero até 3 +, baseado na proporção e na intensidade da coloração da membrana. Essa coloração deverá ser circunferencial, com um padrão reconhecido como “tela de galinheiro”. No escore zero (0) a 1 +, considerado categoria negativo, não se observa coloração ou observa-se coloração fraca e incompleta (1+) da membrana em qualquer percentagem das células. Na categoria indeterminado que corresponde ao escore 2 +, observa-se coloração homogênea, forte e completa da membrana em $\leq 30\%$ das células ou, coloração fraca ou moderada e heterogênea em pelo menos 10% das células. Nos casos positivos, com escore 3 +, observa-se coloração forte e completa da membrana em $>$ de 30% das células (BACHI, 2001; GOBBI, 2008; WOLFF, 2007; PAYNE, 2008).

A hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) é uma técnica mais precisa para a avaliação quantitativa do oncogene *HER2/neu*, com o uso de sondas de DNA marcada com fluoresceína e pode ser usada em cortes histológicos e em preparados citológicos (BACHI, 2001). A associação entre os escores negativos e positivos na imunoistoquímica com a amplificação gênica pelo FISH é alta, sendo observada em 80 a 90% dos casos. Porém, existem relatos de discordância em cerca de 4% a 20% de casos entre a imunoistoquímica e o FISH. Isso pode estar relacionado a falhas na fixação do tecido além da escolha do tipo de anticorpo usado (PRESS, 1994; ROCHE, 2002; PEREZ, 2006; GOWN, 2008).

Nos tumores HER2 com escore 2 +, considerados como indeterminados, a utilização do FISH é importante para determinar realmente a amplificação do gene. Esse escore é observado em cerca de 25% dos tumores infiltrantes da mama. Observa-se que grande parte desses tumores não mostram amplificação pelo FISH. Acredita-se que esses tumores com escore 2 + sejam biologicamente distintos do escore 3 +, e podem estar associados com a polissomia do cromossomo 17 com

consequente aumento dos genes HER2 (BOSE, 2001; PEREZ, 2002; DABBS, 2012).

A hibridização *in situ* (FISH) é um método diagnóstico mais caro, com maior tempo de elaboração, e não é exame de rotina nos laboratórios de histopatologia. Por sua vez, o estudo imunoistoquímico é mais barato e mais rápido, e já está bem estabelecido na rotina diária. Porém, a imunoistoquímica ainda demonstra problemas com a padronização e com caracterização de tumores que expressam HER2 e não mostram amplificação gênica (BACHI, 2001; PAYNE, 2008; GOWN, 2008).

Diante dessas limitações, o uso da hibridização *in situ* cromogênica (CISH) tem sido implementado. Esse método usa reação de imunoistoquímica, similar a peroxidase e permite a análise das cópias gênicas e da morfologia tumoral. É mais rápida e mais barata do que a técnica do FISH (GOBBI, 2008; PAYNE, 2008).

Na avaliação do HER2 e dos receptores hormonais, a imunoistoquímica e a hibridização por fluorescência *in situ* (FISH) ainda são métodos mais utilizados e que substituem os estudos de expressão gênica, mais caros e que exigem mais tempo para realização. Porém faz-se necessário desenvolver outros marcadores moleculares que possam caracterizar a homogeneidade dentre os subgrupos tumorais, bem como aumentar a especificidade do tratamento do câncer de mama (PAYNE, 2008).

2.6.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

Mais recentemente, a proteína do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é outro marcador que vem sendo utilizado no painel imunoistoquímico. Esta proteína mostra similaridades estruturais e funcionais com o HER2 e tem localização transmembrânica e pertence a família da tirosina quinase (DICKSON, 1995).

Durante o desenvolvimento fetal, o EGFR regula a proliferação de múltiplos tecidos, tais como a pele, pulmão, fígado, dentre outros. É também produzido pela glândula materna mamária, regulando a proliferação dos tecidos fetais. No epitélio mamário normal, o EGFR tem importante papel na diferenciação e crescimento durante o ciclo menstrual (DICKSON, 1995; ROSEN, 2009).

Um dos métodos mais utilizados para quantificação do EGFR tem sido o ensaio bioquímico com ligantes (NICHOLSON, 1988; SAINSBURY, 1988; NICHOLSON, 1991). Este método, porém, necessita de mais tempo para realização além de amostra de tecido tumoral á fresco. Na rotina diária, o estudo imunoistoquímico mostra mais vantagens em relação á este método, já que utiliza material parafinado e permite detectar a heterogeneidade intratumoral da expressão do EGFR (GASPARINI, 1992).

Na avaliação imunoistoquímica do EGFR observa-se diversos padrões de quantificação, baseados na intensidade e na extensão da coloração. Alguns trabalhos usam a quantificação semelhante a do HER2, que vai da categoria negativa (escore zero e 1+) até o escore 3+, onde se observa coloração forte ou moderada em mais de 30% das células (BACHI, 2001; GOBBI, 2008; WOLFF, 2007; SASSEN, 2007; PAYNE, 2008; MILLANEZZI, 2008).

Outros estudos usam escores semelhantes, porém com percentagens menores de 10 a 20% de células coradas (CALLAGY, 2003; RAKHA, 2006; KIM, 2006; DABBS, 2006; LERMA, 2007; BERTOLLO, 2008; CHO, 2008; SHIN, 2008). Vê-se ainda, que alguns autores consideram como escore positivo, qualquer intensidade de coloração membranar ou citoplasmática (NIELSEN, 2004; CAREY, 2006; YANG, 2007; TISCHKOWITZ, 2007; CHEANG, 2008; DAWOOD, 2011). Em grande parte dos trabalhos usando microarranjos de tecido, o escore histoquímico modificado (H-score) é utilizado (ABD EL REHIM, 2005; PUTTI, 2005).

A expressão imunoistoquímica do EGFR é observada em cerca de 10% a 30% dos carcinomas mamários, porém na amplificação gênica, esta percentagem se reduz para menos de 10% (RO, 1998; AL KURAYA, 2004; BHARGHAVA, 2005). Observa-se que em tumores metaplásicos a superexpressão do EGFR está associada a amplificação gênica em 1/3 dos casos, sugerindo-se que esses pacientes podem se beneficiar com a terapia anti-EGFR. Ressalta-se também, que nesses tumores metaplásicos observa-se perda da expressão do HER2 (REIS-FILHO, 2005; LEIBL, 2005; MILLANEZZI, 2008).

Em tipos histológicos especiais como o metaplásico e medular, a expressão do EGFR pode explicar a manutenção do fenótipo basal/mioepitelial desses tumores, já que esse marcador é expresso nesta camada de células (REIS-FILHO, 2005; JACQUEMIER, 2005; MILLANEZZI, 2008).

No processo de carcinogênese mamária podem ocorrer alterações genéticas que interferem na cinética do receptor, com ligação da quinase a outro tipo de substrato. Nos tumores mamários a superexpressão do EGFR está relacionada a proliferação celular, invasão tecidual, angiogênese e a inibição da apoptose (CHRYSOGELOS, 1994a).

A superexpressão do EGFR está relacionada a carcinomas mamários de pior prognóstico, independente do *status* dos receptores hormonais. Observa-se que altos níveis de EGFR estão relacionadas à ausência ou a baixos níveis do receptor de estrógeno (RE). Essa relação inversa pode ser explicada porque nos tumores RE negativos, observa-se aumento da transcrição de elementos localizados no intron do gene do EGFR. Já nos tumores RE positivos, a presença do estrógeno ativa mecanismos que suprimem a expressão do EFGR (SAINSBURY, 1985; NICHOLSON, 1991; KLIJN, 1992; CHRYSOGELOS, 1994a; DICKSON, 1995; YARDEN, 2001).

Observa-se ainda que alguns tumores EGFR + /RE - e EGFR + /RE + não respondem a terapia hormonal (NICHOLSON, 1988). Nos tumores EGFR + /RE + esta falha no tratamento pode estar relacionada a defeitos no mecanismo de ação do receptor, que impede a ação hormonal (FITZPATRICK, 1984; CHRYSOGELOS, 1994b). Esses tumores mostram sobrevida semelhante a aqueles que expressam somente o EGFR, sugerindo-se que esse marcador confere realmente um potencial de crescimento aos tumores (NICHOLSON, 1991).

O valor prognóstico e preditivo do EGFR ainda é controverso. As diferenças entre os estudos podem ser explicadas pelo uso de diferentes ensaios para determinação do receptor, bem como o perfil dos pacientes e o tempo de observação. Alguns estudos não mostram associação significativa com o *status* linfonodal, grau e tamanho tumoral (PEKONEN, 1988; FOEKENS, 1989; SPYRATOS, 1990; KOENDERS, 1991; BHARGAVA, 2005).

Outros estudos mostram associação entre a positividade do EGFR e alto grau histológico. Tem sido observado que a superexpressão do EGFR está relacionado a um pior prognóstico, como a recidiva tumoral e óbito em pacientes com tumores operáveis. Tumores com baixa fração de crescimento e EGFR negativo mostram prognóstico melhor, com baixo risco de recidiva (SAINSBURY, 1985; NICHOLSON, 1988; NICHOLSON, 1991; GASPARINI, 1992).

No grupo de pacientes axila-negativa, o EGFR pode ser um forte marcador de pior prognóstico, caracterizando assim um subgrupo que pode se beneficiar com a terapia sistêmica. Em qualquer tipo histológico, seja o ductal infiltrante ou os especiais, a positividade do EGFR está relacionada à pior prognóstico (SAINSBURY, 1985; NICHOLSON, 1988; NICHOLSON, 1991; KLIJN, 1992). Tumores com superexpressão de EGFR e com recidiva tumoral não respondem a terapia hormonal e a quimioterapia para o câncer de mama (TSUTSUI, 2002).

2.6.4 Citoqueratinas

As citoqueratinas (CKs) são proteínas dos filamentos intermediários codificadas pelo gene *KRT* localizado no braço do cromossoma 12q e 17q. Essas proteínas caracterizam o tipo, o crescimento e diferenciação, bem como o *status* funcional das células epiteliais. São identificados vinte tipos diferentes que são numeradas de 1 a 20. As CK de 9 a 20 são denominadas de tipo I e as de 1 a 8 do tipo II (BIRNBAUM, 2004; ABD EL-REHIM, 2004; SHAO, 2012).

O perfil da expressão das citoqueratinas é usado na diferenciação entre os subtipos moleculares, na detecção de micrometástases em linfonodos sentinelas ou em metástases a distância e também como marcador de prognóstico. Observa-se que na rotina diária, a expressão imunoistoquímica das citoqueratinas é usada na forma de painel e não isoladamente (RAKHA, 2010; SHAO, 2012).

O perfil imunoistoquímico do tecido mamário normal, mostra que as células luminais maduras expressam as citoqueratinas 7,8,18 e 19, enquanto que as células basais/mioepiteliais expressam as CK 5,14 e 17. Durante o processo de carcinogênese, esse perfil original das citoqueratinas nas células neoplásicas é mantido, refletindo assim a heterogeneidade tumoral (BIRNBAUM, 2004; NIELSEN, 2004; ABD EL-REHIM,2005; MATOS, 2005; RAICA, 2009; MORIYA, 2010; SHAO, 2012).

Observou-se nessas duas linhagens celulares, expressão de genes distintos. As células basais expressam genes que incluem a citoqueratina 5, citoqueratina 17 a integrina $\beta 4$ e laminina e as células luminais expressam genes dos receptores de

estrógeno, incluindo a CK19, e receptor de progesterona, dentre outros (PEROU, 2000).

Porém, a determinação da classificação dos subtipos baseada na localização das citoqueratinas foi considerada incorreta, pois se observou que as CK5, CK14 e CK17 mostravam expressão heterogênea em células luminais dentro dos lóbulos e nas unidades ducto terminal enquanto que não se observou em células mioepiteliais (GUSTERSON, 2005).

Na totalidade dos carcinomas mamários a expressão das citoqueratinas caracterizadas como luminais (CK8, CK18 e CK19) são mais frequentes do que as citoqueratinas basais (CK5/6, CK14 e CK17). Como a frequência das luminais é maior, esse grupo também é denominado de citoqueratinas de alta expressão, enquanto que os basais de baixa expressão. Observa-se também que há uma correlação negativa entre os dois grupos de citoqueratinas (SHAO, 2012).

Em relação aos tipos histológicos, as CK 5/6 e CK14 foram observadas em cerca de 10% dos tipos especiais e não especiais. O tipo especial medular e metaplásico foram os que mais expressaram as CK5/6 (TOT, 2000; TAN, 2005; SHAO, 2012) Essas citoqueratinas podem ser úteis na diferenciação entre lesões hiperplásicas típicas e atípicas, observando-se positividade das CK5/6 e CK14 nas hiperplasias floridas (MORIYA, 2009; SHAO, 2012).

Utilizando o agrupamento hierárquico de genes, observa-se que um dos grupos não expressa os genes do RE, mas expressam as citoqueratinas 5,17, caracterizam o subtipo molecular basal-*simile*. Esta diversidade tumoral determinada pelos padrões de expressão gênica demonstram que há associação entre os subtipos e o prognóstico (SORLIE, 2001; ABD EL-REHIM, 2005).

Os tumores com subtipo basal-*simile* estão relacionados a fatores de pior prognóstico, como grau histológico maior e metástases a distância. Assim neste subtipo a expressão de citoqueratinas 5/6, 14,17, bem como a do EGFR, e da p63 pode estar associada à evolução clínica mais agressiva (SORLIE, 2003; RAKHA, 2007a).

As citoqueratinas luminais 7, 8,18 e 19 mostram correlações com a expressão positiva dos receptores hormonais e HER2 e com as expressões negativas de EGFR, p63 e Ki-67 (SHAO, 2012). Em amostras exíguas de carcinomas mamários, esse grupo de citoqueratinas permite a identificação de escassos agrupamentos de células tumorais. É o que se observa no uso da CK19 na identificação de

micrometástases em linfonodo sentinela e na combinação das CK7 e CK8 em neoplasias de alto grau (ALVARENGA, 2011; TSUJIMOTO, 2007).

Essas citoqueratinas luminais são também observadas nos carcinomas basais, dentre elas, a CK8 e 18 que mostra frequência de até 100% (DABBS, 2012; LAVASANI, 2012). Assim, alguns grupos de tumores com co-expressão das citoqueratinas basais e luminais, foram denominados como de fenótipo basal-*símile* e luminal combinados. Esse fenótipo bimodal está associado a tumores pouco diferenciados, metastáticos e com sobrevida curta (MALZAHN, 1998; ABD EL-REHIM, 2004).

Para caracterização das citoqueratinas no tecido mamário tumoral, tem sido utilizado ensaios com citometria de fluxo, eletroforese além de estudos de expressão gênica como microarranjos de cDNA e análise de hibridização genômica comparativa (O' HARE, 1991; PECHOUX, 1999; PEROU, 2000; JONES, 2004). Na rotina diagnóstica, o estudo imunoistoquímico permanece ainda como um método preferencial na determinação da expressão das citoqueratinas.

Em relação aos escores de expressão imunoistoquímica, observa-se variabilidade de determinação, com escores em que a positividade é considerada como qualquer coloração citoplasmática (KORSCHING, 2002; ABD EL-REHIM, 2004; NIELSEN, 2004). Outros autores consideram escores positivos em 5%, 10% ou 20% de células coradas (MALZAHN, 1998; OTTERBACH, 2000; LAAKSO, 2005).

2.6.5 Proteína p63

A proteína *p63* é codificada por um gene localizado no cromossoma 3q27,132,133 e mostra similaridade sequencial e estrutural com a *p53*. Devido a esta homologia considerou-se que a *p63* poderia também funcionar como supressora tumoral (WESTFALL, 2004).

A expressão imunoistoquímica da *p63* nos tecidos normais é restrita à camada basal dos epitélios estratificados e tem importante papel na manutenção das células tronco dos queratinócitos, bem como na embriogênese e na diferenciação epitelial, mantendo o potencial proliferativo das células basais (PARSA, 1999; YANG, 1999).

Em linhagens celulares neoplásicas e em tecido tumoral, não se observaram mutações desta proteína, verificando-se, porém, desregulação da sua expressão, algumas vezes, correlacionada com amplificação da região genômica 3q27-28 (PARK, 2000; MASSION, 2003).

A expressão imunohistoquímica positiva da *p63* é observada no núcleo das células mioepiteliais do tecido mamário normal, bem como em vários tipos de tumores mioepiteliais e no carcinoma metaplásico da mama. Além disto, a expressão positiva desta proteína tem um importante papel na diferenciação entre os carcinomas *in situ* e invasivos da mama (BARBARESCHI, 2001; REIS-FILHO, 2002).

Outro papel da proteína *p63* nos carcinomas mamários está relacionado à distinção dos fenótipos basais. Observou-se que em alguns tumores mamários a associação desta proteína com as CK5 e as CK14 estavam relacionadas à alto grau histológico, tumores de maior dimensão, metástase linfonodal e receptor de estrógeno negativo (RIBEIRO-SILVA, 2003; REIS-FILHO, 2003).

Observou-se dentre as séries de tumores estudados, uma variação da positividade da expressão desta proteína, com 4% até 55% de positividade nas amostras estudadas (RIBEIRO-SILVA, 2003; LAASKO, 2005; MATOS, 2005). Neste último trabalho, observou-se ainda que a maioria dos tumores classificados como luminais eram negativos para *p63*, P-caderina e CK5.

2.7 SUBTIPOS MOLECULARES DO CARCINOMA INFILTRANTE DA MAMA

2.7.1 Subtipos moleculares e expressão gênica

O estudo imunohistoquímico pode caracterizar os diversos fenótipos moleculares do carcinoma mamário, porém a determinação da heterogeneidade tumoral ainda permanece desafiadora. Observa-se que tumores mamários com a mesma classificação histológica podem ter variação no comportamento biológico e apresentar aspectos moleculares distintos (PEROU, 2000).

Os carcinomas mamários mostram grande variação nos padrões de expressão gênica e isso pode refletir na diversidade dos tipos celulares. Esses padrões tem uma ordem universal, pois refletem relações entre os genes, relações entre os tumores e conexões entre os genes específicos e os tumores malignos (PEROU, 2000).

Além dessa diversidade molecular não se correlacionar com as características morfológicas, os tumores apresentam também diferentes prognósticos e resposta ao tratamento. Na tentativa de interpretar as características biológicas tumorais, a utilização de marcadores moleculares isolados ou combinados podem categorizar melhor esses grupos distintos de pacientes (PEROU, 1999).

As ferramentas genômicas com o estudo do DNA, RNA e do perfil das proteínas podem decifrar os padrões moleculares e fenotípicos envolvidos na diversidade tumoral, com a obtenção de marcadores específicos. A identificação dos padrões de expressão gênica permite caracterizar o perfil de transcrição das proteínas que estão relacionadas aos diversos fenótipos tumorais (PEROU, 1999; PEROU, 2000).

Esses padrões de expressão gênica podem estar associados com as características biológicas tumorais, tais como proliferação celular e tipos específicos celulares. Observa-se que nas populações tumorais, o reconhecimento dos tipos celulares pode ser realizado pela expressão gênica específica ou pelos marcadores imunoistoquímicos, que podem demonstrar o produto gênico (PEROU, 1999; PEROU, 2000).

A semelhança entre os padrões de expressão gênica podem agrupar tumores com diferentes padrões morfológicos e fenotípicos e representam a base da classificação molecular. A estratificação dos tumores mamários em subtipos moleculares pode ajudar na caracterização dos grupos de risco bem como na orientação das alternativas terapêuticas (PEROU, 1999; PEROU, 2000).

A estabilidade, homogeneidade e uniformidade desses retratos moleculares são avaliadas pela análise quantitativa dos padrões de expressão gênica. A introdução de métodos como os microarranjos de cDNA e de oligonucleotídeos, permitem a análise simultânea de milhares de genes, porém essa técnica só pode ser aplicada a um número limitado de amostras, o que dificulta a sua realização na rotina diária (KONONEN, 1998; LAKHANI, 2001; CALLAGY, 2003).

Recentemente, foram desenvolvidos os microarranjos de tecido ou *tissue microarrays* (TMA) em amostras tumorais, permitindo a avaliação dos perfis gênicos em grandes números de casos, bem como a correlação com dados clínico-patológicos e de evolução da doença, viabilizando dessa forma, a validação dessa classificação molecular (KONONEN,1998; CALLAGY, 2003).

Observa-se que pacientes com características clínicas e patológicas semelhantes podem evoluir de forma diferente, sugerindo-se que outros fatores moleculares podem determinar a evolução da doença. Dessa forma, a caracterização desses aspectos moleculares pelos perfis de expressão gênica podem agrupar os tumores em diferentes classes moleculares (REIS-FILHO, 2005)

Nessa tentativa para determinar os retratos moleculares dos carcinomas mamários, Perou et al.(2000) utilizaram microarranjos de cDNA em 42 amostras de tumores malignos e benignos da mama, com métodos de agrupamento hierárquico, onde os genes são selecionados segundo a semelhança de seus padrões de expressão gênica. Neste trabalho selecionaram-se 496 genes, denominados intrínsecos, ou seja, são genes similares em qualquer amostra de um mesmo tumor, mais que variam entre diferentes tumores.

De acordo com a expressão desses genes e com a semelhança com o padrão histológico normal da mama, os tumores foram agrupados em classes moleculares. Primeiramente, na ramificação principal os tumores foram divididos em dois grupos: aqueles que expressavam genes dos receptores de estrógeno (RE) e aqueles que eram negativos (PEROU, 2000; SOTIRIOU, 2003).

No grupamento dos tumores RE positivos (RE +) que expressavam diversos genes, observou-se também alta expressão de genes expressos pelas células luminais, sendo assim designados como tumores do subtipo molecular luminal. Posteriormente, a expressão proteica das citoqueratinas luminais 8/18 foi confirmada pelo estudo imunoistoquímico (PEROU , 2000).

Nos tumores RE negativos (RE -), ou seja, que não expressam genes dos receptores de estrógeno observou-se, porém, alta expressão de genes característicos de células basais, como as citoqueratinas 5/6, integrina $\beta 4$ e laminina, sendo assim designados tumores do subtipo basal-*símile*, que foram confirmados pela expressão imunoistoquímica das CK 5/6 e 17. Neste grupo dos tumores RE negativos, observaram-se ainda neoplasias que mostram

superexpressão do oncogene *Erb-B2*, sendo caracterizados como subtipo HER2 + (PEROU; et al., 2000).

Neste estudo ainda foi caracterizado um último subtipo, denominado subtipo “mama normal” (“*breast-like*”), que mostra expressão de genes característicos de células basais e de células adiposas além de baixa expressão de genes das células luminais epiteliais (PEROU; et al., 2000).

Nesta classificação molecular, observa-se que a expressão do receptor de estrógeno tem um importante papel na diferenciação dos subtipos, já que é fundamental na definição do fenótipo tumoral, durante a carcinogênese. Os tumores RE negativos identificados como *basal-símile*, foram ainda subdivididos em *basal-símile 1* e *basal-símile 2*, de acordo com a expressão diferencial de genes na oncogênese mamária. Os dois subgrupos, porém mostram elevada expressão de oncogenes como o *c-KIT*, *c-myc* e *SFRP1*. Esse último oncogene está relacionado a perda do RE e a presença de intensa reação inflamatória em tumores mais agressivos (SOTIRIOU, 2003).

Mesmo diante da heterogeneidade tumoral, observada nos carcinomas mamários, o perfil de expressão gênica mostra associação significativa com os fatores histopatológicos clássicos. É o que se observa nos tumores que expressam os receptores de estrógeno e mostram baixa proliferação, melhor diferenciação e resposta à terapia hormonal. Porém, o *status* hormonal não é determinado apenas pelo gene do RE, mas também pela expressão do RNAm do GATA 3 que regula outros genes que são mais importantes e determinantes do fenótipo do RE +. O conhecimento da ação destes outros genes pode auxiliar na obtenção de outros alvos terapêuticos (BERTUCCI, 2000).

As células neoplásicas que mostram expressão gênica do RE parecem se originar de células especializadas que necessitam naturalmente do estrógeno para o seu crescimento ou que de forma aberrante usa os hormônios para o seu crescimento. Já as células que não expressam esses receptores (RE -) parecem derivar de células mamárias que usam mecanismos de crescimento que são independentes da resposta hormonal (MARTIN, 2000).

Nota-se que o *status* do receptor de estrógeno (RE) está associado a diversas alterações gênicas, que se traduzem nos dois grandes grupos de tumores: RE + e RE -. Nestes tumores vários genes estão associados ao *status* do receptor, tais como a citoqueratina 19, CD59, *p53*, maspina e elafina, dentre outros. Estes genes

podem estar relacionados à funcionalidade do receptor, o que tem importância fundamental no tratamento com tamoxifeno, pois cerca de 40% das pacientes que são RE + não respondem a terapêutica (MARTIN, 2000).

Posteriormente, em trabalhos semelhantes, Sorlie et al., (2001; 2003) ratificou a importância da classificação nos subtipos. Esses autores demonstraram ainda que os tumores luminais poderiam ser subdivididos em três subtipos: luminal A, luminal B e Luminal C. No primeiro, além da elevada expressão dos genes dos receptores de estrogênio (RE α), observou-se também, expressão da proteína de ligação GATA3, da proteína X-box de ligação 1, dentre outros.

O subtipo luminal B, por sua vez, demonstrou menor expressão daqueles genes relacionados ao RE e maior expressão de genes relacionados à proliferação quando comparados ao luminal A (SOUTIROU, 2009; REIS FILHO, 2011). Porém, acredita-se que a expressão destes genes nestes subtipos forma um *continuum*, observando-se que a determinação dos níveis de expressão são arbitrários (DESMEDT, 2008).

Baseados nestes achados observaram-se limitações do estudo gênico na determinação dos subtipos luminal A e luminal B. Observou-se que nas análises de agrupamento hierárquico a divisão entre estes subtipos era subjetiva, já entre os carcinomas de subtipo basal-*símile* e o HER2 + era estável (PUSTZAI, 2006; MACKAY, 2011).

Observou-se ainda que 8% a 11% dos tumores com subtipo luminal A e 15% a 24% com subtipo luminal B, determinados pela expressão gênica, podem mostrar superexpressão do HER2 no estudo imunoistoquímico (PARKER, 2009; NIELSEN, 2010; PRAT, 2010). Diante disso, em 2011 na Conferência Internacional de Câncer de Mama de St Gallen, foi incluído no painel imunoistoquímico, a determinação do Ki-67 para a diferenciação daqueles subtipos luminal A e luminal B que são HER2 negativos. Salientou-se que este painel é uma tentativa de aproximação da classificação dos subtipos definido pela expressão gênica (GOLDHIRSCH, 2011; GEYER, 2012; ALESKANDARANY, 2012).

O subtipo luminal B e o luminal C foram caracterizados pela expressão baixa a moderada de genes luminais e de genes dos RE, salientando-se, porém que o luminal C mostra ainda outros grupos de genes cuja função ainda é desconhecida, característica que faz com que esse subtipo se assemelhe aos subtipos basal-*símile* e ao HER2 + (SORLIE et al., 2001; VANT'VEER, 2002; SORLIE et al., 2003).

As assinaturas genéticas caracterizadas por grupos de genes com implicações prognósticas e preditivas podem auxiliar nessa classificação molecular. Inicialmente, foi utilizado um tipo de assinatura gênica, denominada assinatura de 70 genes em tumores de pacientes com axila negativa observando-se dois grupos: os de bom prognóstico, sem recidiva da doença e o outro de pior prognóstico, com recidiva em cinco anos (VAN'T VEER, 2002). Posteriormente, essa mesma assinatura foi aplicada em pacientes com axila positiva e em pacientes com axila negativa, observando-se que a assinatura prognóstica foi um forte preditor de metástase à distância em pacientes com axila positiva (VAN DE VIJVER, 2002).

Mais recentemente, Sorlie et al. (2006), utilizando assinaturas gênicas em câncer de mama inicial, caracterizou os diferentes mecanismos moleculares e biológicos que ocorrem nos subtipos luminal A e basal-*símile*. No luminal A, observou-se expressão dos genes relacionados a sinalização do estrogênio e ao metabolismo de ácidos gordurosos enquanto que no basal-*símile*, genes relacionados ao ciclo celular, proliferação e diferenciação celular. Salienta-se assim que esses mecanismos moleculares distintos podem ser pré-programado nos estágios iniciais da carcinogênese nos diferentes subtipos.

Outra assinatura gênica utilizando 186 genes de invasão, observou que cerca de 89% da expressão destes genes era observada tanto nas células tronco como nas amostras de tumores basais, demonstrando que esses tumores são ricos em células tronco o que pode explicar o pior prognóstico (BERTUCCI, 2007; LIU, 2007).

Assim, os subtipos moleculares são distintos do ponto de vista biológico e clínico, salientando-se que essas diferenças são mais evidentes quando se compara os subtipos luminais e basal-*símile*. Estas diferenças podem estar relacionadas aos padrões de expressão gênica das células luminais e basais do epitélio mamário normal, bem como a predisposição genética de alguns tumores. Assim, observa-se que pacientes com mutações do *BRCA1* mostram tumores com expressão gênica do basal-*simile*. (SORLIE et al., 2001, VANT'VEER, 2002; SORLIE et al., 2003).

Em relação às características clínicas, os subtipos moleculares mostram diferenças significantes. Os subtipos luminal A e o subtipo "mama normal" tendem a ser genomicamente mais estáveis do que os outros subtipos. Ocorrem mais frequentemente em mulheres pós-menopausadas e tendem a ser tumores de pequeno tamanho. Uma boa parte dos subtipos HER2 + demonstram aneuploidia e tendem a ser tumores maiores e de maior grau, enquanto que o luminal B mostra

padrão semelhante, porém em escala menor, observando-se apenas uma pequena proporção de tumores aneuplóides. Os tumores basais tendem a ser de alto grau e mostram maior instabilidade genômica (CALZA, 2006).

Observa-se ainda que essas diferenças genômicas e clínicas entre os subtipos vão traduzir diferentes respostas no prognóstico e na resposta a terapia. O subtipo basal-*símile* está associado a metástases axilares e à distância e a estágios clínicos avançados, enquanto que os subtipos luminais estão associados a um melhor prognóstico (SORLIE et al., 2001; VANT'VEER, 2002; SORLIE et al., 2003; SOUTIROU, 2003; FAN, 2006).

Em outra casuística o subtipo HER2 +, independente da terapia utilizada foi que demonstrou pior sobrevida livre de doença, observando-se que superexpressão do HER2 tem sido associada a tumores mais agressivos e resistência a terapia endócrina. Quando se compara o subtipo luminal A e B, observa-se que o último tem pior prognóstico e mostra resistência a terapia, que pode estar relacionado a grau histológico maior e a mutações do *p53*. (SORLIE et al., 2001; CALZA, 2006).

A maioria dos estudos de perfil de expressão gênica utilizam os microarranjos de cDNA ou de tecidos, para caracterização do perfil molecular das neoplasias mamárias, auxiliando na validação de marcadores tumorais proteicos bem como se correlacionando com a terapêutica. Contudo, esses ensaios ainda permanecem inatingíveis para a maioria dos pacientes e não se traduzem para rotina clínica (BERTUCCI, 2006a).

Mais recentemente, em uma ampla revisão, Lavasani (2012) relatou alguns problemas metodológicos nos trabalhos de Perou e colaboradores (2000) e Sorlie e colaboradores (2001; 2003). Nestes trabalhos, a utilização de linhagens celulares heterogêneas com amostra de referência deveria ser substituída por amostras somente de tecido mamário normal ou neoplásicas, o que é mais apropriado em métodos de comparação (LAVASANI, 2012).

O número reduzido de amostras estudadas nestes trabalhos revelou-se também outro problema, já que o tamanho amostral tem importância fundamental nos estudos de microarranjos gênicos. Assim, observou-se que são necessários milhares de amostras para produzir uma lista de genes que tenham valor preditivo na evolução das pacientes com câncer de mama (LAVASANI, 2012).

Porém, independente da técnica utilizada, o perfil molecular permanece ainda como um importante aliado na caracterização biológica dos tumores de mama. O

estudo das proteínas tumorais permite a identificação de marcadores de evolução da doença, bem como a identificação de alvos terapêuticos (BERTUCCI, 2006a).

Observa-se, porém, que nem sempre os níveis de RNAm correspondem as alterações na expressão proteica. Essa expressão depende não só da quantidade e da relação entre transcrição e translação, como também da degradação e transporte das proteínas. O estudo imunoistoquímico, permite determinar a expressão e a localização celular das proteínas, cuja transcrição foi discriminada em estudos prévios de expressão gênica (BERTUCCI, 2006a; KIM, 2006; CAREY, 2006; CHEANG, 2009).

2.7.2 Subtipos moleculares e a expressão imunoistoquímica

2.7.2.1 Classificação imunoistoquímica

O estudo imunoistoquímico no material anatomo-patológico pode ser utilizado no perfil fenotípico dos carcinomas mamários, determinando a expressão proteica dos receptores hormonais e dos diversos marcadores tumorais. Isto pode ser reproduzido na rotina da patologia cirúrgica para categorização dos tumores em grupos com expressões fenotípicas semelhantes (VIEIRA, 2008; KIM, 2006; CAREY, 2006; BERTOLO, 2008; IRIGOYEN, 2011).

O estudo imunoistoquímico permite categorizar grupos distintos de pacientes em subtipos moleculares que demonstram características biológicas e evolutivas semelhantes. Observa-se correlação positiva entre o perfil de expressão gênica e a expressão imunoistoquímica nos carcinomas mamários (CAREY, 2006). Nielsen et al. (2004), em um grupo de tumores basais com expressão gênica dos marcadores basais pelos microarranjos de DNA, demonstrou correlação com a imunoistoquímica com cerca de 76% de sensibilidade e 100% de especificidade.

Inicialmente, a classificação dos subtipos moleculares pelo estudo imunoistoquímico, foi baseado na expressão dessas CK basais e luminais sendo os tumores categorizados em fenótipos luminal; basal; basal e luminal combinados e o fenótipo nulo. Observou-se que os tumores com fenótipo basal-*símile* e basal/luminal

combinado estavam associados com maior grau, maior tamanho, receptor de estrógeno (RE) negativo, recidiva tumoral, metástase à distância e óbito. Já os marcadores luminais estavam associados com fatores de bom prognóstico, sobrevida mais prolongada e positividade do RE (ABD-EL-REHIM, 2004).

Posteriormente, outros marcadores imunoistoquímicos, foram adicionados a classificação molecular, tais como o HER2; EGFR; a p63; p-caderina; c-KIT, dentre outros. Nielsen e colaboradores (2004) utilizando a expressão imunoistoquímica do RE e do HER2 além destes outros marcadores, classificaram os subtipos em luminal, HER2 +, basal-símile e negativo. No subtipo luminal, observou-se expressão positiva do receptor de estrógeno (RE) e negativa para o HER2, independente da expressão dos marcadores basais (CK 5/6) e o EGFR.

Nos tumores que expressavam HER2 e que eram positivos ou negativos para o RE e para os marcadores basais, foram considerados como subtipo HER2 (+). O subtipo basal-*símile* foi considerado como aquele que eram negativos para o RE e para o HER2, mas positivos para as CK5/6 e/ou para o EGFR. O subtipo “mama normal”, não apresentava expressão para nenhum dos marcadores citados acima. Salienta-se que este subtipo pode incluir outros, já que a sua negatividade pode estar relacionada a baixa expressão dos marcadores ou a problemas relacionados a sensibilidade da técnica diagnóstica (NIELSEN, 2004).

Posteriormente, o subtipo luminal foi dividido de acordo com a expressão do HER2 em luminal A, que se caracteriza pelo RE + e o HER2 - e luminal B, que é RE+ / HER2 + . Além disto, os tumores que eram RE - /HER2 + e que podiam expressar ou não os marcadores basais, foram denominados de basal-*símile*-superexpressão de HER2, que correspondem ao subtipo HER2 + , referidos em outros trabalhos. Já os tumores de subtipo basal-*símile*, eram negativos para o RE e HER2, ou positivos para qualquer um dos marcadores CK5 , p63 ou p-caderina (MATOS, 2005).

Em 2008, Cheang e colaboradores utilizando esse mesmo painel de marcadores imunoistoquímicos, enfatizaram o papel dos marcadores basais, EGFR e as CK5/6, caracterizando os tumores do subtipo basal-*símile* por meio de duas classificações: a do triplo-negativo e a do método dos cinco marcadores. Pelo esquema do triplo-negativo, os tumores basais eram considerados, como aqueles que eram negativos para os receptores hormonais e a proteína HER2.

Na classificação pelo método dos cinco marcadores, os tumores que eram triplo-negativos, mas positivos para pelo menos um dos marcadores basais, eram classificados como core-basal e aqueles que eram negativos para todos os cinco marcadores foram classificados como de fenótipo “cinco marcadores negativos”. Salientou-se ainda que este último fenótipo pela classificação do triplo-negativo foi considerado também como do basal-símile (CHEANG, 2008). Considerando ainda qualquer que fosse a expressão imunoistoquímica destes marcadores basais, estes autores denominaram o subtipo luminal A como luminal linha (‘), o luminal B como luminal/HER2 + e o subtipo HER2 + como HER2 + /RE - / RP - .

Em outros estudos de classificação dos subtipos moleculares, o subtipo “mama normal” foi caracterizado no perfil imunoistoquímico pela ausência dos receptores hormonais, e da proteína HER2, bem como dos marcadores basais, CK5/6 e EGFR. Este subtipo tem recebido várias denominações, tais como: subtipo “nulo”, “não classificado” e subtipo com “fenótipo negativo para os cinco marcadores” (SORLIE, 2003; NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; CHEANG, 2006; YANG, 2007; BERTOLO, 2008; SHIN, 2008; CHEANG, 2008; AWALDEKARIM, 2008; RAICA, 2009; YU, 2009).

Contudo, baseado na expressão gênica observou-se que este subtipo “mama normal” não poderia ser usado como sinônimo do subtipo nulo, pois além da expressão de genes do tecido adiposo, observou-se forte expressão de genes basais, tais como o gene das CK5 e do EGFR (SORLIE, 2003; YU, 2009).

A negatividade dos marcadores imunoistoquímicos neste subtipo “mama normal” pode estar relacionado à heterogeneidade tumoral, onde as amostras diagnósticas podem mostrar áreas aleatórias sem expressão dos marcadores ao lado de outras áreas com expressão positiva (SHIN, 2008). Outra possibilidade é que a expressão negativa poderia estar relacionado a problemas técnicos como a sensibilidade e especificidade dos anticorpos usados na classificação dos subtipos (NIELSEN, 2004).

Em estudo mais recente, utilizando-se microarranjos não se observou a presença deste subtipo, considerando-se a possibilidade de contaminação das células neoplásicas pelo tecido adiposo ou conjuntivo (WEIGELT, 2010a). Apesar da forte expressão de genes basais, tais como da CK5 no subtipo “mama normal”, estes tumores não demonstraram características morfológicas do subtipo basal-símile, tais, como a formação de maciços (SORLIE, 2003). Porém em outros

estudos, o subtipo “mama normal” foi caracterizado como carcinoma ductal infiltrante pouco ou moderadamente diferenciados (RAICA, 2009; ZAHA, 2010).

Alguns autores demonstraram que este subtipo estava associado a um bom prognóstico, com maior sobrevida (SORLIE, 2001; CAREY, 2006; CHEANG, 2008; DAWOOD, 2011). Em outro estudo, porém, observou-se que o subtipo “mama normal” estaria associado a uma pior sobrevida e a uma resposta ruim a quimioterapia adjuvante (CHOI, 2010).

Além dos subtipos moleculares já caracterizados anteriormente, foi identificado mais um, denominado *claudina-low*. Estes tumores foram identificados pela baixa expressão de genes das proteínas envolvidas nas junções e na adesão celular denominada claudina 3,4 e 7 além da E-caderina (HERSCHKOWITZ, 2010).

Quando comparado aos outros subtipos, os tumores *claudina-low* mostram baixa expressão de marcadores luminais, como os dos receptores hormonais, citoqueratinas (CKs) 8/18, baixa expressão de HER2 e expressão inconsistente de CKs basais. Devido a este perfil de expressão gênica, este subtipo se assemelha ao *basal-símile*. Por outro lado, observou-se expressão elevada de genes envolvidos na resposta imune, na comunicação celular, na migração e diferenciação celular e na angiogênese (PRAT, 2010).

As células tumorais no subtipo *claudina-low* demonstram um fenótipo da transição epitélio-mesênquima e de células tronco e que determinam resistência terapêutica. Estes tumores são negativos para os receptores hormonais e para a proteína HER2, além de mostrarem características de carcinoma medular ou metaplásico, com intenso infiltrado linfocitário. Estes tumores mostram pior sobrevida e maior recorrência tumoral quando comparados ao luminal A (PRAT, 2010; LU, 2013).

2.7.2.2 Marcadores imunoistoquímicos nos subtipos moleculares

O perfil de expressão gênica e o estudo imunoistoquímico utilizados na classificação dos subtipos do câncer de mama, ainda são métodos que necessitam de uniformidade. Devido a isto, os subtipos moleculares deverão ser determinados

por perfis de expressão gênica apropriada ou por um painel imunoistoquímico completo (KAUFMANN, 2011).

Porém, o alto custo e a complexidade dos ensaios gênicos têm limitado o seu uso na classificação dos subtipos, o que levou a utilização do estudo imunoistoquímico como método substituto. Alguns trabalhos mostraram variados graus de concordância entre estes dois métodos. Dentre os luminais, com a adição do *Ki-67*, observou-se cerca de 73% a 100% , enquanto que no subtipo HER2 + , esta percentagem caiu para 31% a 59% (PARKER,2009; PRAT, 2010). Nos tumores de subtipo basal-*símile*, observou-se uma concordância de cerca de 80%, porém 1% a 3 % mostravam expressão imunoistoquímica positiva para o receptor de estrógeno (PEROU, 2000; SORLIE, 2001; SORLIE, 2003).

Uma grande parte dos marcadores imunoistoquímicos podem definir melhor as características clínicas dos subtipos do que a expressão gênica, sendo utilizadas na rotina clínica. Alguns autores tem utilizado a expressão imunoistoquímica como substituto para expressão gênica na classificação dos subtipos moleculares (NIELSEN, 2004; CAREY, 2006; LERMA, 2007; YANG, 2007; WEBSTER, 2007; NGUYEN, 2008; CHEANG, 2008; ADEBAMOWO, 2008; AWALDELKARIM, 2008; DEL CASAR, 2008; BHARGAVA, 2009; SPITALE, 2009; BLOWS, 2010).

Os subtipos moleculares caracterizados como luminal A, luminal B, HER2 + basal-símile e subtipo “mama normal” demonstram distintos padrões de expressão imunoistoquímica em relação aos receptores hormonais, citoqueratinas e o HER2 +. No trabalho inicial do grupo de Stanford, a expressão imunoistoquímica das citoqueratinas 8/18 e das citoqueratinas 5/6 e 17 foram utilizadas para caracterizar os tumores luminais e os basais, respectivamente (PEROU, 2000).

A expressão da CK basais CK5 e CK17 está associada a uma pior evolução clínica e a CK14 mostra correlação negativa com o *status* linfonodal. Apesar disso nas pacientes axila-negativa, o papel das citoqueratinas ainda permanece indeterminado (MALZAHN, 1998; VAN DE RIJN, 2002; SHAO, 2012).

A expressão das citoqueratinas basais é mais frequente nos subtipos basais do que nos outros carcinomas em geral. As CK5/6 estão presentes em cerca de 60% a 87% dos carcinomas com fenótipos basais, enquanto que nos outros subtipos, somente em 17% dos casos (DABBS, 2012; SHAO, 2012). Embora já estejam estabelecidas correlações entre a origem das células neoplásicas no câncer de mama e a heterogeneidade tumoral, ainda não há um consenso na definição dos

tipos histológicos que realmente expressam as CK5, 14 e 17 (GUSTERSON, 2005; BERTUCCI, 2012; LAVASANI, 2012).

A terminologia “citoqueratinas do tipo basal” é controversa, pois na maioria das vezes, está relacionada à expressão nas células basais do epitélio mamário, mas podem ser expressas em uma subpopulação de células luminais. É o que pode ser observado nos tumores com subtipos luminais A e B, onde pode haver expressão de citoqueratinas (CK) basais em tumores que podem ou não expressar as CK luminais (WETZELS, 1991; ABD EL-REHIM, 2004; NIELSEN, 2004; MATOS, 2005).

A terminologia “citoqueratinas do tipo luminais” também é motivo de controvérsia, pois se observou expressão destas CK não somente em tumores com o subtipo basal-*símile* mas também nos outros subtipos, considerando-se assim que as CK8/18 podem não ser um marcador luminal específico (ABD EL-REHIM, 2004; NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; KIM, 2006).

Ainda em alguns estudos citogenéticos e de análise comparativa genômica, genes com assinatura basal foram observados no subtipo “mama normal” do câncer de mama, que tem sido descrito na maioria dos estudos como negativo para expressão de células de ambos os tipos, basal e luminal. (PEROU, 2000; SORLIE, 2001). Ressalta-se ainda que não só a expressão das citoqueratinas basais pode caracterizar o fenótipo basal-símile, mas também a negatividade dos receptores e do HER2, bem como o EGFR positivo e a expressão de c-KIT (NIELSEN, 2004). Em alguns tumores do subtipo HER2+ foram observadas expressão positiva do EGFR e das CK luminais, 8/18 (MATOS, 2005; RAICA, 2009).

Na maioria das classificações, a expressão imunoistoquímica do HER2 juntamente com o receptor de estrógeno (RE) tem sido utilizada como divisor principal dos subtipos moleculares (NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; KIM, 2006). De acordo com o perfil de expressão gênica e da expressão imunoistoquímica dos receptores hormonais, o carcinoma mamário pode ser separado em dois grupos distintos: tumores RE positivo e RE negativo. A expressão positiva do RE está associada com fatores patológicos de bom prognóstico, como baixo grau, ausência de necrose e de infiltrado linfocitário. Já os tumores negativos são pouco diferenciados e mais invasivos (DICKSON, 1985; SCHMITT, 1992; PEROU, 2000; BADVE, 2009).

Estes tumores que são receptores de estrógeno (RE) negativos estão também correlacionados com sobrevida curta e recidiva tumoral. Observa-se que os tumores RE negativos são heterogêneos, pois se observam tumores pouco diferenciados, porém com prognósticos distintos. É o que se verifica nos carcinomas mamários de tipos histológicos especiais que são RE negativos e demonstram bom prognóstico (PUTTI, 2005).

Na classificação molecular dos subtipos moleculares dos carcinomas mamários, a expressão do receptor de progesterona (RP) foi sendo adicionada de forma paulatina (KUSINSKA, 2005; CAREY, 2006; TISCHKOWITZ, 2007; WEBSTER, 2008; BERTOLO, 2008). Os tumores mamários que são RE e RP negativos (duplo negativos) estão associados a maior agressividade e pior prognóstico, semelhantes aos tumores que são RE negativos. Quando se compara os tumores que são RE positivo e RP negativo aos tumores que são duplo positivos (RE e RP positivos) observa-se que a negatividade do RP pode estar relacionada a uma evolução ruim com sobrevida curta e recidiva tumoral (RAKHA, 2007a).

Propõe-se ainda que durante a progressão do câncer de mama, o EGFR pode estar relacionado com a independência dos tumores em relação ao receptor de estrógeno, pois se observa uma progressão do fenótipo hormônio dependente (RE +/EGFR-) para um fenótipo mais agressivo (RE -/EGFR +). Neste grupo de tumores mais agressivos (RE -/EGFR +), o crescimento tumoral está relacionado ao peptídeo hormonal EGF, já que esses tumores não respondem aos hormônios esteroides como o estrógeno (FITZPATRICK, 1984; CHRYSOGELOS, 1994b).

Observa-se também que o grupo de tumores RE positivos são heterogêneos, sendo necessário separar tumores de baixo grau dos tumores de alto grau e proliferativos. Uma parte desses tem melhor prognóstico, pois mostram maiores intervalos livres de doença e sobrevida prolongada em relação aos negativos. Porém, os tumores que expressam também o HER2, estão relacionados a fatores de pior prognóstico, como recidiva tumoral e menor sobrevida. Isso pode ser explicado pela correlação entre a expressão do HER2 e altos índices de proliferação, caracterizados por uma maior fração de fase S (BORG, 1990; CARLOMAGNO, 1996; NEWBY, 1997; SJOGREN, 1998; PINTO, 2001).

A superexpressão do HER2 está correlacionada a fatores de pior prognóstico, tais como, maior grau histológico, maior tamanho tumoral, aneuploidia, alto índice de proliferação celular e receptores negativos (GUSTERSON, 1992; KESHGEGIAN,

1997; FITZGIBBONS, 2000; BACCHI, 2001; PINTO, 2001; LAL, 2005; GOBBI, 2008). Observou-se que a expressão do HER2 está concentrada nos carcinomas ductais infiltrantes de grau II e III, sendo associados a tumores mais agressivos e de pior prognóstico. Já nos carcinomas do tipo especial, que na maioria das vezes, são HER2 negativo, o grau é mais baixo, e por isso são de melhor prognóstico (LAL, 2005).

A associação do HER2 com a aneuploidia, sugere que sua presença confere um maior poder proliferativo a células tumorais, porém a atividade proliferativa dos tumores HER2 é variável. Os tumores positivos mostram índices do Ki-67 de 25% a 50%, maiores do que aqueles que são HER2 - e RE +, porém menores do que aqueles que são triplo- negativos (DABBS, 2012).

A co-expressão do EGFR e do HER2 em carcinomas mamários pode estar relacionada a maior agressividade e pior prognóstico. Nesse subgrupo de tumores, essa sinergia pode ter implicações terapêuticas, com o uso de inibidores duplos como o lapatinibe (HARRIS, 1989; HARARI, 2001; MOTOYAMA, 2002; TSUTSUI, 2003; DIERMEIER, 2005; MILLANEZZI, 2008). Observa-se ainda que a expressão positiva do EGFR somada a das citoqueratinas 5/6 nos tumores triplos negativos está associada a um pior prognóstico (CHEANG, 2008).

A classificação dos carcinomas mamários em subtipos moleculares, traduzem o perfil gênico e imunoistoquímico dos marcadores tumorais, bem como as associações entre eles. Assim, tumores que são receptores de estrógeno negativos estão associados a positividade do HER2, caracterizando a maioria dos tumores como subtipo HER2 +. Outros tumores RE negativos podem estar associados a positividade do EGFR e da p63, sendo classificados como basais (FITZPATRICK, 1984; FITZGIBBONS, 2000; BACCHI, 2001; PINTO, 2001; LAL, 2005).

O subtipo basal-*simile* já caracterizado pelo perfil gênico e imunoistoquímico das CK5/6, pode ser identificado também pela adição de outros marcadores basais, tais como o EGFR e a p63. (NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; KIM, 2006; TISCHKOWITZ, 2007; SHIN, 2008). O EGFR tem relevante papel na determinação do fenótipo do subtipo basal-*símile* desde que acrescido à expressão positiva das citoqueratinas 5/6 (NIELSEN, 2004; CHEANG, 2008). Os carcinomas mamários com fenótipo basal-*símile* são na realidade, triplo-negativos, ou seja, RE -, RP - e HER2 -, e mostram positividade para o EGFR além das citoqueratinas 5/6, 14 e 17, estando

associados com um pior prognóstico (NIELSEN, 2004; LIVASY, 2006; CHEANG, 2008).

Além do painel imunoistoquímico bem estabelecido para caracterização dos tumores basais representados pela CK5/6, EGFR e a p63, alguns autores utilizaram também a proteína S-100, actina de músculo liso, vimentina e a CK14. A expressão positiva da proteína S-100 e da actina de músculo liso nos tumores com subtipo basal-*símile*, permitiu a identificação de duas variantes basais: puro e mioepitelial. Os subtipos basais mioepiteliais expressam estas duas proteínas e estão relacionados a necrose tumoral e expressão da vimentina. Já o subtipo basal-símile puro está associado à sobrevida curta e recidiva tumoral (BERTUCCI, 2006b; LERMA, 2007).

Na última conferência de St Gallen em 2011, foi recomendado na classificação dos subtipos moleculares do carcinoma mamário, a determinação do receptor de estrógeno, do receptor de progesterona, da proteína HER2 e do Ki-67. Contudo, a utilização dos ensaios para as CK5/6 e o EGFR, não foram recomendados para determinação dos tumores com subtipo basal-*símile* nas decisões clínicas (GOLDHIRSCH, 2011; GUIU, 2012).

Além de todos estes marcadores imunoistoquímicos já implantados na rotina diária, novas moléculas têm sido investigadas. Mais recentemente, observaram-se associações entre os subtipos e moléculas associadas à expressão imune, tais como CD20, IL-8, IFN- γ e STAT1 (CHOI, 2012). Foi observada expressão diferenciada destes anticorpos dentre os subtipos moleculares, com expressão elevada do STAT1 em pacientes com tumores do subtipo luminal A e B e da CD20 e a IL-8 nos pacientes triplo -negativo (CHOI, 2012). Observou-se ainda expressão diferencial e significativa da proteína CXCR4 entre os subtipos, com uma maior positividade nos pacientes com subtipo basal-*símile* e menor no subtipo luminal A (ZHANG, 2012).

2.7.2.3 Características clínicas e patológicas nos subtipos moleculares

Na classificação molecular dos subtipos dos carcinomas mamários observaram-se na maioria dos estudos, uma frequência elevada dos subtipos

luminais e menor dos subtipos basal-símile e triplo -negativos (PEROU, 2000; SORLIE, 2003; NIELSEN, 2004; CAREY, 2006; YANG, 2007; CHEANG, 2008; DEL CASAR, 2008; MORIYA, 2010). Apesar disso, o enfoque maior em relação a caracterização clínica e patológica têm sido com os tumores com subtipos basal-símile, triplo-negativo e HER2 que estão relacionados a fatores de pior prognóstico e decisões terapêuticas mais elaboradas (NIELSEN, 2004; CAREY, 2006; AWALDEKARIM, 2008).

Os tumores de subtipo luminal A mostram maior prevalência no grupo de pacientes pós-menopausadas, o que não se observa nos tumores do subtipo basal-símile e nos tumores do subtipo HER2 +, que mostram maior frequência entre pacientes mais jovens (YANG, 2007; CHEANG, 2008; SPITALE, 2009; NGUYEN, 2008; DELCASAR, 2008; YANG, 2010).

Em relação à história reprodutiva e menstrual observou-se que os tumores luminais estão mais associados com os fatores de risco como a nuliparidade e a idade avançada na primeira gestação e idade precoce na menarca do que os tumores basais. Esta associação pode ser explicada pelos níveis do estrógeno nos tumores luminais e suas relações com o período menstrual bem como com a diferenciação celular (YANG, 2007; 2011).

A raça parece ser outro diferencial entre os subtipos moleculares, observando-se que o subtipo basal-símile está relacionado a pacientes jovens com ascendência afro-americana. Este subtipo quando comparados ao subtipo HER2 + parecem definir mais o grupo dos tumores de pacientes jovens, afro-americanas e com receptores hormonais negativos. Estes tumores exibem elevado grau nuclear e histológico, alta capacidade proliferativa e mutações do *TP53* (GUSTERSON, 1992; CAREY, 2006; YANG, 2007; AWALDEKARIM, 2008).

Na população africana, observou-se uma grande percentagem de pacientes com receptores negativos, o que poderia ser explicada pelas dificuldades técnicas e econômicas na realização da imunohistoquímica (ADEBAMOWO, 2000; IKPATT, 2002; GUKAS, 2005). Posteriormente, observou-se que o perfil hormonal desta população africana tornou-se mais próximo de outras populações não africanas, com uma maior percentagem de tumores receptores positivos, identificando-se também semelhança na frequência dos subtipos do carcinoma mamário (ADEBAMOWO, 2008).

Observou-se ainda, que os tumores do subtipo HER2 + e basal-*simile* eram os mais frequentes em pacientes africanas nativas e tinham um pior prognóstico quando comparadas às pacientes europeias. Isto pode estar relacionado a características biológicas relacionadas a etnia, bem como a genética, pois os carcinomas hereditários relacionados ao *BRCA1* mostraram também maior frequência neste grupo (AWALDEKARIM, 2008).

Verificou-se ainda que o subtipo HER2 + era mais frequente nas populações chinesas e asiáticas quando comparadas com as mulheres afro-americanas ou com ancestrais europeus (SU, 2011). Em outra comparação entre a população japonesa e a caucasiana, observaram-se também semelhanças na frequência e nas taxas de sobrevida dentre os subtipos. As pacientes com tumores de subtipo basal-*simile* mostraram menor taxa de sobrevida quando comparados aos outros subtipos, enquanto que o luminal A demonstrou prognóstico mais favorável (NAKAJIMA, 2008).

Foram identificadas associações entre pacientes com tumores de subtipo basal-*simile* e história familiar para câncer de mama. Os tumores basais e aqueles que expressam a mutação do *BRCA1*, mostraram características fenotípicas e moleculares semelhantes. Esses tumores exibem frequentemente grau histológico elevado, áreas de necrose e pleomorfismo além de mutações da *p53*. Os marcadores basais como as CK 5/6 e 14 além da negatividade dos receptores de estrógeno estão associados aos tumores com mutação do *BRCA1*. Ressalta-se ainda que esses tumores frequentemente não expressam o HER2 (OLOPADE, 2001; FOULKES, 2003; LAKHANI, 2005; YANG, 2007).

Além das características clínicas e demográficas, os subtipos moleculares mostram associações com os fatores morfológicos tumorais. Estes fatores podem definir características tumorais de cada subtipo, o que pode ser observado na correlação do grau histológico com os subtipos moleculares. O grau histológico traduz as características da diferenciação e crescimento tumorais que por sua vez, influencia na classificação dos subtipos (WEBSTER, 2008).

Os tumores do subtipo luminal A mostraram correlação com graus histológicos I e II, enquanto o subtipo luminal B, HER2 + e o basal-*simile* foram frequentes em tumores de grau elevado, estando associados a alto grau nuclear e elevado índice mitótico. A diferença dos graus entre os subtipos parecem confirmar que os tumores com grau I e III são doenças diferentes, pois os tumores exibiram

perfis moleculares distintos ao nível genômico e imunoistoquímico (YANG, 2007; WEBSTER, 2008; NGUYEN, 2008; SHIN, 2008; MUNJAL, 2009; SPITALE, 2009; RAKHA, 2010; DAWOOD, 2011).

Observou-se que apesar do subtipo luminal B expressar o receptor de estrógeno, estes tumores mostram pior prognóstico em relação ao luminal A, já que pela expressão gênica, observa-se na verdade, níveis baixos de expressão do RE e elevada expressão dos genes de proliferação (YANG, 2007; WEBSTER, 2008; SPITALE, 2008; NGUYEN, 2008; SHIN, 2008).

Em ensaios de qRT-PCR, um destes genes de proliferação representados pelo *MKI67*, que codifica o Ki-67 mostra correlação com a assinatura gênica de recorrência tumoral. Assim, no grupo de tumores luminais que são receptores de estrógeno (RE) positivos, o percentual da expressão do Ki-67 tem importância prognóstica e também na terapêutica. A definição do subtipo luminal B pode caracterizar um subgrupo de pior prognóstico, dentre as pacientes com RE positivos, e que podem se beneficiar com uma terapia sistêmica adicional (CHEANG, 2009).

Apesar da correlação entre a expressão gênica e a imunoistoquímica observada dentre os subtipos, a expressão imunoistoquímica permanece como uma aproximação do genótipos tumorais. É o que se observa no subtipo luminal B, onde a expressão positiva dos receptores hormonais e da proteína HER2 podem não identificar todos os tumores luminais B, porque somente 30 a 50% podem ser realmente HER2 positivos pela expressão gênica. Isto pode levar a inclusão de tumores luminais B dentro do grupo do luminal A (CAREY, 2006; CHEANG, 2008; WIECHMANN, 2009).

Em relação ao tamanho tumoral, observaram-se em alguns estudos que os tumores *pT2* são mais frequentes nos subtipos luminal A e B do que no subtipo basal-*símile* (YANG, 2007; NGUYEN, 2008; SPITALE, 2009; IRIGOYEN, 2011). O tipo histológico ductal infiltrante mostra frequências variadas dentre os subtipos, observando-se em algumas séries, maior frequência dentre os tumores com subtipo HER2 + (SHIN, 2008; SPITALE, 2009; IRIGOYEN, 2011). Em outra série o tipo histológico ductal infiltrante se distribuiu igualmente dentre todos os subtipos (ABD EL-REHIM, 2005). Os tipos especiais, como o lobular infiltrante são mais frequentes no subtipo luminal A, enquanto que no subtipo basal-*simile*, o carcinoma metaplásico é mais comum (SPITALE, 2009; SHIN, 2008; IRIGOYEN, 2011).

A classificação dos subtipos moleculares foi determinada nos carcinomas intraductais da mama, utilizando-se o perfil imunoistoquímico já estabelecido. Quando comparados aos tumores invasivos, o carcinoma intraductal demonstrou uma maior frequência dos subtipos luminais A e do subtipo HER2 + (LIVASY, 2007; CLARK, 2011) e baixa dos subtipos basal-*simile* e triplo-negativo. Observou-se também que o subtipo basal-*simile* no carcinoma intraductal estava associado a fatores de pior prognóstico como alto grau nuclear, expressão elevada do Ki-67 e da p53 (LIVASY, 2007).

A associação entre metástases axilares ou à distância e os subtipos de pior prognóstico, basal-*símile* e HER2 + é controversa na literatura. Apesar de estes subtipos estarem relacionados a fatores de mau prognóstico, observou-se baixa frequência de metástases axilares e de infiltração linfática nestes tumores (CAREY, 2006; CHEANG, 2008; TISCHKOWITZ, 2007; YANG, 2007; SPITALE, 2009). Alguns destes autores relacionam os fatores de mau prognóstico dos carcinomas basais às suas características de proliferação e apoptose (YANG, 2007; SPITALE, 2009).

Já outros autores, demonstraram que os subtipos basal-*símile* e HER2 + tem relação com o processo metastático, associando-se com a agressividade destes tumores (DENT, 2007; NGUYEN, 2008; DE BROT, 2009; ZAHA, 2010). Nestes subtipos, observou-se ainda expressão elevada de genes relacionados à proliferação celular e a resposta imune deficitária, o que pode explicar o desenvolvimento de metástases à distância (DESMEDT, 2008; SHIN, 2008).

Ainda em relação às metástases axilares, quando se compara o subtipo luminal A com o subtipo basal-*simile* e o HER2 + , observou-se que estes últimos estão associados com uma maior quantidade de linfonodos axilares comprometidos (4 ou mais linfonodos positivos) (WIECHMANN, 2009).

No momento do diagnóstico, observou-se que a maioria das pacientes com tumores do subtipo luminal A encontravam-se em estágios clínicos mais baixos, o mesmo não se observando com os tumores do subtipo basal-*símile*, onde as pacientes se encontravam em estágios clínicos mais avançados como II e III (WIECHMANN, 2009). Em recente estudo, observou-se ainda que o sistema de estadiamento-TNM pode não ser suficiente para prever a evolução da doença bem como categorizar a biologia tumoral, principalmente nos pacientes com tumores triplo- negativos (PARK, 2011)

Em relação à sobrevida, os tumores do subtipo basal-símile e HER2 + mostram taxas mais curtas quando comparados ao luminal A e B (GUSTERSON, 1992; CAREY, 2006; YANG, 2007; CHEANG, 2008; SPITALE, 2009). Os tumores com subtipo basal-símile e o HER2 + estavam associados à recorrência tumoral e a sobrevida curta livre de doença (NGUYEN, 2008). Observou-se ainda que subtipos HER2 + e o luminal B estavam associados com tumores multicêntricos e multifocais, o que pode explicar a recorrência tumoral, observada durante a evolução da doença (WIECHMANN, 2009; PARK, 2011).

Alguns estudos mostraram ainda um risco de morte maior no grupo de pacientes com subtipo HER2 + e o triplo-negativo (CALDARELLA, 2011). Neste último subtipo observaram-se ainda índices maiores de recorrência tumoral loco-regional e dos eventos subsequentes como metástase à distância e óbito (PEROU, 2004; MONTAGNA, 2011; CANCELLO, 2011).

Os subtipos moleculares representam entidades biológicas distintas que determinam diferentes estratégias terapêuticas. Os tumores com subtipo luminal A, devido a sua expressão hormonal positiva, respondem melhor às terapias alvos-específicas, como o tamoxifeno e os inibidores da aromatase (ABREU, 2002; GOLDBIRSCHE, 2012).

As pacientes com subtipo luminal B podem se beneficiar com a quimioterapia associada à anti-estrogênicos, já que quando submetidas somente ao tratamento adjuvante sistêmico, observaram-se mais recidiva tumoral e menor sobrevida (CHEANG, 2009). Nestes pacientes, observou-se que a expressão positiva do HER2 e do Ki-67 pode determinar quais as pacientes que tem risco de recidiva e morte (CHEANG, 2009).

A utilização das terapias alvos, como o trastuzumabe é uma das opções nos pacientes com tumores do subtipo HER2 +, já que estes demonstram resistência a terapias endócrinas. Em pacientes que não receberam tratamento prévio para o tumor, utiliza-se o trastuzumabe combinado com paclitaxel (WOLFF, 2007). Naqueles tumores metastáticos onde o este anticorpo foi ineficaz, pode se utilizar o lapatinibe, que bloqueia tanto o HER2 como o EGFR, já que é um inibidor da tirosina quinase (GEYER, 2006).

As pacientes com tumores do subtipo basal-símile não se beneficiam com as terapias utilizadas nos outros subtipos. Nas pacientes com tumores basais e com mutação *BRCA1*, a mastectomia foi considerada como melhor escolha para o

tratamento local (NGUYEN, 2008). Em relação ao uso da quimioterapia pré-operatória, os subtipos basal-*símile* e o HER2 + demonstraram resposta patológica completa, quando comparados aos luminais e ao subtipo “mama normal” (ROUZIER, 2005).

Esta boa resposta a quimioterapia neoadjuvante nestes subtipos parece estar relacionada à expressão negativa do receptor de estrógeno, bem com a superexpressão do HER2. Este perfil imunistoquímico pode ser utilizado como definidor para o uso da quimioterapia em pacientes com tumores de maior dimensão (BHARGAVA, 2010).

2.7.2.4 Carcinomas mamários de subtipo molecular triplo-negativo

2.7.2.4.1 Aspectos gerais

Nos carcinomas mamários a expressão do receptor de estrógeno (RE), do receptor de progesterona (RP) e da proteína HER2 tem importância fundamental nas decisões terapêuticas, bem como na determinação da evolução clínica. Os tumores com subtipo triplo-negativo (TN) são caracterizados pela ausência destes três marcadores tumorais, estando associados a um pior prognóstico, bem como a resistência às terapias usuais (IRVIN, 2008; SEAL, 2010). Nas diversas séries estudadas, estes tumores compreendem cerca de 10 a 16% dos subtipos moleculares (KREIKE, 2007; RAKHA, 2007b; DENT, 2007; IRVIN, 2008; THIKE, 2010; IWASE, 2010; CHOI, 2010).

Estes tumores com subtipo triplo-negativos representam um grupo heterogêneo de tumores, já que podem englobar o subtipo basal-*simile*, o subtipo “mama normal”, o subtipo apócrino e o claudina-*low* (KREIKE, 2007; RAKHA, 2007b; RAKHA, 2009; CAREY, 2010; WEIGELT, 2010; PEROU, 2010; LEHMANN, 2011). Além disso, em análises gênicas com agrupamento hierárquico, observou-se que os tumores com subtipo triplo-negativo estavam agrupados junto aos basais e separados dos luminais e do subtipo HER2 + (KREIKE, 2007).

A relação entre os tumores triplo-negativo e o basal-símile permanece controversa na literatura. Pela expressão gênica e imunoistoquímica, os tumores com subtipo basal-*simile*, são similares aos triplo-negativos. Os subtipos basal-*simile* demonstram baixa expressão do RNAm dos genes do RE,RP e do HER2 e tem expressão negativa pela imunoistoquímica para estes marcadores (KREIKE, 2007; IRVIN, 2008).

Observou-se que cerca de 80 a 90% dos tumores triplo-negativos (TN) são do subtipo basal-*símile* e mostram evoluções clínicas semelhantes (RAKHA, 2007a; BERTUCCI, 2008a). Assim, eles poderiam ser classificados em dois grupos: os TN basal-*símile* e o TN não basais. Os primeiros expressariam as citoqueratinas basais (CK5/6, CK17, CK14) e o EGFR e os não basais, seriam negativos para estes marcadores (RAKHA, 2009).

Dentre estes dois grupos não se observaram diferenças entre as características morfológicas, verificando-se apenas que os TNs basal-*símile*, tinham elevada expressão de genes relacionados à proliferação e uma frequência elevada de metástase para o cérebro e pulmão. Este grupo de pacientes também responde melhor a quimioterapia por ciclofosfamida e mostram curta sobrevida (RAKHA, 2009).

Assim, estes tumores considerados como TN basal-*símile* são semelhantes aos tumores triplo-negativos (TNs), sendo denominados como de fenótipo TN, observando-se que em alguns estudos estes dois subtipos moleculares foram usados como sinônimos (KREIKE, 2007; RAKHA, 2007a; RAKHA, 2008a; DENT, 2007; CAREY, 2007; IRVIN, 2008). Isto pode ser explicado porque a categoria dos tumores basais são compostos quase que inteiramente de subtipos triplo-negativos além de que o diagnóstico de tumores basais, baseado nas citoqueratinas 5/6 ainda não tem critérios definidos (DENT, 2007).

Porém, observaram-se discordâncias entre estas associações, onde nem todos os tumores triplos negativos mostram um fenótipo basal-*símile* pelo perfil gênico e nem todos os tumores com perfil gênico basal, eram triplo-negativos, ou seja não expressavam os receptores hormonais e a proteína HER2 (NIELSEN, 2004; KREIKE, 2007; BERTUCCI, 2008a; RAKHA, 2008a; ANDERS, 2009; SEAL, 2010).

Em um trabalho retrospectivo com 97 amostras de tumores triplo-negativos determinados pela imunoistoquímica, Kreike et al. (2007) observaram que a maioria

tinha expressão gênica do basal-*símile*. Por outro lado, observou-se que a maioria dos tumores com expressão gênica basal-*símile* não expressavam receptores hormonais, porém uma minoria eram positivos para estes receptores.

Posteriormente, Bertucci et al. (2008) utilizaram o perfil gênico e imunoistoquímico e observou que em 172 tumores definidos como triplo-negativo pela imunoistoquímica, 123 destes eram realmente basal-*símile* pela expressão gênica e 49 eram não basais. Por sua vez, em 160 tumores basais, determinados pela expressão gênica, observou-se que 123 eram realmente triplo-negativos e 37 não eram.

Alguns autores consideram que o termo triplo-negativo se refere aos tumores classificados pelo estudo imunoistoquímico, enquanto que o subtipo basal-*simile* é definido pela expressão gênica. Assim, esta classificação do subtipo basal-*simile* poderia ficar restrita apenas ao campo das pesquisas (SORLIE, 2001; SORLIE, 2003; IRVIN, 2008; ANDERS, 2009).

Porém, outros estudos utilizando marcadores imunoistoquímicos definiram os tumores do subtipo basal-*simile* não somente com a negatividade dos receptores hormonais e da proteína HER2, mas com a expressão positiva das citoqueratinas (CK) 5/6 e /ou do EGFR (NIELSEN, 2004; ROUZIER, 2005; CALZA, 2006; LIVASY, 2006; RAKHA, 2009). Em outros trabalhos, a definição destes tumores está baseada apenas nas CKs 5,14 e 17 (VAN DE RIJN, 2002; ABD EL-REHIM, 2004).

2.7.2.4.2 Características clínicas e patológicas

Em relação às características clínicas, o subtipo triplo -negativo foi descrito no grupo de pacientes mais jovens e em pacientes pre-menopausadas. Foram descritas associações entre mulheres afrodescendentes e tumores triplo-negativos (MORRIS, 2007; STEAD, 2009; CORREIA, 2010). Os carcinomas mamários triplo-negativos (TNs), quando comparados aos não triplo-negativos foram associados com fatores de pior prognóstico, como maior dimensão tumoral, grau histológico elevado, necrose tumoral central e margens infiltrativas (CAREY, 2006; RAKHA, 2007a; DENT, 2007; TISCHKOWITZ, 2007; THIKE, 2010; ALBERGARIA, 2011). O tipo histológico ductal infiltrante foi mais frequente dentre os tumores triplo-negativos e

entre os tipos especiais, o carcinoma medular, apócrino, lobular pleomórfico, metaplásico e os carcinomas do tipo adenóide cístico (CAREY, 2006; RAKHA, 2007a).

Apesar da associação com fatores de pior prognóstico, observou-se que alguns grupos de tumores TN não estavam relacionados ao comprometimento linfonodal (RAKHA, 2007a). Já em outras séries de tumores, observou-se maior comprometimento linfonodal do que nos outros subtipos (ALBERGARIA, 2011). Ao contrário de uma boa parte dos tumores mamários, observou-se que nos tumores TN não havia associação entre o aumento do tamanho tumoral e o envolvimento linfonodal (DENT, 2007), sendo porém encontrados em outros grupos (THIKE, 2010).

Observou-se ainda que no grupo de pacientes com tumores triplo-negativo a expressão das citoqueratinas basais e do receptor de andrógeno, aliado a fatores como tamanho e *status* linfonodal tem valor prognóstico. Assim, os tumores TN com fenótipo *basal-símile*, mostraram associação com metástases à distância e recorrência tumoral (RAKHA, 2007a).

Nestes tumores, observaram-se altas taxas de recidiva tumoral à distância e mais baixas de recidiva local. Nos dois primeiros anos após o diagnóstico, observou-se crescimento destas taxas, com um pico em até três anos e rápido declínio nos próximos cinco anos. Foram observados ainda altas taxas de mortalidade dentro dos primeiros cinco anos, com a maioria dos óbitos dentro deste período (DENT, 2007; ANDERS, 2009).

Foram relatados que em pacientes com tumores triplo-negativo, altas taxas de metástase e recorrência tumoral em órgãos viscerais, como pulmão e cérebro ao lado dos tecidos moles e menor em osso e linfonodos. Dentre estas localizações, as metástases cerebrais vem aumentando de incidência bem como a sua agressividade (ANDERS, 2009; CAREY, 2010).

Em relação ao tratamento, o tumor triplo-negativo responde melhor a quimioterapia adjuvante (RAKHA, 2007a). Em outros trabalhos, observou-se que os tumores basais, denominados como triplo-negativo, juntamente com o subtipo HER2+, após o tratamento com quimioterapia neo-adjuvante demonstram resposta patológica completa quando comparados aos outros subtipos (ROUZIER, 2005). Em outros pacientes, apesar de demonstrarem elevada sensibilidade a quimioterapia

com antraciclinas, não tiveram uma resposta patológica completa e evoluíram com altas taxas de recidiva tumoral (CAREY, 2007).

Nos tumores do subtipo triplo-negativo estão sendo também consideradas as terapias-alvo. A utilização de agentes terapêuticos como os inibidores da polimerase e do EGFR e mais recentemente de terapias contra a proteína aberrante *p53*, tem sido investigados (TURNER, 2013).

2.7.2.5 Carcinomas mamários de subtipo basal-*simile*

2.7.2.5.1 Marcadores imunoistoquímicos

Os carcinomas mamários com subtipo basal-*simile* foram inicialmente determinados pelo perfil de expressão gênica nos trabalhos pioneiros de Perou (2000) e Sorlie (2001), sendo caracterizados pela ausência ou baixa expressão do receptor de estrógeno (RE) e da proteína HER2 e pelos genes relacionados à população basal do epitélio mamário normal representados pelas citoqueratinas (CKs) 5/6,14 e 17 e o EGFR (PEROU, 2000; SORLIE, 2001; SORLIE, 2003).

Este subtipo mostra ainda expressão de vários genes como o da p-caderina, do c-Kit, caveolina 1 e 2 e os genes relacionados a proliferação e ao crescimento celular, o que pode estar relacionado à alta capacidade proliferativa destes tumores basais (PEROU, 2000; SORLIE, 2001; SORLIE, 2003; SOUTIROU, 2003; DESMEDT, 2008).

Apesar do perfil de expressão gênica caracterizar estes tumores basais, ainda não há consenso de como defini-los na prática clínica. Os estudos comparativos entre a expressão gênica e o painel imunoistoquímico no subtipo basal-*simile* são escassos na literatura (NIELSEN, 2004; LIVASY, 2006; WEIGELT, 2010b; BADVE, 2011). Em um destes estudos, Nielsen e colaboradores (2004) utilizando uma amostra de 21 tumores classificados como basais pela expressão gênica, demonstrou que em 16 destes, havia expressão imunoistoquímica positiva para CK5/6, EGFR e c-KIT demonstrando desta forma que este método diagnóstico mostra alta sensibilidade e especificidade.

Assim, além dos receptores hormonais e da proteína HER2, alguns autores incluíram no estudo imunoistoquímico para a determinação dos tumores basais, os anticorpos para as CK5 ou CK5/6 (VAN DE RIJN, 2002; NIELSEN, 2004; ABD EL REHIM, 2005; MATOS, 2005; BANERJEE, 2006; RAKHA, 2007b; NGUYEN, 2008; SHIN, 2008; CHEANG, 2008), além das CK14 e CK17 (ABD EL REHIM, 2005; BANERJEE, 2006; LIVASY, 2006; CHEANG, 2008). O EGFR, a proteína p63, a P-caderina e o c-KIT também foram introduzidos neste painel (NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; NGUYEN, 2008; SOUSA, 2010).

As citoqueratinas (CKs) basais tem sido incluídas neste painel imunoistoquímico devido à frequente associação destas com os carcinomas do subtipo basal-*símile* e com fatores de pior prognóstico. Estas CKs tem sido utilizadas sozinha (FULLFORD, 2006; LAAKSO, 2005) ou em combinação com outros marcadores (NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; LIVASY, 2007). Dentre as citoqueratinas, a CK5/6 foi a mais utilizada como único marcador ou em combinação com as outras CK14 e CK17 (MATOS, 2005; LAAKSO, 2006; BANERJEE, 2006).

As CK5/6 mostraram uma maior sensibilidade na determinação do subtipo basal-*símile* (NIELSEN, 2004; LAKHANI, 2005; KIM, 2006; BHARGAVA, 2008). Bhargava et al (2008) mostraram que esta maior sensibilidade está associada a sua afinidade ao determinante antigênico. A positividade das CK5/6 e 14 ou da CK17 podem ainda estar associadas à evolução clínica mais agressiva, com redução da sobrevida global e livre de doença (SORLIE, 2003; BANERJEE, 2006; RAKHA, 2007b).

Estas citoqueratinas mostram associação positiva com o grau histológico, com os receptores hormonais negativos e com a expressão positiva do EGFR, p63 e Ki-67 (MALZAHN, 1998; VAN DE RIJN, 2002; TISCHKOWITZ, 2007; SHAO, 2012). Observou-se em outro trabalho que o fenótipo basal-*simile* poderia ser definido pela expressão positiva de um dos marcadores, a CK5 ou a p63 ou a P-caderina além da expressão negativa do RE e da HER2 (MATOS, 2005).

Ainda baseado na expressão das citoqueratinas (CK) basais 5/14, Laakso e colaboradores (2006), dividiram os tumores basal-*símile* em dois grupos de acordo com a heterogeneidade da expressão destas CKs: basais e baso-luminais. Nos tumores baso-luminais observaram-se um percentual de 5 a 69% de células positivas, entremeadas por células totalmente negativas para as CK 5/14. Já os tumores basais demonstravam positividade uniforme ($\geq 70\%$ células positivas) em

toda a amostra. Nestes tumores basal e basal-luminal observou-se também forte expressão das CK luminais 8/18.

Nesta amostra estudada os tumores basais demonstraram associação com fatores de pior prognóstico, não observado nos tumores baso-luminais (LAAKSO, 2006). Já em outro estudo, onde se utilizou somente a CK14 como marcador para o subtipo basal-*simile* em carcinoma ductal infiltrante com grau III, observou-se que não havia associação significativa com as taxas de sobrevida (FULFORD, 2006). Relatou-se mais recentemente, que em tumores do subtipo basal-*simile* houve forte expressão imunohistoquímica das citoqueratinas luminais CK8/18 e 19, quando comparadas às CK basais (DABBS, 2012; LAVASANI, 2012).

Mais recentemente, a adição da *P*-caderina e da vimentina, podem determinar o subtipo basal-*simile* no grupo dos triplo-negativos que são CK5 e EGFR positivos (SOUSA, 2010). Os marcadores imunohistoquímicos utilizados nos carcinomas infiltrantes de subtipo basal-*simile*, como o RE, HER2, CK5,CK14, EGFR e a *P*-caderina podem também caracterizar e distinguir os carcinomas intraductais do subtipo basal-*simile* (PAREDES, 2007).

Baseados nestes anticorpos, tem sido propostos vários painéis imunohistoquímicos para definir o subtipo basal-*simile* e que incluem: RE-/RP-/HER2 -, (fenótipo triplo-negativo); expressão positiva de 1 ou mais das CKs basais (5/6,14 e 17); RE - mais a expressão positiva da CK5/6 e/ ou EGFR e RE-/RP-/ HER2- mais a expressão positiva da CK5/6 e/ ou EGFR (BADVE, 2011). Considerou-se porém, que a determinação dos cinco marcadores imunohistoquímicos (RE/RP/HER2/CK5/6/EGFR) foi a melhor definidora do subtipo basal-*simile* e demonstrou maior valor prognóstico do que o uso de três marcadores (RE/RP/HER2) (CHEANG, 2008).

Apesar do papel das CKs na determinação do subtipo basal-*simile*, observou-se que nem todos os tumores basais caracterizados pelo perfil gênico, expressam as CK basais e nem todos os tumores que expressam as CK basais, são do subtipo basal-*simile* pela expressão gênica. No trabalho de Nielsen e colaboradores (2004), apesar da alta associação entre o perfil gênico e a imunohistoquímica, observou-se que 8 dos 21 pacientes que eram basais pela expressão gênica, não expressavam as CK 5/6. Em outro estudo, observou-se que as CK5/6 e o EGFR foram expressos em 8% dos casos, determinados como do subtipo HER2 + (LIVASY, 2006).

Estes tumores com expressão das Cks basais e da proteína HER2 foram denominados como do subtipo basal-*similar*-HER2 + e compreendem cerca de 10% do tumores que são do subtipo HER2 + e 23% dos tumores que são RE + / HER2 +. Estes tumores mostraram associação maior com fatores de pior prognóstico do que aqueles do subtipo basal-*similar* ou do subtipo HER2 + (LAAKSO, 2006; BAGARIA, 2012).

2.7.2.5.2 Características clínicas

Muitos estudos que utilizam o perfil de expressão gênica mostram uma associação dos tumores do subtipo basal-*similar*, com fatores de pior prognóstico (SORLIE, 2001; SORLIE, 2003; SOUTIROU, 2003). Estes tumores frequentemente são de grau histológico elevado, com alta expressão do Ki-67 e demonstram margens cirúrgicas não infiltrativas (FULFORD, 2006; LIVASY, 2006; MOINFAR, 2008).

Dentre as diversas séries estudadas pelo perfil gênico e imunoistoquímico, a prevalência dos carcinomas de subtipo basal-*similar* é estimada em cerca de 6 a 27%, dependendo do tipo de estudo e da definição do subtipo basal-*similar* (PEROU, 2000; SORLIE, 2000; SORLIE, 2001; NIELSEN, 2004; MATOS, 2005; BANERJEE, 2006; CHEANG, 2008; NGUYEN, 2008). A média de idade nesta população varia de 47 a 55 anos, observando-se, porém, que muitas pacientes são mais jovens e estão na pré-menopausa (CAREY, 2006; CALZA, 2006; RAKHA, 2006). Quando comparados aos outros subtipos, os tumores basais ocorrem em mulheres jovens, com idade menor que 40 anos e na pré-menopausa (CHEANG, 2008).

Em relação à raça, observou-se que o fenótipo basal-*similar* era mais prevalente em pacientes afro-americanas do que em mulheres não africanas em qualquer idade. Dentre as pacientes afro-americanas, este subtipo era mais frequente na pré-menopausa do que aquelas nas pacientes na pós-menopausa (CAREY, 2006; CAKIR, 2012). Observou-se também uma alta prevalência em pacientes de origem hispânica (BAUER, 2007).

Em relação aos fatores de risco reprodutivos, observou-se que a idade precoce na menarca e não amamentar estariam relacionadas ao subtipo basal-*similar*

em uma população de pacientes jovens afro-americanas. Foram encontrados ainda um maior risco de tumores basais entre pacientes com múltiplas gestações e que não amamentaram (MILLIKAN, 2008; BERTUCCI, 2012).

Há relatos da associação entre os carcinomas mamários hereditários, com mutações do *BRCA1* e o fenótipo basal-*símile*. Observou-se que a mutação do gene do *BRCA1* leva a baixa regulação do RE e a uma superegulação de genes dos marcadores basais. Assim, alguns estudos demonstraram que o fenótipo basal-*símile* nestes tumores *BRCA1* pode estar associado à positividade das CK basais 5/6 e da CK14 (FOULKES, 2003; LAAKSO, 2005; LAKHANI, 2005; TURNER, 2006; HOSEY, 2007). Foram encontradas semelhanças morfológicas entre estes tumores, como alto grau histológico, áreas de necrose e aspecto medular atípico (FOULKES, 2003; SORLIE, 2003; RAKHA, 2009; BADVE, 2011).

Os tumores com subtipo basal-*símile* têm sido na maioria das vezes, associados a um pior prognóstico, e menor sobrevida global e sobrevida livre de metástase. Estes dados de sobrevida foram mais consistentes nos estudos com expressão gênica (SORLIE, 2001; SORLIE, 2003; SOUTIROU, 2003; CALZA, 2006; BERTUCCI, 2009) do que naqueles que usavam a imunistoquímica, onde os dados foram discrepantes (RAKHA, 2006; BANERJEE, 2006; FULFORD, 2007).

Observou-se que nestes pacientes, a recorrência tumoral e o óbito devido à doença ocorrem nos primeiros cinco a oito anos depois do diagnóstico. Após este período, observou-se que o risco foi maior em pacientes com tumores não basais de grau II ou nos tumores com receptor de estrógeno (RE) positivo (BERTUCCI, 2009; BADVE, 2011). Porém, em outro estudo com seguimento de cinco anos observou-se que as curvas de sobrevida global e livre de doença eram similares nos tumores basais e não basais de grau histológico III (FULFORD, 2007).

Devido às peculiaridades inerentes aos tumores de fenótipo basal-*símile*, os tratamentos usuais não são efetivos neste grupo. Assim, no grupo de tumores do subtipo basal-*símile* que se caracterizam por recidiva e óbito mais precoce, a quimioterapia e a radioterapia para o controle sistêmico e local têm sido as terapias de escolha (ROUZIER, 2005). Contudo, a resposta destes tumores de alto grau a quimioterapia permanece controversa. Observou-se uma boa resposta ao paclitaxel e a doxorrubicina, enquanto que em outra série, a antraciclina adjuvante não foi efetiva (ROUZIER, 2005; BANERJEE, 2006).

Diante destas dificuldades em relação ao tratamento dos subtipos basais, a identificação de novos alvos terapêuticos, combinados com a radioterapia poderia ajudar na redução da recidiva tumoral. A utilização de fármacos como o cetuximabe e gefetinibe, que tem como alvo o EGFR ainda estão sendo testados e validados no tratamento do câncer de mama (DEL CASAR, 2008; MOINFAIR, 2008; BERTUCCI, 2012).

A associação entre os tumores basais e a mutação do *BRCA1* pode representar outra possibilidade de tratamento. Os inibidores da PARP (polimerase de poli-ADP-ribose) associados à quimioterapia podem aumentar a sobrevida livre de doença. Mais recentemente outras terapias alvos como os agentes angiogênicos e os inibidores da TRAIL (*tumor necrosis fator-related apoptosis-inducing ligand*) surgiram como uma possibilidade, porém ainda necessitam de validação clínica (WANG, 2008; HOSEY, 2007).

2.7.2.5.3 Características patológicas

Os carcinomas mamários com subtipo basal-*símile* mostram associações controversas com o tamanho tumoral. Alguns trabalhos mostram correlação do subtipo basal-*simile* com tumores de maior dimensão *pT3* e *pT4* (RAKHA, 2006; YANG, 2007; NGUYEN, 2008; SPITALE, 2009; WIECHMANN, 2009; IRIGOYEN, 2011). Essas dimensões tumorais foram correlacionadas a altas taxas proliferativas e expressão elevada do Ki-67, que pode ser observada nos tumores basais (PEROU, 2000; RAKHA, 2006). Contudo, outros autores não encontraram associações entre tumores de maior dimensão e o subtipo basal-*símile* (KUSINSKA, 2005; BANERJEE, 2006; FULFORD, 2006; CALZA, 2006).

A aparência histológica dos tumores de subtipos basal-*símile* tem sido descrita como tumores sólidos, expansivos, com padrão sincicial e bordas não infiltrativas e com área central de necrose do tipo comedo ou de esclerose. As células tumorais mostram aumento da relação núcleo-citoplasma com marcado pleomorfismo, com nucléolo evidente. Observaram-se ainda, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário peritumoral e escasso estroma (LIVASY, 2006; FULFORD, 2006; BANERJEE, 2006).

Nos tumores basais estas alterações citológicas estão associadas a alto índice mitótico, observando-se que 75% a 100% mostram grau histológico elevado (III) (LIVASY, 2006; CALZA, 2006; CAKIR, 2006; KIM, 2006; BERTOLO, 2008; BERTUCCI, 2009; BERTUCCI, 2012). Observou-se ainda que muitos tumores basais com grau histológico III estavam associados ao tipo histológico ductal infiltrante (SOE). Estes tipos histológicos são mais frequentes dentre os basais, representando cerca de 68% a 86% (NIELSEN, 2004; KIM, 2006; RAKHA, 2006). Observou-se ainda que o carcinoma intraductal de subtipo basal-*símile* são de alto grau e podem mostrar padrão sólido ou micropapilar e demonstram o mesmo perfil imunoistoquímico do componente invasivo (DABBS, 2006).

Dentre os tipos histológicos especiais, o carcinoma medular típico e atípico, o metaplásico, o adenóide cístico e o secretório foram descritos como os mais frequentes com o fenótipo basal-*símile*. Já o carcinoma tubular, cribiforme e lobular infiltrantes são mais raros (JACQUEMIER, 2005; KIM, 2006; RAKHA, 2006; REIS FILHO, 2006; RAKHA, 2009; BADVE, 2011). Observou-se que o carcinoma medular típico e atípicos podem demonstrar expressões variáveis das CK basais 5/6 e 14 além da *P*-caderina e *p53* (TOT, 2000; JACQUEMIER, 2005; KIM, 2006). Mais recentemente, observou-se a expressão das CKs basais em um subgrupo de carcinoma lobular infiltrante com grau histológico elevado (FADARE, 2008).

Os carcinomas adenóide cístico e o secretório podem apresentar perfil imunoistoquímico basal-*símile*, apesar de serem neoplasias de baixo grau, demonstrando por sua vez, uma evolução e prognóstico melhor em relação aos outros tipos especiais (RAKHA, 2009). Estes achados poderiam reproduzir a natureza heterogênea dos tumores basais, com também definir a sua real relação com um prognóstico mais desfavorável (BADVE, 2011).

Na comparação com os tumores não basais, os carcinomas com subtipo basal-*símile* mostraram um perfil metastático distinto, com padrão de disseminação hematogênica, pois se observou uma menor frequência de metástases axilares (FULFORD, 2006; KIM, 2006; TISCHKOWITZ, 2007). Os sítios metastáticos mais comuns foram o cérebro e pulmões, que são locais já associados a um pior prognóstico (GAEDCKE, 2007; BERTUCCI, 2012). Ao contrário dos outros subtipos, observou-se que no basal-*símile*, não houve correlação entre o tamanho tumoral e o status axilar (BERTUCCI, 2009).

Apesar dos tumores do subtipo basal-*símile* estarem associados a fatores de pior prognóstico e a evolução clínica desfavorável, observou-se que existiam grupos que apresentavam boa resposta à quimioterapia ao lado de outros tumores associados a fatores de bom prognóstico com baixo grau histológico e curso clínico indolente. Além disto, observou-se em alguns estudos que as citoqueratinas basais não estavam associadas a fatores de pior prognóstico. Assim, o termo “basal-*símile*” e “triplo -negativo” incorporados à patologia mamária poderiam ser considerados mais descritivos e operacionais do que prognósticos ou preditivos (JONES, 2004; POTEMSKI, 2005; KIM, 2006; FULFORD, 2007).

Assim estas discrepâncias no significado prognóstico do carcinoma do fenótipo basal-*símile* foram relacionadas à vários fatores, tais como: falta de uniformidade na definição do perfil imunoistoquímico, tipo de método analítico utilizado, características da população estudada e até com a modalidade de tratamento (LAVASANI, 2012).

Os carcinomas com subtipo basal-*símile* representam um grupo heterogêneo de neoplasias com fatores clínicos, morfológicos e epidemiológicos distintos além de estarem associados a fatores de mau prognóstico. Porém, a sua caracterização definitiva ao nível molecular e imunofenotípica ainda permanece controversa, o que dificulta o entendimento do seu comportamento biológico e da sua evolução clínica (RAKHA, 2009; BERTUCCI, 2012).

Baseado nestas dificuldades tem sido recomendado na rotina diagnóstica diária, a utilização dos fatores morfológicos histopatológicos em adição a acurada determinação dos marcadores diagnósticos imunoistoquímicos que podem contribuir na determinação mais consistente destes subtipos (RAKHA, 2009; BADVE, 2011; BERTUCCI, 2012; DAABS, 2012).

3 ARTIGO 1

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E SOBREVIDA EM PACIENTES COM CARCINOMA INFILTRANTE DA MAMA*Cláudia Leal Macêdo***Ivana Lucia Oliveira Nascimento ****Marco Antônio Vasconcelos Rêgo*****Helenemarie Schaer Barbosa******Annibal Muniz Silvany Neto********RESUMO**

Objetivo: Descrever os fatores clínico-patológicos e avaliar a sobrevida de pacientes com carcinoma infiltrante da mama, mastectomizadas no ano de 2002 com seguimento clínico de aproximadamente dez anos. **Materiais e Métodos:** Em 171 pacientes realizou-se o estudo descritivo das variáveis clínico-patológicas e na análise de sobrevida utilizou-se método de Kaplan-Meier e na análise multivariada, a regressão de Cox. **Resultados:** Observaram-se média de idade de 55 anos, além de maior frequência de tumores pT2, de grau II e do ductal infiltrante e elevada frequência de metástases axilares. Dentre os subtipos moleculares, o luminal A foi o mais frequente e o HER2+, o menos frequente. A taxa de sobrevida foi de 80,1%. Na análise multivariada, as variáveis independentes que permaneceram associadas à sobrevida foram o *status* menopausal, comprometimento das margens cirúrgicas, metástase à distância e o subtipo luminal A, luminal B e o HER2+. As metástases à distância apresentaram o maior risco de morte (HR=12,34 IC=90% 6,34-24,04). **Conclusão:** Este estudo demonstrou que a média de idade foi menor que aquela dos países desenvolvidos e as taxas de sobrevida foram semelhantes às destes países e superior à das regiões brasileiras. Ressalta-se assim a importância dos prontuários médicos no levantamento de dados epidemiológicos e de fatores

* Mestre em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia. Doutoranda de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. E-mail: claudiamacedo14@hotmail.com. Endereço para correspondência: Rua Sócrates Guanaes Gomes; n°. 107 apto. 1301; Bairro: Cidade Jardim; Salvador – BA.

** Doutora em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia. Docente na Universidade Federal da Bahia- UFBA. ICS- Instituto Ciências de Saúde; PPGIm (Programa de Pós Graduação em Imunologia). E-mail: ivana@nob-ba.com.br

*** Doutor em Saúde Coletiva, pela Universidade Federal da Bahia. Docente na Universidade Federal da Bahia- UFBA. FAMED- Faculdade de Medicina da UFBA. E-mail: mrego@ufba.br

**** Doutora em Patologia Humana, pela Universidade Federal da Bahia. Patologista do Hospital Aristides Maltez- Salvador – BA. E-mail: hschaer@uol.com.br

***** Mestre em Saúde Comunitária pela Universidade Federal da Bahia. Professor adjunto da Universidade Federal da Bahia-UFBA.

prognósticos que podem influenciar o prognóstico das pacientes com carcinoma infiltrante da mama.

Palavras Chave: Câncer de mama. Patologia. Prognóstico. Sobrevida.

3.1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama em mulheres é a neoplasia de mais alta incidência e mortalidade tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. No Brasil o câncer de mama vem se transformando em um grave problema de saúde pública devido às altas taxas de incidência e mortalidade podendo esta última estar relacionada ao diagnóstico tardio e à terapêutica inadequada. Na Bahia, apesar das taxas de incidência intermediárias, o carcinoma infiltrante da mama continua sendo a neoplasia mais incidente em mulheres. Apesar deste quadro preocupante, observa-se um aumento na sobrevida nos países ocidentais ^[1, 2].

No Brasil há poucos estudos de sobrevida em pacientes com carcinoma mamário e na Bahia eles são inexistentes. Nestes estudos de sobrevida no Brasil, observam-se variações nas taxas de 61% a 87,7% nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, o que pode ser explicado por variações metodológicas, bem como a fatores inerentes à população estudada ^[3- 8].

O câncer de mama é uma doença heterogênea com fatores clínicos, morfológicos e evolutivos distintos que muitas vezes não apresentam relação evidente com as características biológicas intrínsecas dos tumores. O conhecimento dos mecanismos desta heterogeneidade e da biologia tumoral pode auxiliar na determinação do prognóstico das neoplasias da mama. Assim, alguns fatores prognósticos clínicos e morfológicos já reconhecidos têm sido utilizados para prever o perfil evolutivo destas pacientes ^[9,10]. Mais recentemente, a classificação destas neoplasias em subtipos moleculares por meio da expressão gênica e imunoistoquímica vêm sendo empregada para melhorar o entendimento desta diversidade tumoral e de sua correlação com a evolução da doença ^[11-14].

Os fatores clínicos e histopatológicos já reconhecidos na literatura em diferentes populações compreendem dentre outros, a idade, *status* menopausal,

status axilar e metastático, bem como tamanho tumoral, grau histológico e a expressão de marcadores imunoistoquímicos ^[9,15,16]. Todos estes interferem no estadiamento clínico e patológico e por sua vez mostram relação com a evolução da doença, observando-se que a sobrevida é inversamente proporcional ao tamanho tumoral e ao comprometimento axilar ^[16].

Apesar de já terem sido publicados alguns estudos sobre a relação entre estes fatores e o prognóstico na população brasileira, outros fatores tais como a expressão dos marcadores imunoistoquímicos utilizados na classificação dos subtipos moleculares ainda necessitam de validação ^[4-7]. O estudo dos fatores prognósticos clínicos e histopatológicos é praticamente inexistente na população da Bahia, principalmente na correlação com a sobrevida e fatores do carcinoma mamário associado a esta ^[17]. Assim, o objetivo deste trabalho foi descrever os fatores clínico-patológicos e avaliar a evolução e a sobrevida de pacientes com carcinoma infiltrante da mama, mastectomizadas no ano de 2002, tratadas em um hospital de referência em Oncologia na cidade de Salvador, Bahia e acompanhadas aproximadamente por dez anos.

3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

3.2.1 Tipo de investigação e população do estudo

Trata-se de um estudo analítico de sobrevida. A população de estudo foi constituída por todas as 312 pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma infiltrante da mama no ano de 2002 e submetidas à mastectomia simples. Estes dados foram obtidos no Hospital Aristides Maltez (HAM), referência para o tratamento de câncer no estado da Bahia. Desta população, foram excluídos 141 prontuários (28 não acessíveis devido a problemas técnicos, 110 devido à ausência de blocos parafinados com tumor no arquivo e três por serem de pacientes do sexo masculino). Nos cento e treze prontuários excluídos, todas as variáveis clínicas e patológicas foram categorizadas e demonstravam similaridade com a população

amostrada. A população efetivamente estudada foi constituída por 171 pacientes do sexo feminino.

3.2.2 Coleta de dados e variáveis estudadas

Os dados foram coletados a partir dos prontuários médicos de todas as pacientes submetidas à mastectomia simples e retirada dos linfonodos axilares cujo diagnóstico histopatológico foi feito entre primeiro de janeiro de 2002 e 31 de dezembro de 2002. Para a coleta de dados foi elaborada uma ficha padronizada (ANEXO 1). Foram analisadas as variáveis clínicas e patológicas, incluindo os subtipos moleculares do carcinoma infiltrante da mama.

Foram analisadas as seguintes variáveis clínicas: data do diagnóstico, idade ao diagnóstico (em anos) categorizada em ≤ 40 anos e ≥ 40 anos. As variáveis paridade, história familiar, recidiva e metástases à distância foram categorizadas em: sem informação, sim, não. O *status* menopausal foi determinado pela informação do prontuário em sim, não e sem informação. Devido à escassez de informações em parte dos prontuários, o estadiamento clínico foi avaliado em 136 prontuários, sendo categorizados em estádios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV, segundo a União Internacional contra o Câncer (UICC) ^[18] (ANEXO 2).

As variáveis patológicas foram caracterizadas como tamanho tumoral, grau histológico, tipo histológico, *status* axilar e comprometimento das margens cirúrgicas. O tamanho tumoral foi determinado pelo estadiamento *p*TMN, considerando apenas o tamanho tumoral (T) ^[18] Estas medidas foram classificadas como *p*T1, *p*T2 e *p*T3. Não houve tumores classificados como *p*T4 (ANEXO 2). Para determinação da variável grau histológico foi utilizado o sistema de graduação microscópica de Bloom-Richardson modificado nos casos de carcinoma ductal infiltrante (SOE) ^[19]. Foram considerados os graus I, II e III, de acordo com a soma das pontuações: grau I–bem diferenciado; grau II-moderadamente diferenciado e grau III-pouco diferenciado. Para a classificação histológica dos tumores foram empregadas as recomendações do Colégio Americano de Patologistas ^[20] e OMS (ANEXO 3).O *status* axilar foi categorizado como: sem informação, positivo, negativo. As margens cirúrgicas comprometidas foram consideradas como aquelas com medida inferior à

1,0 mm e foram categorizadas em sem informação, sim, não. Na variável tratamento consideraram-se todos aqueles feitos nesta população até o período final do acompanhamento, sendo categorizado como: sem informação, hormonioterapia, quimioterapia, radioterapia e tratamentos combinados.

A avaliação imunoistoquímica para caracterização dos subtipos foi determinada pelos dados oriundos de outro trabalho com esta mesma população (não publicado). O subtipo luminal A foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 - ; o subtipo luminal B foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 + ; o subtipo HER 2 + como RE - e/ou RP- e HER2 + e os subtipos triplo-negativo, aqueles que eram RE - e/ou RP- , HER2 – ^[13].

3.2.3 Análise estatística

A partir dos dados obtidos da ficha específica (ANEXO 1) foi criado um banco de dados no programa EPI-INFO versão 6.03. As variáveis qualitativas foram descritas através de suas frequências simples e frequências relativas. As variáveis quantitativas foram descritas por meio de medidas de tendência central e de dispersão.

O tempo de sobrevida foi medido em meses e foi definido como o período entre a data do diagnóstico histopatológico da doença e a data do óbito. Para a análise de sobrevida foram considerados como falha os óbitos ocorridos até o final do seguimento (18 de setembro de 2011) e, como censura as mulheres que permaneceram vivas até a data final do seguimento. Na análise de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier, sendo calculadas as probabilidades e as curvas de sobrevida com estratificação, agrupando-se as pacientes de acordo com as variáveis clínicas e patológicas selecionadas para este estudo ^[21].

Na análise univariada comparou-se cada uma das variáveis com a sobrevida das pacientes, sendo incluídas: idade, *status* menopausal, metástase à distância, recidiva, estadiamento clínico, tamanho tumoral, grau e tipos histológicos, *status* axilar, comprometimento das margens cirúrgicas e tratamentos. O Teste de Breslow foi empregado para a comparação das funções de sobrevida para cada variável, sendo considerado estatisticamente significativo quando o seu valor foi menor ou

igual a 0,05 ^[21]. Na análise multivariada foi empregado o modelo de regressão de Cox sendo incluídas todas as variáveis clínicas e patológicas no modelo, sendo retiradas e recolocadas posteriormente, segundo o nível de significância estatística de 0,05. As variáveis que permaneceram no modelo final foram as que se mostraram estatisticamente significantes, depois de controladas pelas demais no modelo de Cox. Foram computados os *hazard ratios* (HR) e correspondentes intervalos de confiança de 90% (IC=90%). Para verificar a proporcionalidade dos modelos de Cox foi realizado a análise de resíduo para caracterizar o ajuste do modelo. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS 10.0.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Aristides Maltez – CEP/ LIGA CONTRA O CÂNCER DO HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ, sob o protocolo de número 262/10 (APENDICE A).

3.3 RESULTADOS

3.3.1 Características clínicas

A população do estudo foi constituída por 171 pacientes do sexo feminino. A média de idade ao diagnóstico foi de 55 anos (mediana de 53 anos), com uma variação de 25 a 96 anos. A frequência das pacientes jovens (≤ 40 anos) foi de 14%. Em relação à história reprodutiva, 137 pacientes (80,1%) pariram. No momento do diagnóstico, 106 pacientes (62%) eram clinicamente menopausadas. Observou-se história familiar positiva em 14,6% das pacientes. Na avaliação de metástases à distância, 37 (21,6%) tiveram esse desfecho e 12 pacientes (7%) apresentaram recidiva tumoral, sendo o plastrão cirúrgico, o local mais frequente (5,8%). O estadiamento clínico no momento do diagnóstico foi determinado em 136 pacientes: 23 (15,3%) pacientes estavam no estágio I; 40 (23,4%) pacientes estavam no estágio IIA; 31 (18,1%) pacientes no estágio IIB; no estágio IIIA e IIIB foram observadas 20 (11,7%) pacientes cada um. Apenas duas pacientes (1,2%) estavam no estágio IV (Tabela 1).

Tabela 1 – Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as características clínicas

Características clínicas	Número de casos (%)
Idade	
≤ 40 anos	24 (14%)
> 40 anos	147(86%)
Paridade	
Sem informação	07 (4,1%)
Sim	137 (80,1%)
Não	27(15,8%)
Status menopausal	
Sem informação	10(5,8%)
Sim	106(62,0%)
Não	55(32,2%)
Historia familiar	
Sem informação	02 (1,2%)
Sim	25(14,6%)
Não	144(84,2%)
Metástase à distância	
Sim	37(21,6%)
Não	134(78,4%)
Recidiva	
Sim	12(7,0%)
Não	159(93,0%)
Estadiamento clínico	
Sem informação	35(20,5%)
I	23(13,5%)
IIA	40(23,4%)
IIB	31(18,1%)
IIIA	20(11,7%)
IIIB	20(11,7%)
IV	2 (1,2%)

3.3.2 Características patológicas dos tumores e tratamento

O grau histológico II foi o mais freqüente (54,4%), seguido do grau III, (38,6%) e do grau I (7,0%). Quanto ao tamanho, os tumores mais frequentes foram classificados como pT2 (54,4%), seguidos pelos tumores pT3 (23,4%) e dos pT1 (22,2%). O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma ductal infiltrante (sem outra especificação - SOE) (89,5%). Dentre os tipos especiais, o lobular infiltrante, o metaplásico e o papilífero foram os mais frequentes (2,3%). Observou-se *status* axilar positivo em 98 (57,3%) pacientes, enquanto que 67 (39,2%) tiveram axila negativa. Identificou-se que em 18 (10,5%) amostras tumorais, as margens estavam comprometidas pela neoplasia. A maioria dos tumores era positiva para o RE (73,1%). Observou-se positividade para o RP em 111 (64,9%) tumores e

positividade para o HER2 em 20 (11,7%). Em relação aos subtipos, o luminal A foi identificado em 112 (65,5%) tumores; o luminal B em 14 (8,2%); o subtipo HER2 + em 6 (3,5%) e o triplo-negativo em 39 (22,8%) tumores. As pacientes foram submetidas aos seguintes tratamentos: hormonioterapia (5,3%); a radioterapia (2,9%) e quando combinados, radioterapia e hormonioterapia representaram 22,2%, a radioterapia e a quimioterapia, 24,6% e a radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia em 30,4% (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as características patológicas e tratamento

<i>Características patológicas</i>	<i>Número de casos (%)</i>
Grau	
I	12 (7,0%)
II	93 (54,4%)
III	66 (38,6%)
Tamanho	
pT1	38 (22,2%)
pT2	93 (54,4%)
pT3	40 (23,4%)
Tipos histológicos mais frequentes	
Ductal infiltrante	153(89,5%)
Lobular infiltrante	4 (2,3%)
Metaplasico	4 (2,3%)
Papilífero	4 (2,3%)
Mucinoso	3 (1,8%)
Status axilar	
Sem informação	6 (3,5%)
Negativo	67 (39,2%)
Positivo	98 (57,3%)
Comprometimento das margens cirúrgicas	
Sem informação	2 (1,2%)
Sim	18 (10,5%)
Não	151 (88,3%)
Subtipos	
Luminal A	112(65,5%)
Luminal B	14(8,2%)
HER2 +	6 (3,5%)
Triplo negativo	39(22,8%)
Tratamentos mais frequentes	
Hormonioterapia	9 (5,3%)
Radioterapia	5 (2,9%)
Radioterapia + quimioterapia + hormonioterapia	52 (30,4%)
Radioterapia + quimioterapia	42 (24,6%)
Radioterapia + hormonioterapia	38 (22,2%)

3.3.3 Seguimento clínico e sobrevida global

O seguimento clínico foi realizado em toda a população com uma média de tempo de 114,93 meses, mediana de 108,2 meses e amplitude 1 a 115,2 meses. Até o término do seguimento, 137 (80,1%) pacientes estavam vivas e 34 (19,9%) foram a óbito. Entre as pacientes que estão vivas, oito (5,8%) apresentaram recidiva tumoral e 16 (11,7%) apresentaram metástases à distância. Nas pacientes que foram a óbito, quatro (11,8%) apresentaram recidiva e 21 (61,8%) apresentaram metástases à distância.

A sobrevida global obtida pela estimativa de Kaplan-Meier foi de 80,1% ao final do período do estudo. As variáveis clínicas e patológicas utilizadas na análise univariada estão representadas na Tabela 3. Dentre as variáveis clínicas e patológicas, o tamanho tumoral, o *status* axilar, comprometimento das margens cirúrgicas e as metástases à distância estavam associadas significativamente à sobrevida.

Tabela 3 - Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as funções de sobrevida não ajustada das pacientes e as variáveis do estudo

<i>Variáveis</i>	<i>Sobrevida em 10 anos (IC95%)</i>	<i>Teste Breslow (valor de p)</i>
Idade		
≤ 40 anos	93,1 (77,7- 108,3)	0,45
> 40 anos	99,8 (94,2-105,3)	
Menopausa		
Sim	96,8 (89,9-86,5)	0,18
Não	103,5(95,3-111,7)	
Metástase à distância		
Sim	107,4(102,9-111,9)	0,000*
Não	67,6(53,5-81,8)	
Recidiva		
Sim	9,8(94,5-105,2)	0,191
Não	83,3(60,7-106,0)	
Grau histológico		
Grau I	107,3(98,4-115,7)	0,191
Grau II	101,8(95,2-108,4)	
Grau III	92,6(83,0-102,2)	
Tamanho Tumoral		
pT1	109,8(103,7-115,9)	0,007*
pT2	100,0(93,1-106,9)	
pT3	85,2(71,7-98,7)	
Tipo histológico		
Ductal infiltrante	98,3(92,7-103,9)	0,451
Especiais	102,6(87,5-117,6)	
Status axilar		
Positivo	94,73(87,2-102,1)	0,026*
Negativo	105,7(98,6-112,6)	
Margens		
Sim	77,7(56,0,-99,4)	0,008*
Não	101,1(95,9-106,3)	

Na análise de Kaplan-Meier, observou-se que pacientes com tumores com tamanho pT1 (92,1%) apresentaram melhor sobrevida em relação àquelas com tumores pT2 e pT3 (81,7% e 65,0%, respectivamente) (Figura 1). A sobrevida estratificada pelo status axilar demonstrou que as pacientes com axila negativa apresentaram melhor sobrevida (89,6%) do que aquelas com metástase axilar (74,5%) (Figura 2).

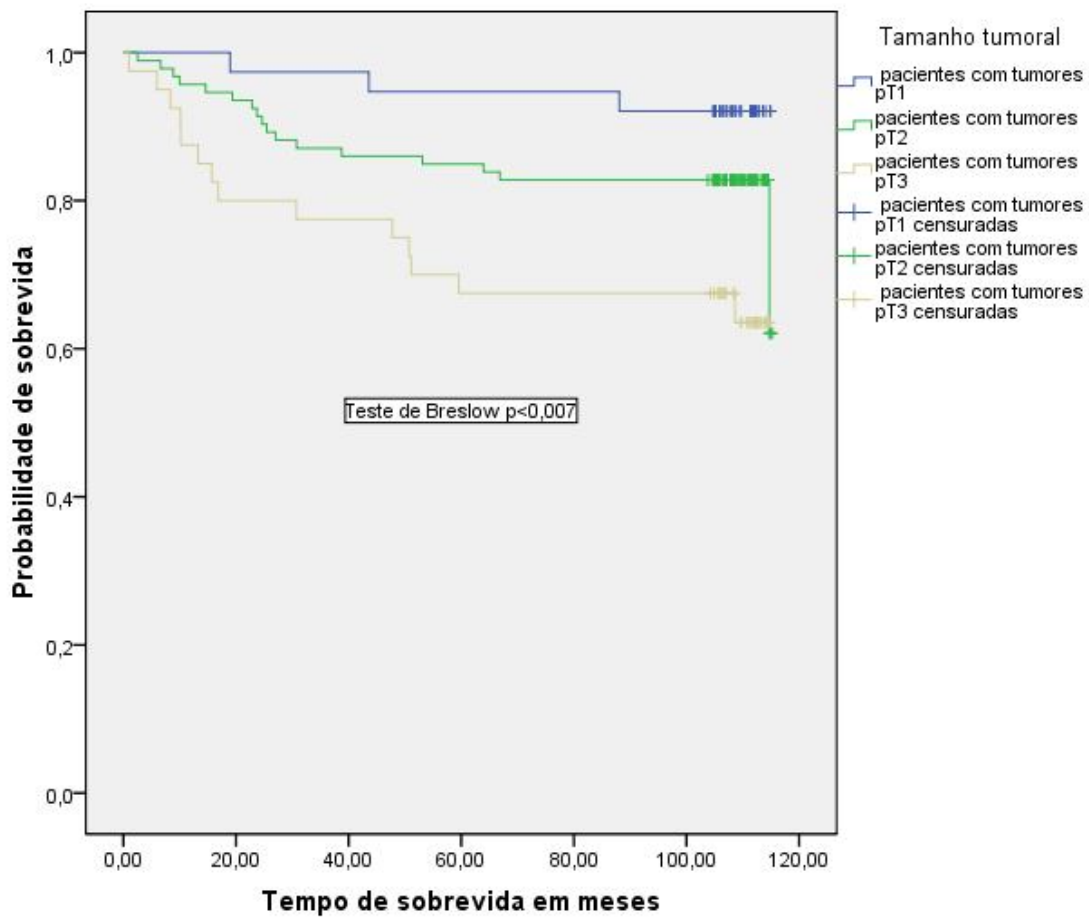


Figura 1 - Curva de sobrevivência em dez anos estratificada pelo tamanho tumoral em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

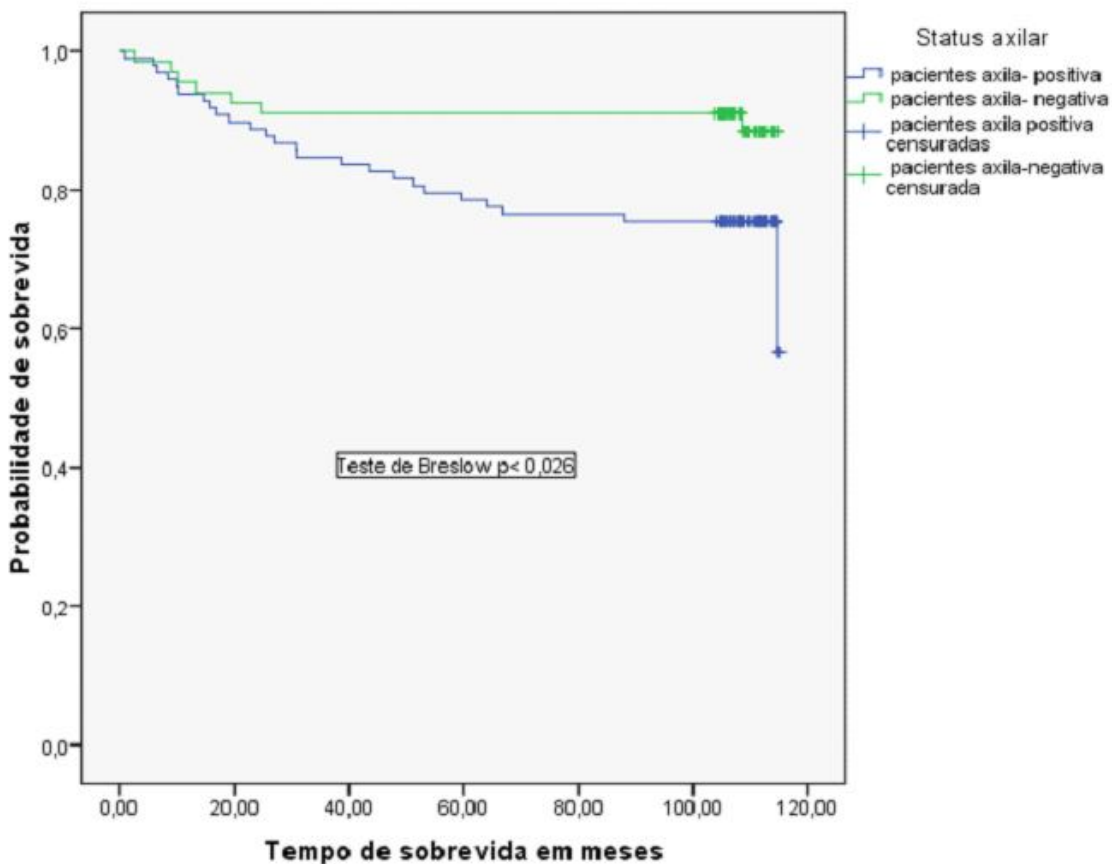


Figura 2 – Curva de sobrevivência em dez anos estratificada pelo status axilar em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

Em relação às margens cirúrgicas, observou-se que a melhor taxa de sobrevivência foi entre as pacientes com tumores que não apresentavam comprometimento (82,1%), do que entre aquelas com margens comprometidas (Figura 3). Entre as pacientes que não apresentaram metástase à distância durante o período de seguimento, observou-se melhor taxa de sobrevivência (80,1%) do que aquelas que apresentaram esse desfecho (43,2%) (Figura 4).

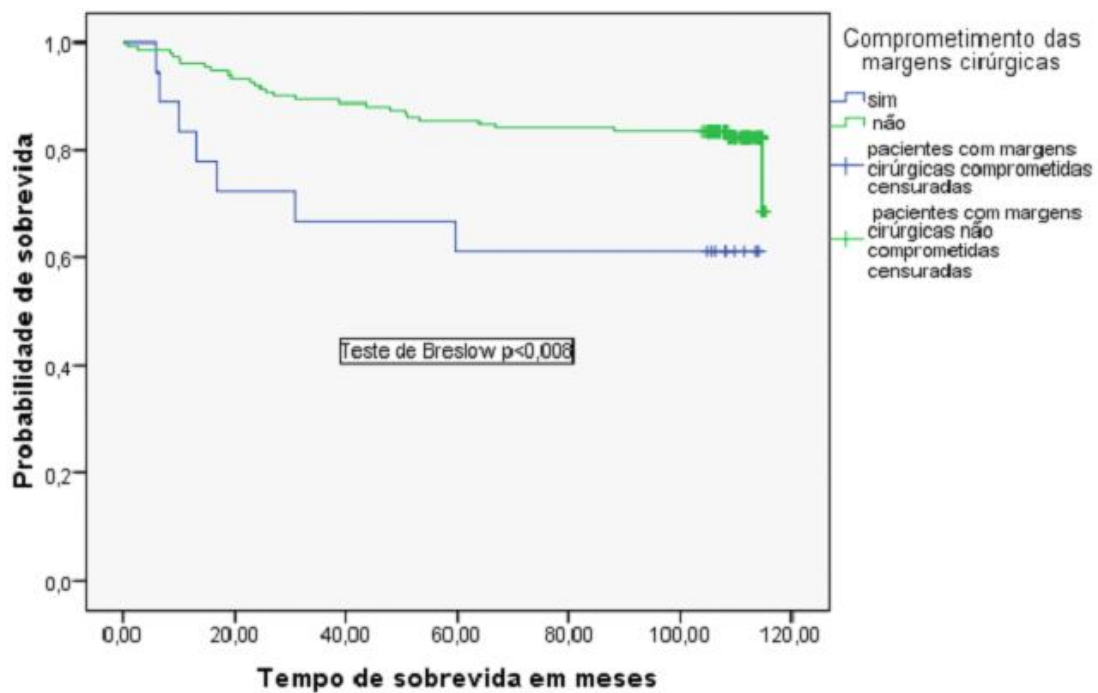


Figura 3 – Curva de sobrevivida em dez anos estratificada pelo comprimento das margens cirúrgicas em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

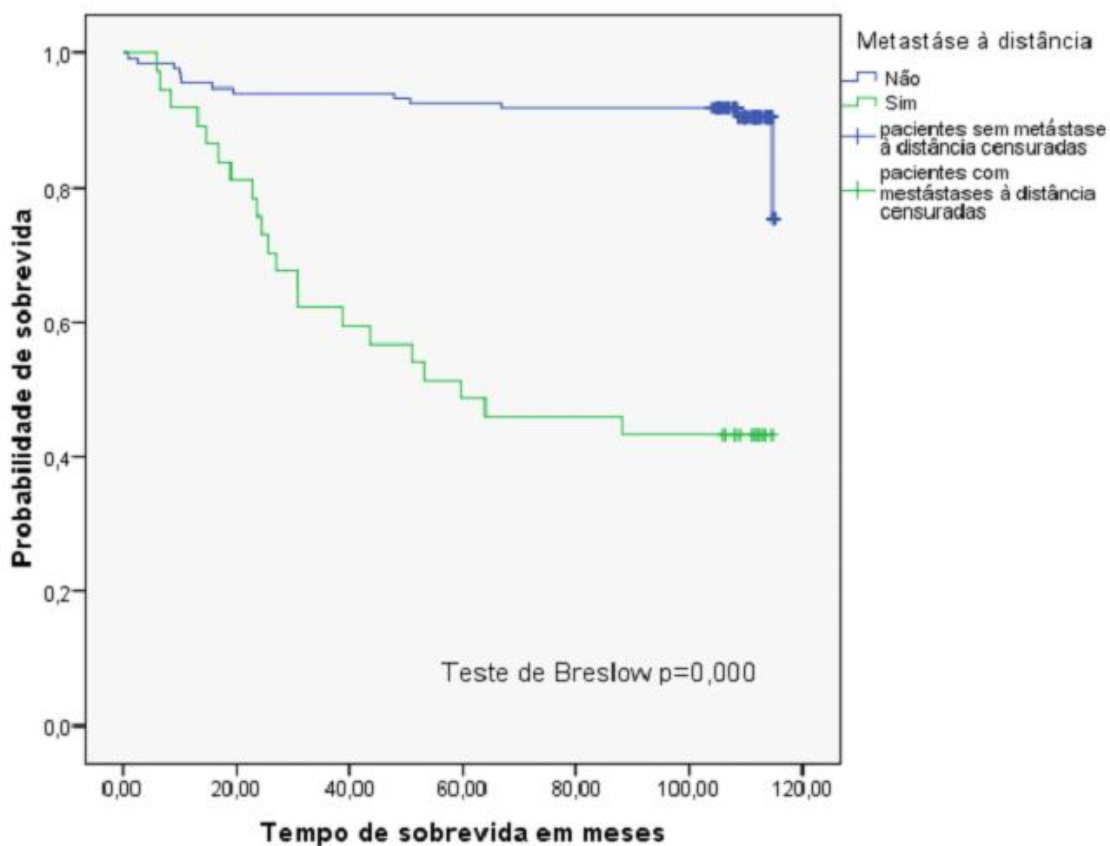


Figura 4 – Curva de sobrevida em dez anos estratificada pela metástase à distância em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

Observaram-se taxas variadas de sobrevida em relação às demais variáveis clínicas e patológicas, porém sem significância estatística. As pacientes mais jovens (≤ 40 anos) apresentaram menor sobrevida do que aquelas com idade superior a 40 anos (Figura 5). As pacientes menopausadas e aquelas com recidiva tumoral apresentaram taxas menores de sobrevida do que aquelas que não apresentaram esse desfecho (76,4% e 66,7%, respectivamente) (Figuras 6 e 7).

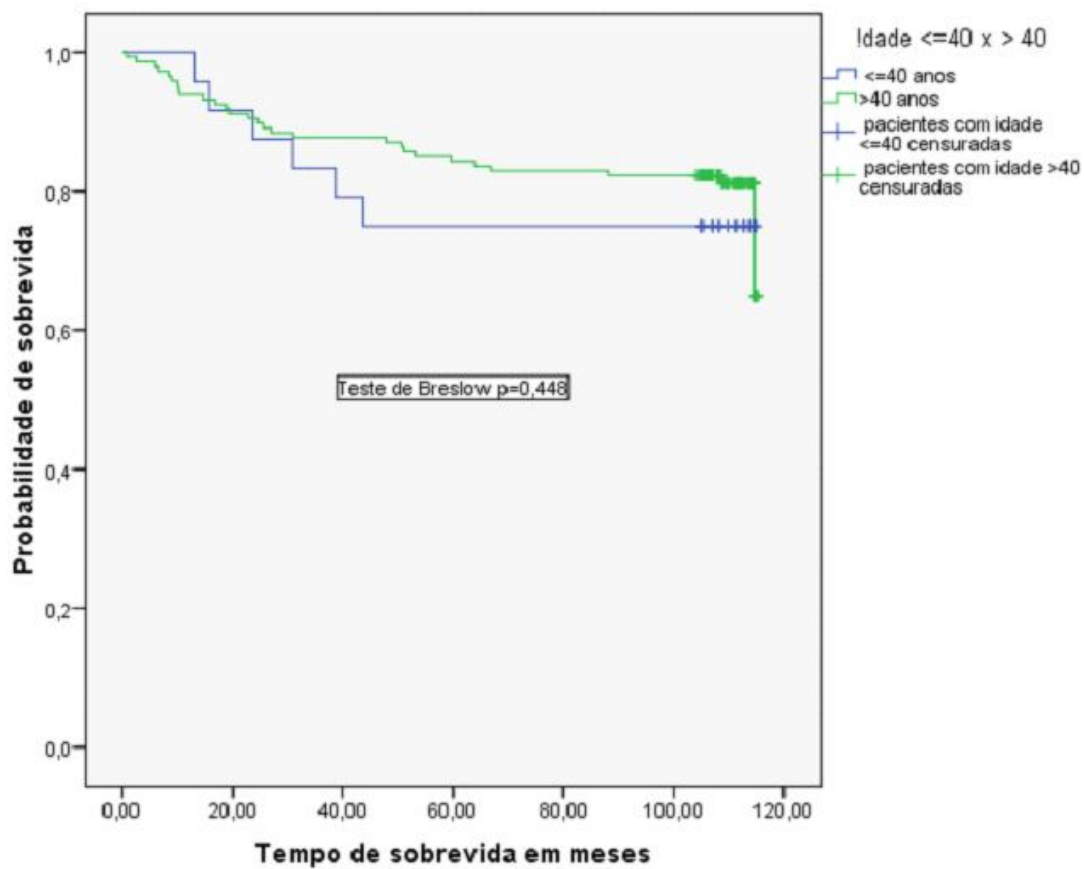


Figura 5 – Curva de sobrevivida em dez anos estratificada pela idade em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

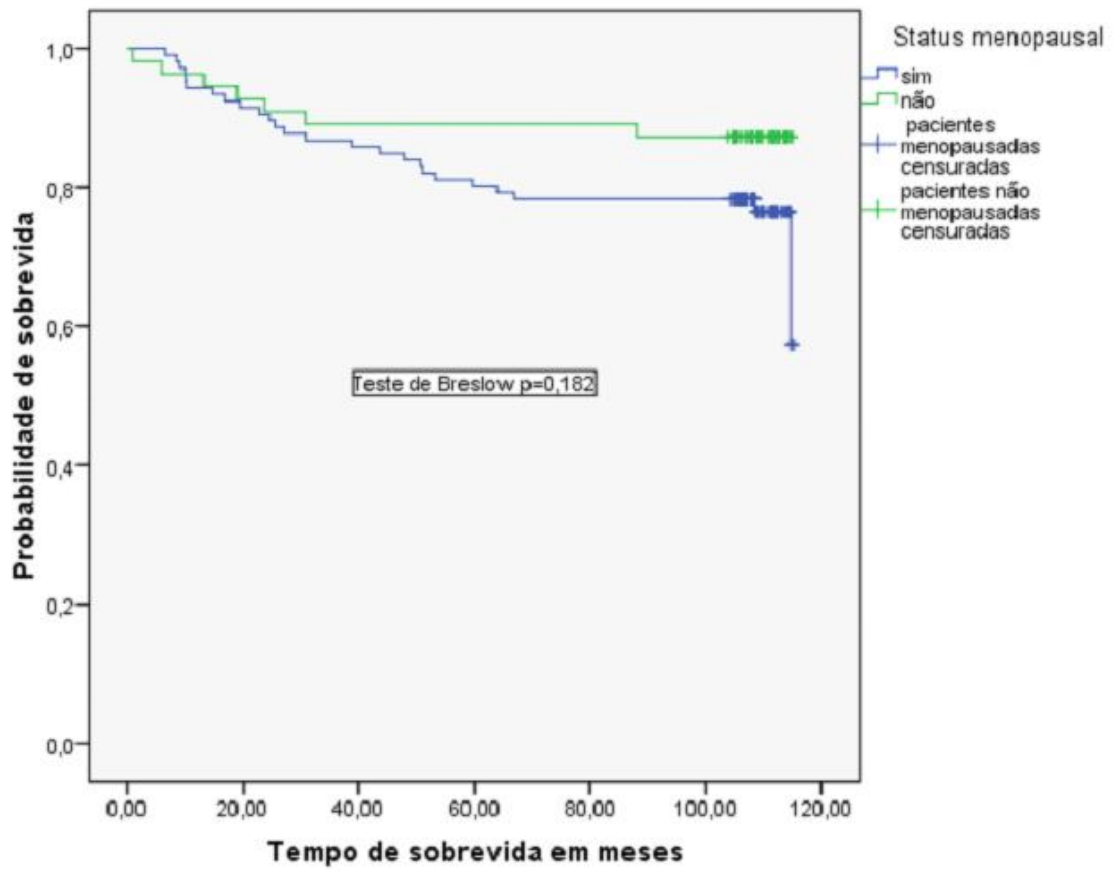


Figura 6 – Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo status menopausal em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

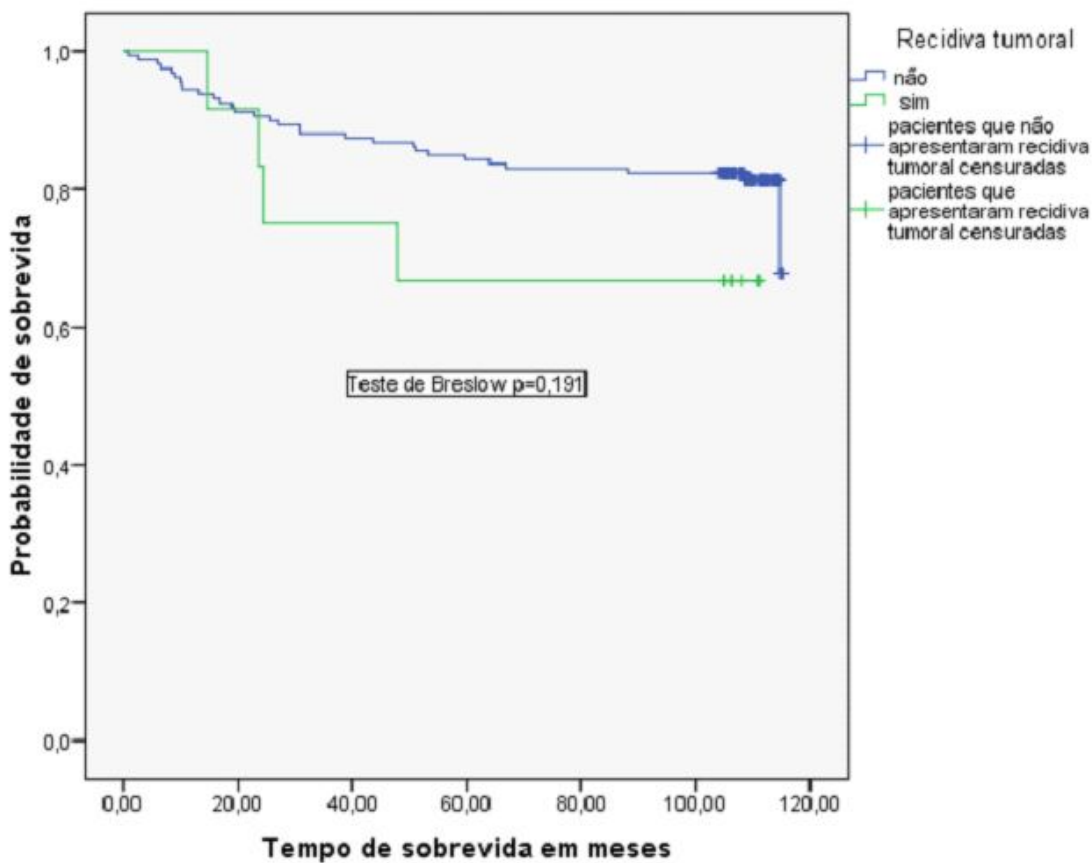


Figura 7 – Curva de sobrevivida em dez anos estratificada por recidiva tumoral em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

As pacientes com tumor de grau histológico III demonstraram menor taxa de sobrevivida (72,7%) em relação ao grau I e II (83,3% e 84,9%, respectivamente) (Figura 8). As pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma ductal infiltrante tiveram menor taxa de sobrevivida (79,1%) em relação aos tipos histológicos especiais (88,9%) (Figura 9).

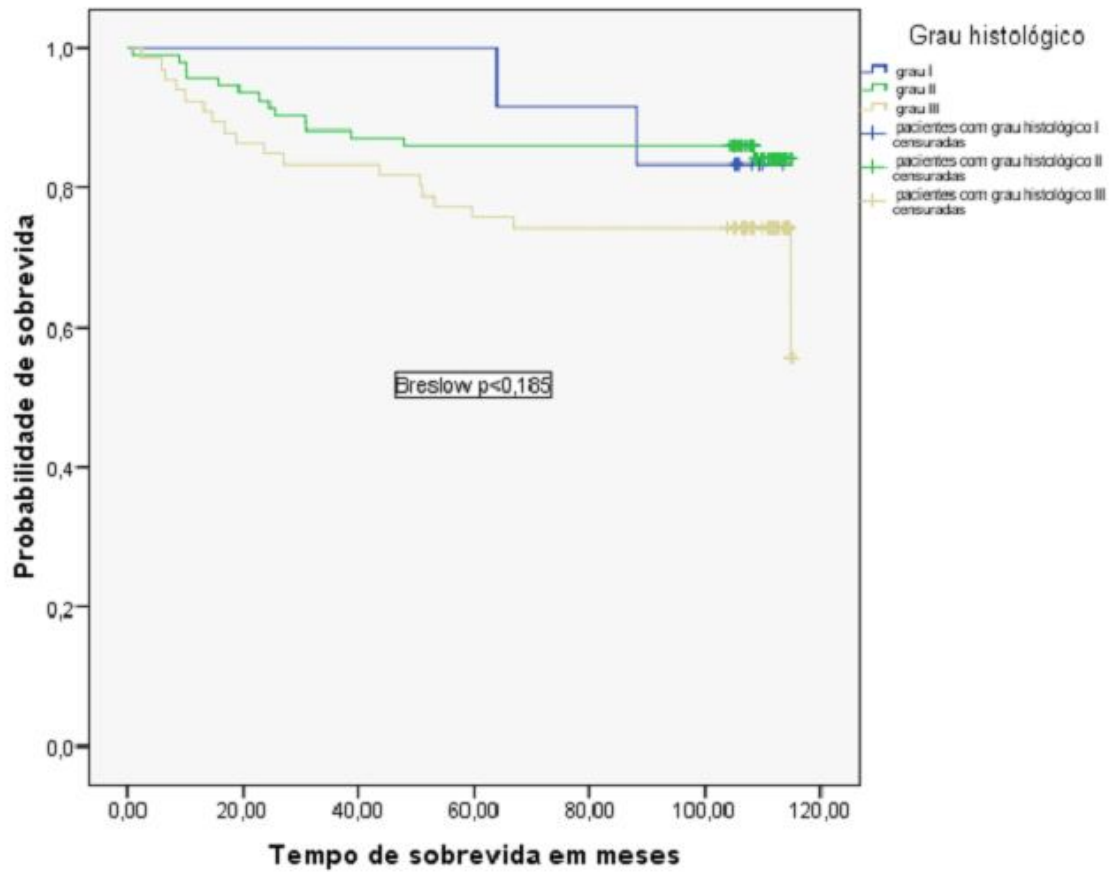


Figura 8 – Curva de sobrevivida em dez anos estratificada pelo grau histológico em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

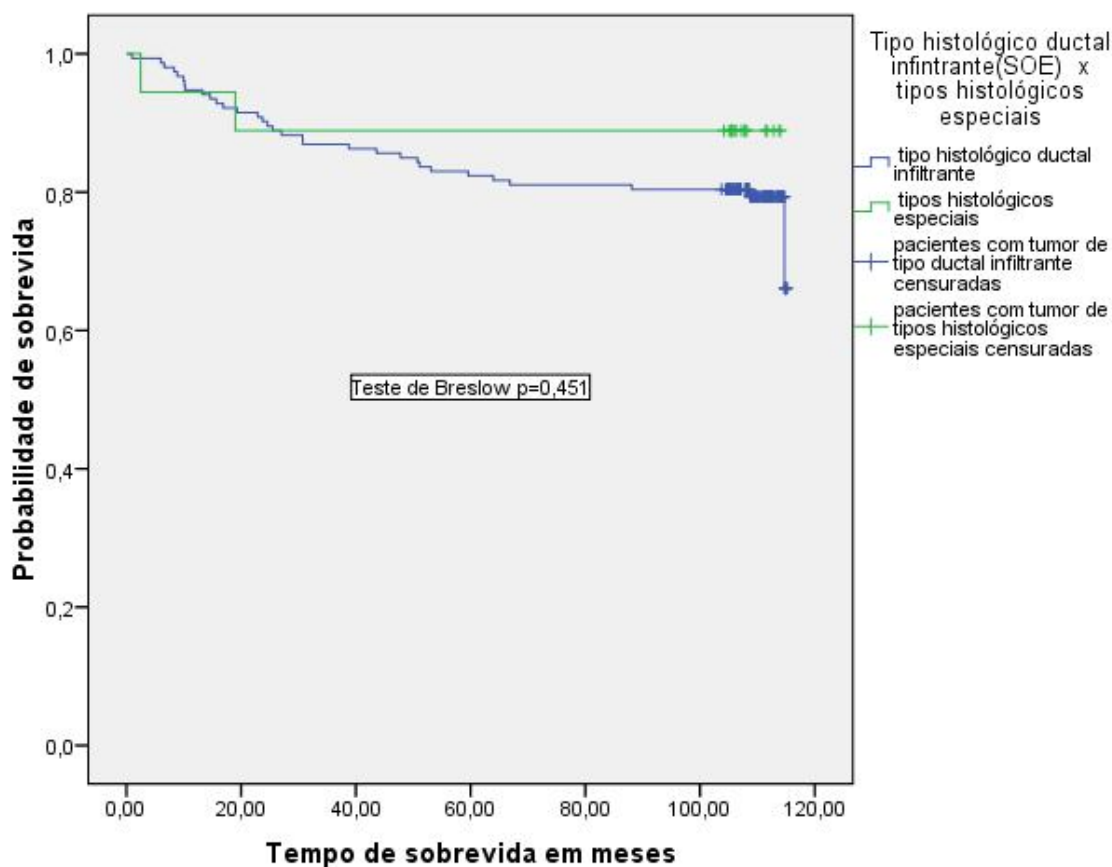


Figura 9 – Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo tipo histológico ductal infiltrante x tipos histológicos especiais em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

Dentre os subtipos moleculares do carcinoma mamário, o triplo negativo e o luminal B tiveram as menores taxas de sobrevida (71,1% e 75,0%, respectivamente) em relação ao luminal A e o subtipo HER2 + que mostraram taxas de 84,3% e 83,3% (Figura 10). Em relação ao tratamento, observou-se que os esquemas combinados mostravam melhor taxa de sobrevida (82%) em relação a apenas um tipo de tratamento (70,6%) (Figura 11). Quando se utilizou apenas um tipo de tratamento, a quimioterapia foi quem apresentou a menor taxa de sobrevida dentre os outros tratamentos (50,0%).

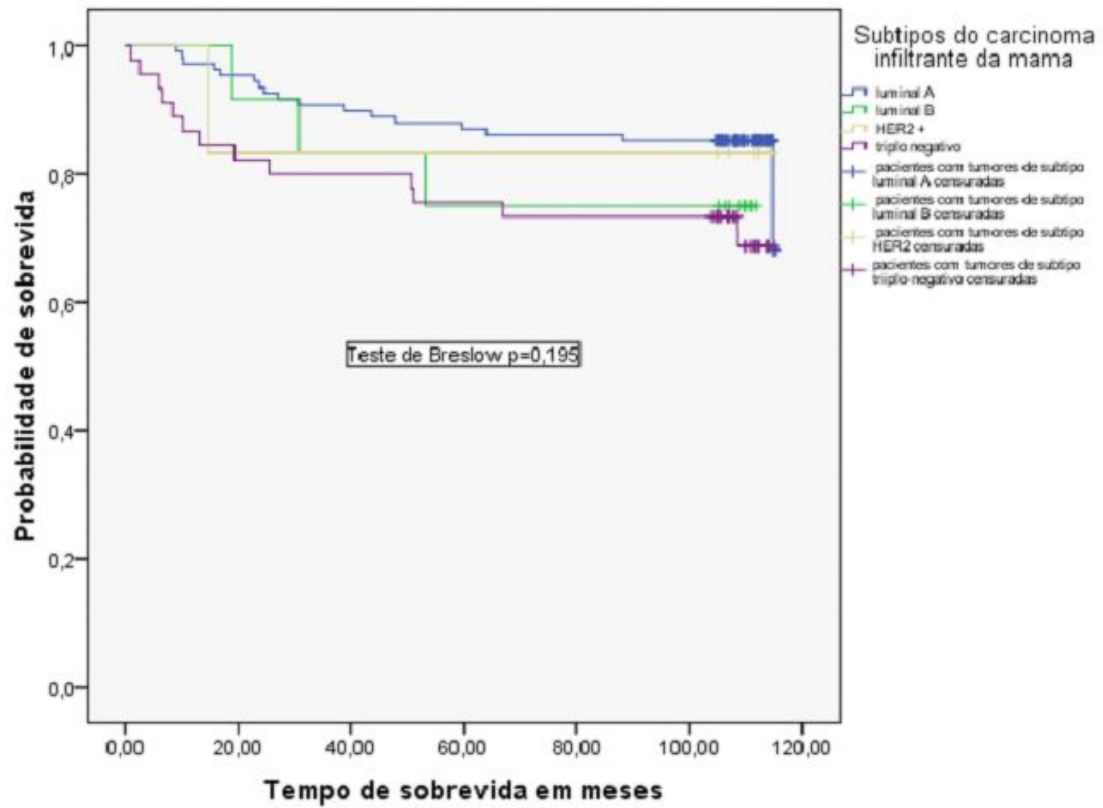


Figura 10 – Curva de sobrevivência em dez anos estratificada pelos subtipos em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

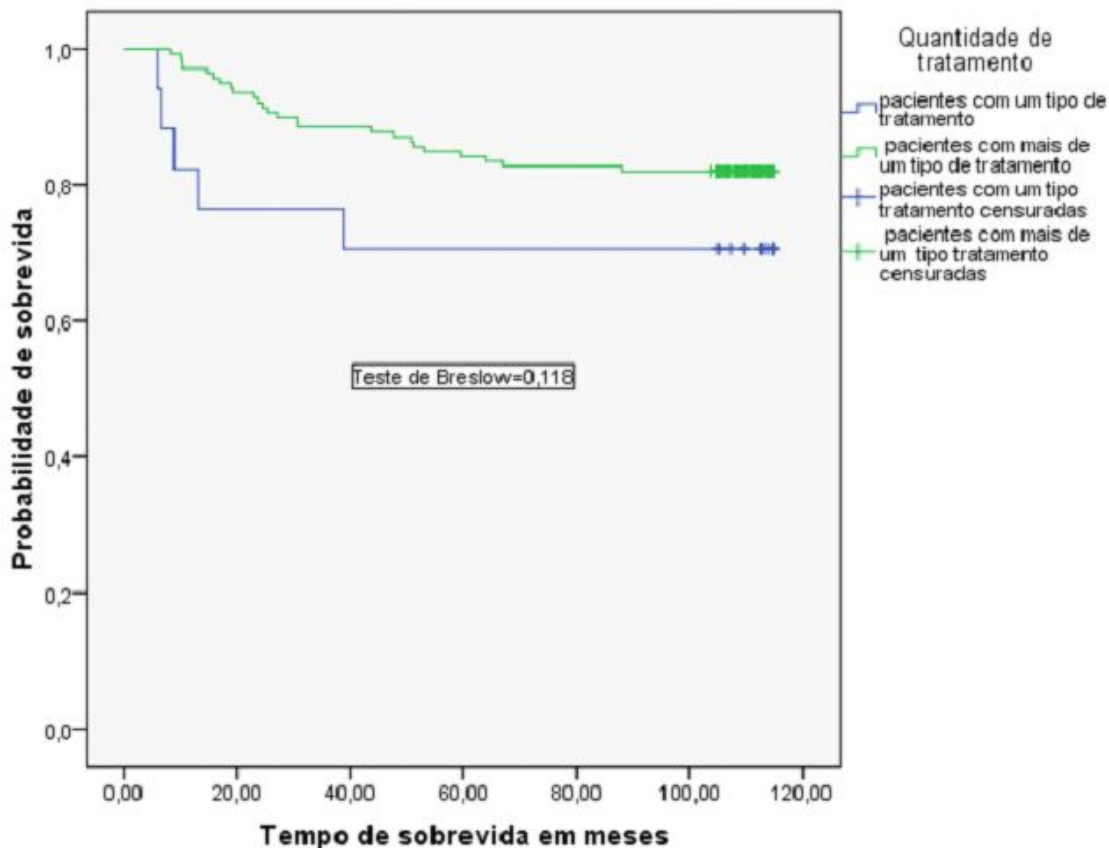


Figura 11– Curva de sobrevivida em dez anos estratificada pela quantidade de tratamento em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

Na regressão de Cox as variáveis independentes que permaneceram associadas à sobrevivida foram o *status* menopausal, comprometimento das margens cirúrgicas, metástase à distância e os subtipos luminal A, luminal B e o HER2 + (Tabela 4). O maior risco de morte foi observado em pacientes com metástases à distância (HR=12,34 IC=90% 6,34-24,04). Dentre os subtipos, o HER2 + apresentou o maior risco de morte (HR= 3,36 IC=90% 1,74-6,52). Para verificar a suposição de proporcionalidade dos riscos foi utilizada a análise de resíduos que demonstrou um bom ajuste do modelo (Figuras 12-17).

Tabela 4 - Sobrevida de pacientes com carcinoma infiltrante da mama, Hazard Ratio e respectivos intervalos de confiança (90%) na análise multivariada de Cox

Variáveis	HR	IC 90 %	p
Menopausa	2,27	1,049-4,907	0,08
Metástase à distância	12,34	6,342-24,043	0,000
Comprometimento das margens cirúrgicas	2,93	1,323-6,495	0,026
Subtipo luminal A	2,04	0,695-5,967	0,28
Subtipo luminal B	1,74	0,303-9,997	0,60
Subtipo HER2 +	3,36	1,739-6,524	0,003

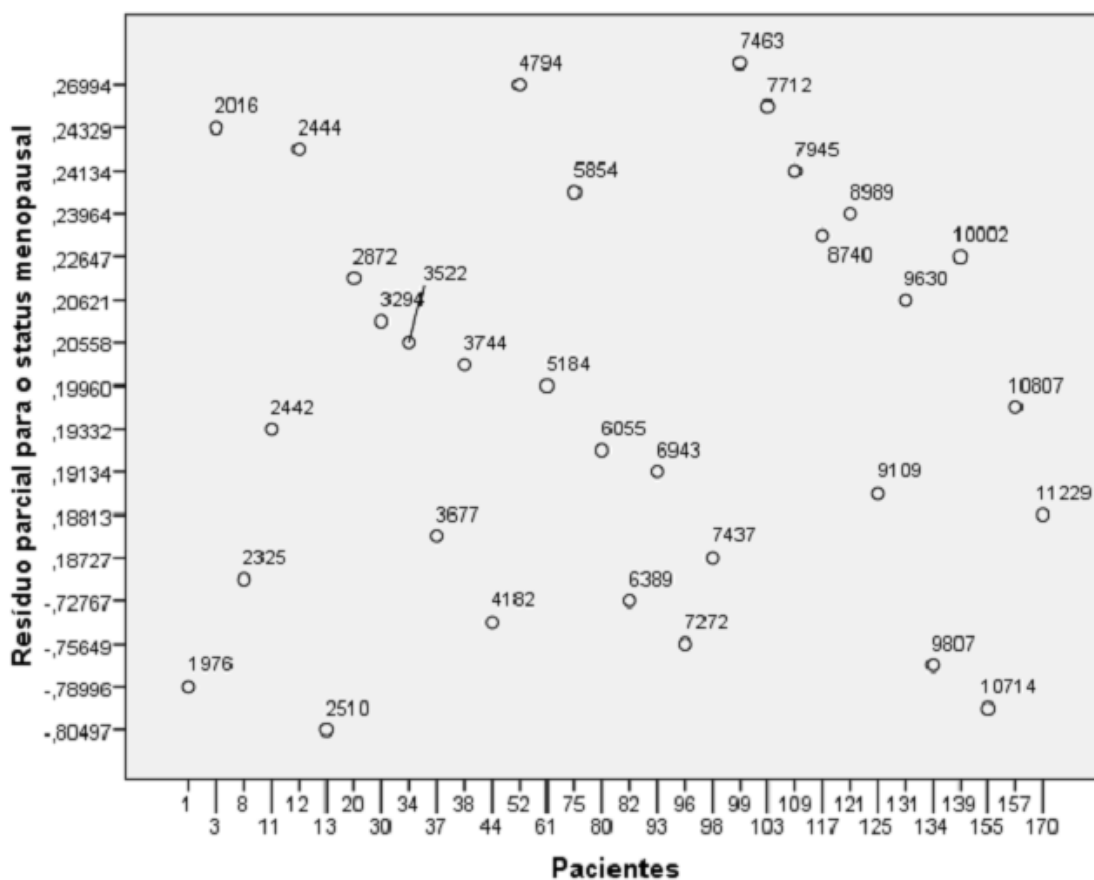


Figura 12– Análise de resíduos para o status menopausal

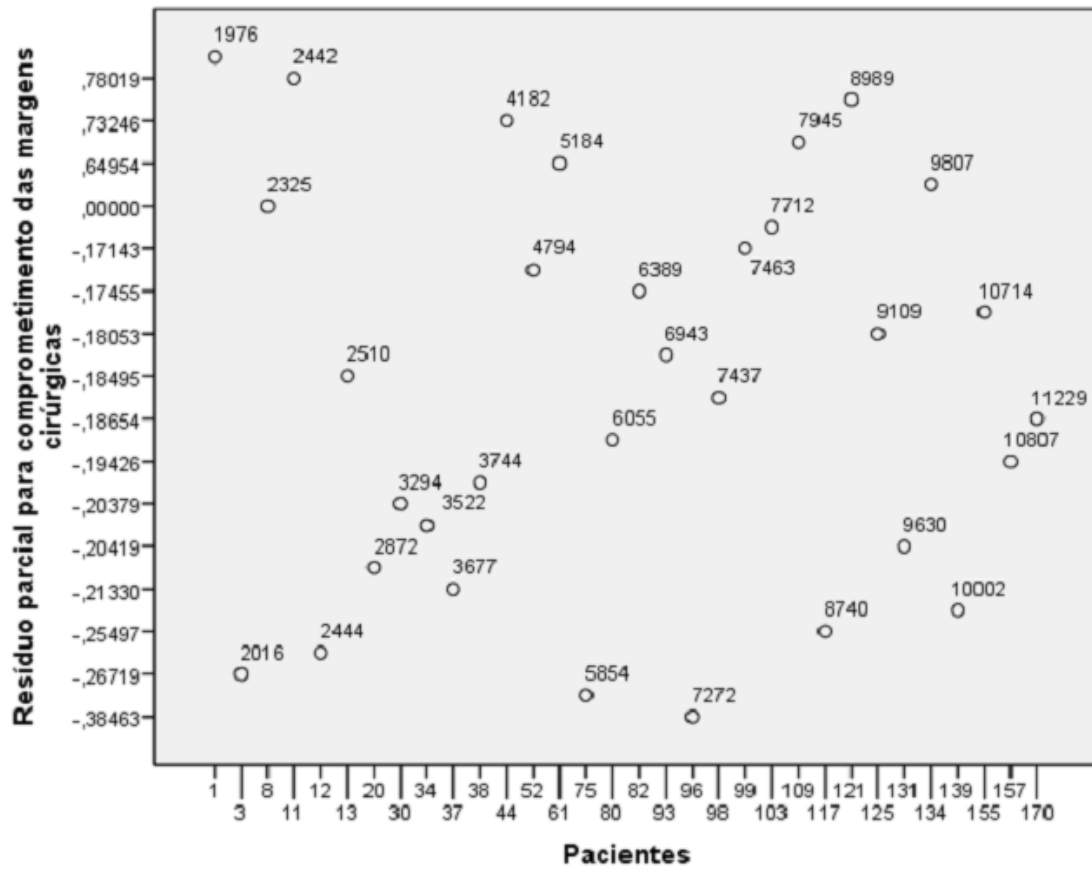


Figura 13– Análise de resíduos para o comprometimento das margens cirúrgicas

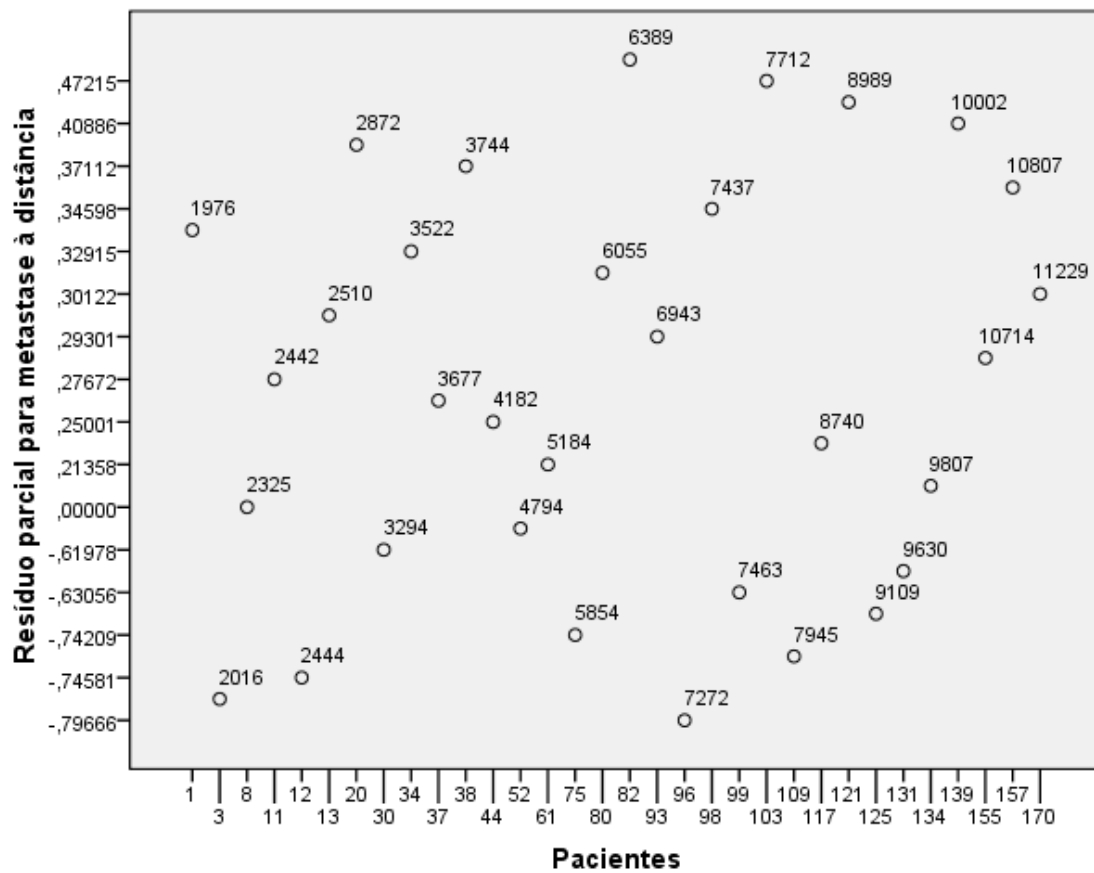


Figura 14– Análise de resíduos para metástase à distância

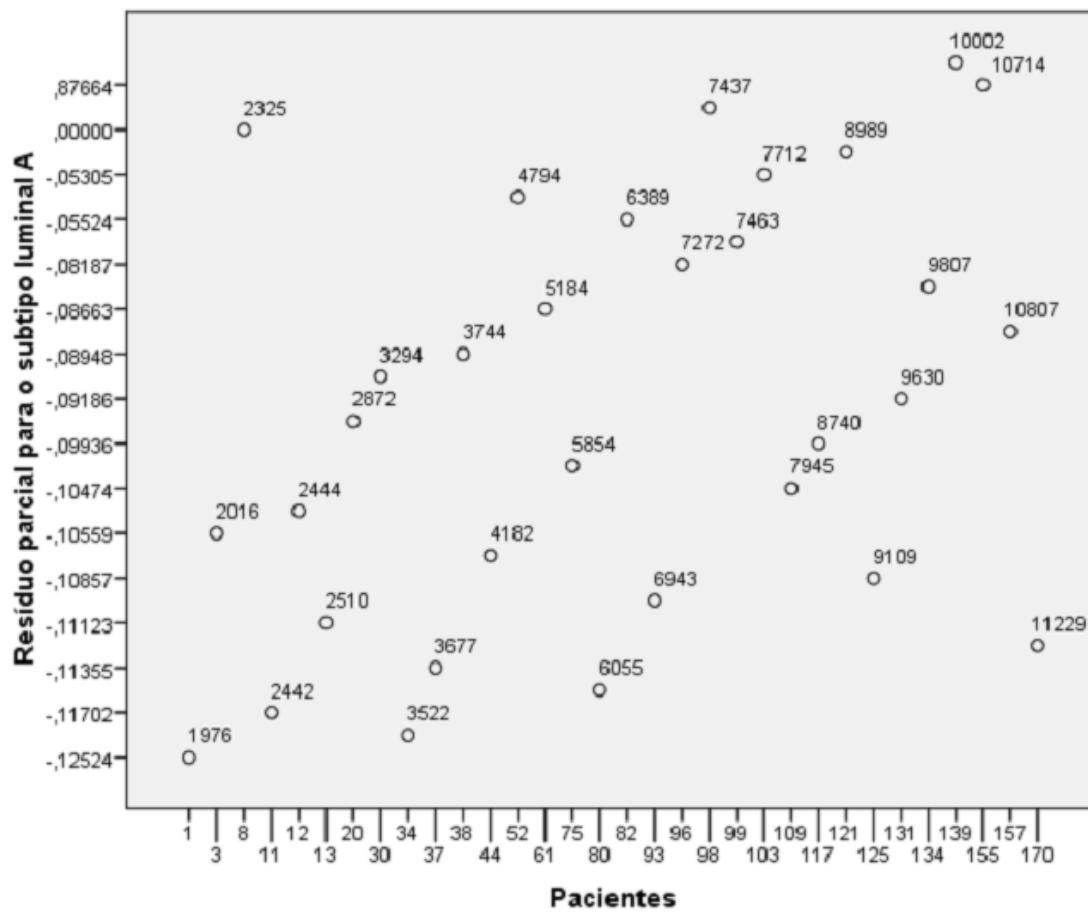


Figura 15– Análise de resíduos para o subtipo luminal A

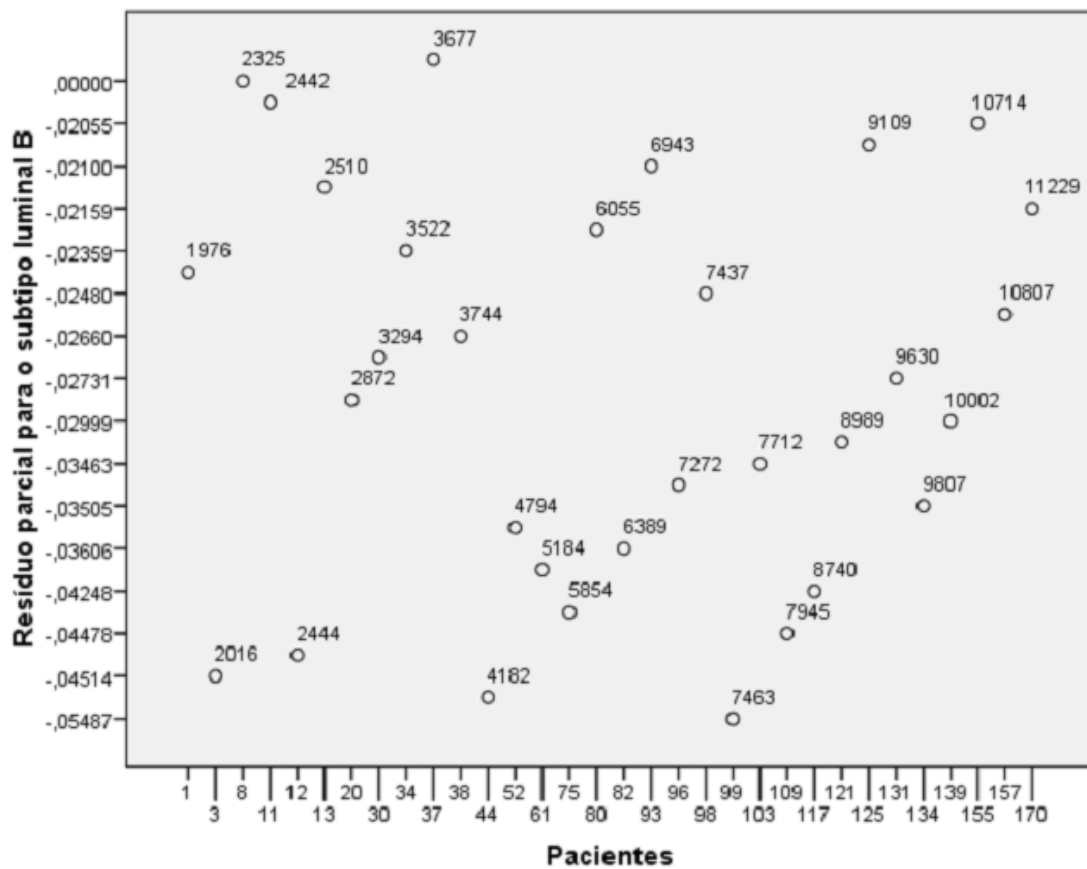


Figura 16– Análise de resíduos para o subtipo luminal B

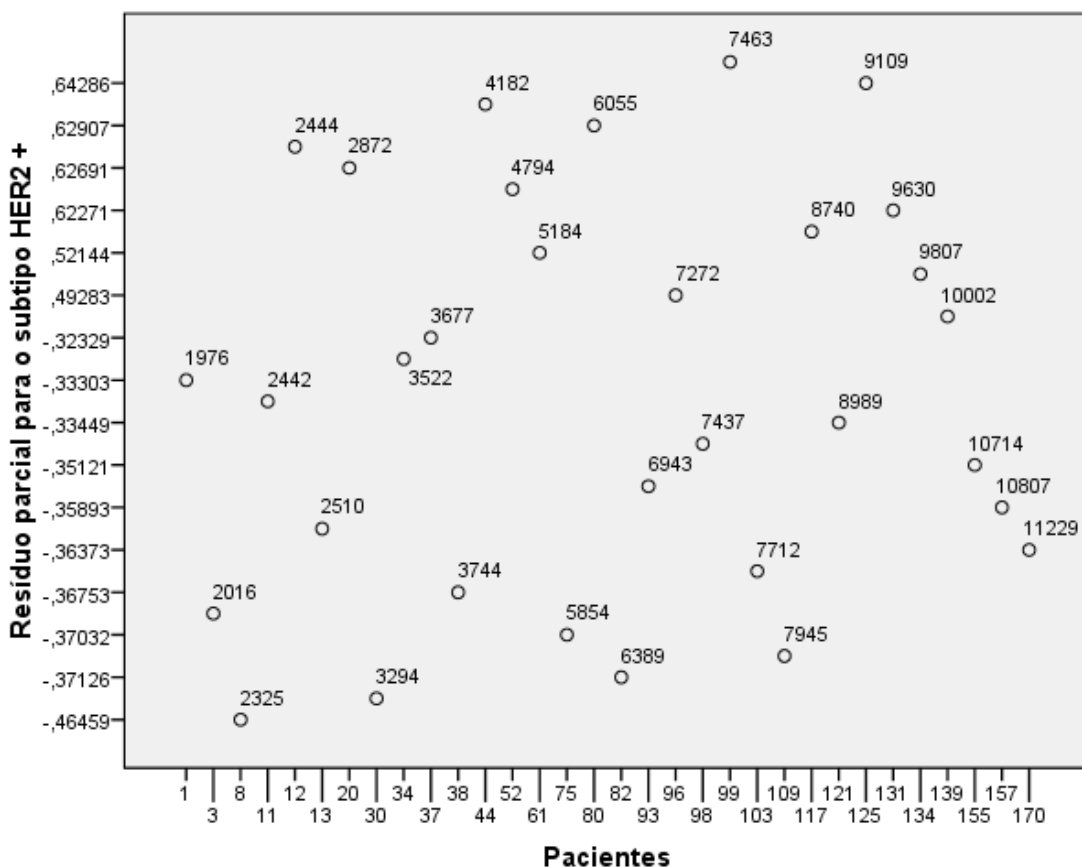


Figura 17– Análise de resíduos para o subtipo HER2 +

3.4 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea com características morfológicas e evolutivas variadas. Em um percentual significativo de pacientes os padrões morfológicos não mostram correlação com as características biológicas intrínsecas dos tumores. As características biológicas se manifestam pelo desenvolvimento tumoral representado pelo tamanho do tumor, o grau histológico, o *status* axilar e a capacidade metastática ^[9]. Estes aspectos histopatológicos são diferentes entre grupos de tumores, o que pode refletir a heterogeneidade gênica tumoral. Esta heterogeneidade entre os tumores pode ser explicada pelo tipo de célula de origem e seu perfil molecular e que poderá se traduzir em aspectos clínico-patológicos diversos ^[10].

O objetivo deste presente trabalho foi descrever os fatores clínico-patológicos e avaliar a sobrevida em um grupo de pacientes com carcinoma infiltrante da mama. Dentre os achados clínicos, a média de idade de 55 anos foi semelhante à observada em estudos realizados nas regiões do Sul, Nordeste, Sudeste e Norte do Brasil [3-8] e inferior àquela dos países desenvolvidos em que a média é de 65 anos [1]. Por sua vez, nesta população do estudo a frequência de pacientes jovens (≤ 40 anos) foi de 14%, ligeiramente mais elevada em relação a outro estudo realizado na Paraíba, que foi de 11,9 % [5]. Salienta-se ainda que neste grupo de pacientes jovens, a sobrevida foi menor, como também observado na população em estudo, que foi de 75%. Porém, o impacto da idade permanece como controverso na literatura nacional e estrangeira [4, 5, 22, 31].

A maioria das pacientes (62%) deste estudo eram menopausadas. Já foi descrita associação entre mulheres na pós-menopausa com níveis elevados de estrógeno e maior risco de câncer de mama [23]. Como em outras séries, observou-se na população estudada, maior frequência de tumores que eram receptores hormonais positivos [15, 25]. A maioria das pacientes estudadas (85,4%) não apresentava história familiar para câncer de mama, o que corrobora a incidência maior de câncer esporádico observado na literatura [26].

Nesta população, a maioria das pacientes (78,4%) não apresentou metástases à distância até o final do seguimento, observando-se, que as pacientes no estágio IV com metástases, demonstravam baixa taxa de sobrevida (50%), resultado semelhante ao encontrado no estudo realizado na Paraíba, com 52% [5]. Observou-se, também, neste estudo, baixa taxa de recidiva tumoral, achado semelhante ao observado em uma população, oriunda do mesmo hospital com axila-negativa [17].

A maioria das pacientes no presente estudo estava no estágio clínico IIA e IIB (23,4% e 18,1%) e uma menor porcentagem no estágio IV (1,2%), o que também foi observado nas regiões Sul e Nordeste do Brasil [3-5]. Este dado reflete a redução do percentual de casos avançados observados no Brasil na última década, e que podem estar relacionados à detecção mais precoce, valorizando assim as políticas de prevenção, como as campanhas de diagnóstico precoce e também à facilidade de acesso aos exames de rastreamento [24].

Em relação às características patológicas, os tumores $pT2$, de grau II e tipo histológico ductal infiltrante foram os mais frequentes na população estudada,

caracterizando assim carcinomas moderadamente diferenciados e de tamanho intermediário. Estes achados se relacionam com as taxas de sobrevida intermediária, observadas neste estudo (81,7%). Observou-se ainda uma alta frequência de metástases axilares representando mais da metade dos casos (57,3%), sendo mais elevada do que a observada nas populações do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Rio de Janeiro que demonstraram percentuais em torno de 51% [3, 6, 7]. O comprometimento axilar é considerado um fator prognóstico isolado importante no câncer de mama e que interfere também na sobrevida, o que pode ser observado neste estudo onde as pacientes com metástases axilares demonstraram menor taxa de sobrevida (74,5%) em relação as que não apresentavam [16].

Os subtipos moleculares do carcinoma mamário podem se correlacionar com as diversas características biológicas tumorais, representando uma tentativa de explicar a heterogeneidade tumoral. Neste estudo, a distribuição da frequência dos subtipos luminal A, luminal B e do HER2 + são semelhantes aos observados na literatura, sendo o luminal A o mais frequente [12-14]. O subtipo triplo-negativo demonstrou frequência mais elevada (22,8%) quando comparada com trabalhos estrangeiros e nacionais, que referiam cerca de 10% a 16% [12-14]. Este achado pode estar relacionado a características peculiares da população estudada, onde pacientes com ascendência africana demonstram maior frequência do subtipo triplo-negativo [34].

A frequência dos fatores morfológicos e prognósticos demonstrados neste trabalho é semelhante a encontrada em estudos com populações de mulheres em outros estados brasileiros [3, 5, 7]. Os estudos de caracterização do perfil clínico-patológico da população na Bahia são escassos na literatura [17], salientando-se assim a importância deste conhecimento para implantação mais individualizada de políticas de prevenção e de diagnóstico.

A taxa de sobrevida geral após dez anos na população do estudo foi de 80,1%. Quando comparada às observadas em estudos brasileiros observou-se que a taxa de sobrevida na Bahia foi discretamente superior à encontrada no estudo no Rio Grande do Sul, com taxa de 78,7% [3]. Esta taxa de sobrevida foi superior também à observada em outros estudos realizados em Santa Catarina, Paraíba, Rio de Janeiro, Paraíba e Pará, com 76,2%, 79,1%, 75% e 61% todos com tempo de seguimento de cinco anos, inferior ao do presente estudo [4, 5, 7, 8].

Em casuísticas estrangeiras, a taxa de sobrevida registrada neste estudo é semelhante à encontrada em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Suécia, Japão, Finlândia e Austrália que mostraram taxas em torno de 80% [27]. Contudo, o tempo de seguimento do presente estudo foi de aproximadamente dez anos, superior aos destes trabalhos estrangeiros que foi de quatro anos. Assim, devem-se levar em consideração, nestas comparações entre estes estudos de sobrevida, as diferenças metodológicas, os diferentes tipos de populações estudadas, bem como o período de acompanhamento.

O estadiamento clínico e o tipo de tratamento empregado são algumas das variáveis relacionadas ao risco de morte por câncer de mama e que podem influenciar as diferenças nas taxas de sobrevida. Na população estudada a maioria das pacientes se encontravam no estágio clínico IIA, onde depois do estágio I, é aquele com maior taxa de sobrevida (85%). Além disto, os esquemas combinados de tratamento foram os mais utilizados neste estudo e são aqueles associados a uma melhor taxa de sobrevida (82%). Outro dado que pode estar relacionado à maior sobrevida deste estudo é que todas as pacientes são oriundas de um hospital de referência de câncer e podem ter um acesso mais fácil aos métodos diagnósticos, bem como ao estadiamento e tratamento.

Salienta-se ainda que os estudos de sobrevida na população nordestina com câncer de mama são praticamente inexistentes, observando-se apenas aquele do estado da Paraíba [5]. Assim, no presente estudo identificou-se o tamanho tumoral, *status* axilar, comprometimento das margens cirúrgicas e metástases à distância como os fatores significantes que influenciaram nas taxas de sobrevida neste grupo de pacientes na Bahia.

Os estudos de sobrevida realizados em regiões brasileiras demonstraram também que o tamanho tumoral e metástases axilares e à distância eram fatores que influenciaram diretamente as taxas de sobrevida [4-8]. Em outros estudos observaram-se que tumores de 5,0 cm ou mais com metástases axilares demonstravam redução da taxa de sobrevida quando comparados aos tumores *pT1* [28,29]. Ressalta-se que estes fatores são determinantes no estadiamento clínico e patológico e fazem parte do TNM preconizado pela União Internacional contra o Câncer (UICC) [18]. Salienta-se ainda, a importância da padronização destas variáveis que devem constar nos laudos histopatológicos dos tumores mamários.

Na análise multivariada além do comprometimento das margens cirúrgicas e da metástase à distância, o status menopausal e os subtipos luminal A, luminal B e o HER2 + permaneceram como as variáveis independentes associadas ao óbito nesta população. As margens cirúrgicas comprometidas representam um fator histopatológico associado com a recidiva loco-regional ^[30]. Desta forma a análise criteriosa das margens cirúrgicas na população estudada, pode auxiliar na determinação das pacientes com maior risco de recidiva.

As metástases à distância estavam presentes em 61,8% das pacientes que foram a óbito, demonstrando a importância destas manifestações na sobrevida, observando-se também um maior risco de morte dentre as variáveis significantes para a sobrevida. Este dado pode refletir a menor taxa de sobrevida observada no estágio IV (50%) nesta população do estudo, onde a presença de metástase à distância é definidora deste estadiamento. Ressalta-se assim novamente a importância do estadiamento TNM na determinação do prognóstico ^[18].

Dentre os subtipos, o HER2 + apresentou maior risco de morte, que poderia estar associado com a relação deste subtipo e também do triplo-negativo com fatores de pior prognóstico, tais como tumores de maior dimensão, grau histológico III, metástases axilares e recidiva tumoral ^[32,33]. Uma maior frequência de metástases à distância e recidiva tumoral já foi observada nesta população do estudo nos subtipos HER2 + e no triplo negativo (dado não publicado).

Dentre as características encontradas nesta população com carcinoma infiltrante da mama, destacaram-se alguns achados como média de idade menor que aquela dos países desenvolvidos e semelhantes à de algumas regiões brasileiras; taxas de sobrevida semelhantes às destes países e superior à das regiões brasileiras e uma frequência mais elevada do subtipo triplo-negativo em comparação com as casuísticas estrangeiras e nacionais. Os demais achados epidemiológicos foram semelhantes àqueles de trabalhos nacionais e internacionais.

Este presente estudo demonstra ainda a importância dos prontuários médicos no levantamento de dados secundários como os referentes ao TNM e de dados epidemiológicos como idade, menopausa e outros fatores que podem influenciar no prognóstico das pacientes com carcinoma infiltrante da mama. Além disto, o conhecimento de fatores relacionados à sobrevida no câncer de mama pode servir para a caracterização prognóstica das pacientes, bem como auxiliar na

determinação de condutas terapêuticas mais individualizadas, possibilitando uma abordagem técnica mais realista.

3.5 REFERÊNCIAS

[1] JEMAL, A. et al. Global câncer statistics. **CA Cancer J Clin.** 2011; 61(2):69-90.

[2] INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2012.** Rio de Janeiro: Inca, 2011.118 p.

[3] MORAES, A. B. et al. Estudo da sobrevida de pacientes com câncer de mama atendidas no hospital da Universidade Federal de Santa Maria. Rio Grande do Sul - Brasil. **Cad. Saúde Pública** 2006; 22:2219-28.

[4] SCHNEIDER, I. J. C.; D'ORSI, E. Sobrevida em cinco anos e fatores prognósticos em mulheres com câncer de mama em Santa Catarina, Brasil. **Cad. Saúde Pública.** Rio de Janeiro, v. 25, n. 6, June 2009.

[5] BASÍLIO, R. L. S. **Sobrevida de mulheres portadoras de câncer de mama e fatores associados** [Dissertação de Mestrado]. Paraíba: Universidade Estadual da Paraíba; 2011.

[6] GUERRA, M. R. et al. Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública** 2009; 25(11): 2455-66.

[7] MENDONÇA, G. A. S. et al. Características tumorais e sobrevida de cinco anos em pacientes com câncer de mama admitidas no Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro - Brasil. **Cad. Saúde Pública** 2004; 20:1232-9.

[8] PEREIRA, W. M. M. **Mortalidade e sobrevida por câncer de mama, no Estado do Pará** [Dissertação de Mestrado]. Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública/Fundação Oswaldo Cruz; 2001.

- [9] PAGE, D. L. The epidemiology of tumor markers in breast cancer management: prognostic markers. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1994 Mar; 3(2):101-4. **Review.** PubMed PMID: 8049630.
- [10] BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D. Reasons for breast cancer heterogeneity. *J Biol.* 2008; 7(2):6. PMCID: PMC2263121
- [11] 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 cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer.* 2005 Sep 1; 116(3):340-50. PubMed PMID: 15818618
- [12] NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15; 10(16):5367-74. PubMed PMID: 15328174.
- [13] CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006 Jun. 7; 295(21): 2492-502. PubMed PMID: 16757721
- [14] DUTRA, M. C. et al. Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very young and postmenopausal women]. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009 Feb;31(2):54-60. Portuguese. PubMed PMID: 1940790.
- [15] PAYNE, S. J.; BOWEN, R. L.; JONES, J. L.; WELLS, C. A. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology.* 2008 Jan; 52(1):82-90.
- [16] ABREU, E.; KOIFMAN, S. **Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 48, n.1, Jan/Fev./Mar, 2002. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_48/v01/pdf/revisao.pdf>. Acesso em: 10/02/2013.
- [17] RAMOS FILHO, A. O. A. et al. Fatores preditivos de recidiva do carcinoma mamário axila-negativo. *Revista Brasileira de Cancerologia,* 2002, 48(4): 499-503.
- [18] EDGE, S. B. American Joint Committee on Cancer: **AJCC cancer staging manual.** 7th edition. New York: Springer; 2010.
- [19] ROBBINS, P. et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol.* 1995 Aug; 26(8):873-9. PubMed PMID: 7635449.

- [20] FITZGIBBONS, P. L. et al., Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med.** 2000 Jul;124(7):966-78. Review. PubMed PMID: 10888772.
- [21] KLEINBAUM, D. G.; KLEIN, M. Survival Analysis. **A self-learning text.** 2th edition, New York: Springer, 2005
- [22] KOLLIAS, J et al. Early-onset breast cancer--histopathological and prognostic considerations. **Br J Cancer.** 1997;75(9):1318-23. PubMed PMID: 9155052; PubMed Central PMCID: PMC2228226
- [23] KEY, T.; APPLEBY, P.; BARNES, I.; REEVES, G. Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. **J Natl Cancer Inst.** 2002 Apr. 17;94(8):606-16. PubMed PMID: 11959894
- [24] MARTINS, E. et al. Evolução temporal dos estádios do câncer de mama ao diagnóstico em um registro de base populacional no Brasil Central. **Rev. Bras. Ginecol. Obstet.** 2009;31(5): 219-23.
- [25] NADJI, M.; GOMEZ-FERNANDEZ, C.; GANJEI-AZAR, P.; MORALES, A. R. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. **Am J Clin Pathol.** 2005 Jan;123(1):21-7. PubMed PMID: 15762276
- [26] COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet.** 2001 Oct 27;358(9291):1389-99. Review. PubMed PMID: 11705483
- [27] COLEMAN, M. P. et al. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). **Lancet Oncol.** 2008 Aug;9(8):730-56. PubMed PMID: 18639491.
- [28] CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D. E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer.** 1989 Jan 1;63(1):181-7. PubMed PMID: 2910416.

[29] KOSCIELNY, S. et al. Impact of tumour size on axillary involvement and distant dissemination in breast cancer. **Br J Cancer**. 2009 Sep 15;101(6):902-7. PubMed Central PMCID: PMC2743352.

[30] BEHM, E. C. et al. Surgical margins and risk of locoregional recurrence in invasive breast cancer: An analysis of 10-year data from the Breast Cancer Treatment Quality Assurance Project. **Breast**. 2013. PubMed PMID: 23523179.

[31] KETCHAM, A. S.; SINDELAR, W. F. Risk factors in breast cancer. **Prog Clin Cancer**. 1975;6:99-114. Review. PubMed PMID: 1105679.

[32] ZAHA, D. C.; LAZĂR, E.; LĂZUREANU, C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. **Rom J Morphol Embryol**. 2010;51(1):85-9. PubMed PMID: 20191125

[33] BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**. 2007 May 1;109(9):1721-8. PubMed PMID: 17387718

[34] CORRÊA, P. B. et al. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. **Revista Ciências Médicas e Biológicas** v. 9, p. 3-7, 2010

3.6 APÊNDICE



LIGA BAHIANA CONTRA O CÂNCER
HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ
DEPARTAMENTO DE ENSINO E PESQUISA

Salvador, 31 de março de 2010

CI Nº 11/2010

Dra. Helenemarie Schaer Barbosa
Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HAM

Comunicamos a V.Sa., ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Artur Ventura de Matos as pesquisas intituladas “**CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS CARCINOMAS DA MAMA E CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICOS**” dos pesquisadores **Helenemarie Schaer Barbosa e Claudia Leal Macedo**, a serem realizados nesse Serviço.

Atenciosamente,

Enfa. Stela Maria Leal Pinto Dantas
Presidente do DEP

ANEXO 2 ESTADIAMENTO CLINICO E PATOLÓGICO

CLASSIFICAÇÃO TNM CLÍNICA, UICC, 2003
Classificação clínica (cTNM) 6ª edição (UICC)
T Tumor primário
Tx Tumor primário não pode ser avaliado
T0 Não há evidência de tumor primário
Tis Carcinoma <i>in situ</i> Tis (CDIS) Carcinoma ductal <i>in situ</i> Tis (CLIS) Carcinoma lobular <i>in situ</i> Tis (Paget) Doença de Paget do mamilo sem tumor na mama
Nota: A doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor
T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão. T1mic Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão Notas: Microinvasão é a extensão de células neoplásicas além da membrana basal, alcançando os tecidos adjacentes, sem focos tumorais maiores do que 0,1 cm em sua maior dimensão. Quando há focos múltiplos de microinvasão, somente o tamanho do maior foco é utilizado para classificar a microinvasão. (Não usar a soma dos focos individuais) A presença de múltiplos focos de microinvasão deve ser anotada como se faz com os carcinomas invasores extensos múltiplos. T1a Com mais de 0,1 cm, até 0,5 cm em sua maior dimensão T1b Com mais de 0,5 cm, até 1 cm em sua maior dimensão T1c Com mais de 1 cm, porém não mais de 2 cm em sua maior dimensão
T2 Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão
T3 Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4 Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele, somente como descritos em T4a a T4d Nota: A parede torácica inclui costelas, músculos intercostais, músculo serrátil anterior, mas não inclui o músculo peitoral. T4a Extensão à parede torácica T4b Edema (inclusive "pele de laranja" 'peau d'orange'), ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama T4c Ambos (T4a e T4b), acima T4d Carcinoma inflamatório
Nota: O carcinoma inflamatório da mama é caracterizado por um endurecido difuso e intenso da pele da mama com bordas erisipelóides, geralmente sem massa tumoral subjacente. Se a biópsia de pele for negativa e não existir tumor primário localizado mensurável, o carcinoma inflamatório clínico (T4d) é classificado patologicamente como pTX. A retração da pele, do mamilo ou outras alterações cutâneas, exceto aquelas incluídas em T4b e T4d, podem ocorrer em T1, T2 ou T3, sem alterar a classificação.
N Linfonodos regionais
NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (p. ex., por terem sido previamente removidos)
N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais N1 Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral(ais), móvel(eis)

N2 Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)

N2a Metástase em linfonodo(s) axilar(es) fixos uns aos outros ou a outras estruturas

N2b Metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)

N3 Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s)

Notas: *cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia)

N3a Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es)

N3b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) e axilares

N3c Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)

M - Metástase à Distância

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância

A categoria M1 pode ser adicionalmente especificada de acordo com as seguintes notações:

Pulmonar PUL (C34)

Medula óssea MO [MAR](C42.1)

Óssea OSS (C40, 41)

Pleural PLE (C38.4)

Hepática HEP (C22)

Peritoneal PER (C48.1,2)

Cerebral CER [BRA] (C71)

Supra-renal (Adrenal) ADR (C74)

Linfonodal LIN [LYM](C77)

Pele CUT [SKI](C44)

Outras OUT [OTH]

Copyright © 1996-2007 INCA - Ministério da Saúde

pT - Tumor Primário

A classificação histopatológica requer o exame do carcinoma primário sem tumor macroscópico nas margens de ressecção. Um caso pode ser classificado como

pT se houver somente tumor microscópico em uma margem.

As categorias pT correspondem às categorias T.

Nota: Ao se classificar a categoria pT, o tamanho do tumor é a medida do componente invasivo. Se há um grande componente in situ (p. ex., 4 cm) e um pequeno componente invasor (p. ex., 0,5 cm), o tumor é codificado como pT1a.

pN - Linfonodos Regionais

A classificação histopatológica requer a ressecção e o exame, pelo menos, dos linfonodos axilares inferiores (nível I). Tal ressecção incluirá, geralmente, 6 ou mais linfonodos. Se os linfonodos são negativos, mesmo que o número usualmente examinado seja não encontrado, classifica-se como pN0.

O exame de um ou mais linfonodos sentinelas pode ser usado para a classificação patológica. Se a classificação é baseada somente em biópsia do linfonodo sentinela sem dissecação subsequente dos linfonodos axilares, deve ser designado como (sn) para linfonodo sentinela, p. ex., pN1(sn).

pNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (não removidos para estudo ou previamente removidos) pN0 Ausência de metástase em linfonodos regionais*

Nota: *Casos somente com células tumorais isoladas (CTI [ITC]) nos linfonodos regionais são classificados como pN0. As CTI [ITC] são células tumorais únicas ou em pequenos grupamentos celulares, não maiores que 0,2 mm em sua maior dimensão, que são geralmente detectadas por imunohistoquímica ou métodos moleculares, mas que poderiam ter sido verificados pela coloração de rotina (H&E). As CTI [ITC], tipicamente, não mostram evidência de atividade metastática, p. ex., proliferação ou reação estromal.

pN1mi Micrometástase (maior que 0,2 mm, porém não maior que 2 mm em sua maior dimensão)

pN1 Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), e/ou linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is) com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente**

pN1a Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) incluindo pelo menos um maior que 2 mm em sua maior dimensão

pN1b Metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente**

pN1c Metástase em 1-3 linfonodos axilares e metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodosentinela, porém não clinicamente aparente**

pN2 Metástase em 4-9 linfonodos axilares homolaterais, ou em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), clinicamente aparente***, na ausência de metástase em linfonodos axilares

Notas: **não clinicamente aparente = não detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia).

***cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia) ou macroscopicamente visível patologicamente.

pN2a Metástase em 4-9 linfonodos axilares incluindo, pelo menos, um maior que 2 mm

pN2b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), clinicamente aparente, na ausência de metástase em linfonodos axilares

pN3 Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares homolaterais; ou em linfonodos infra-claviculares homolaterais; ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais de 3 linfonodos axilares clinicamente negativos, metástase microscópica em

linfonodos mamários internos; ou em linfonodos supraclaviculares homolaterais
 pN3a Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos um maior que 2 mm) ou metástase em linfonodos infraclaviculares
 pN3b Metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na presença de linfonodos axilares positivos; ou metástase em mais de 3 linfonodos axilares e em linfonodos mamários internos com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente
 pN3c Metástase em linfonodos supraclaviculares

pM - Metástase à distância

As categorias pM correspondem às categorias M.

Sumarizando essas classificações teremos o agrupamento dessas classificações em estágios, conforme o quadro a seguir:

Grupamento por Estádios

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1 ¹	N0	M0
Estádio II	T0	N1	M0
IIA	T1 ¹	N1 ¹	M0
	T2	N0	M0
Estádio	T2	N1	M0
IIB	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
	T1 ¹	N2	M0
	T2	N2	M0
	T3	N1, N2	M0
Estádio	T4	N0, N1,	M0
IIIB		N2	
Estádio	Qualquer	N3	M0
IIIC	T		
Estádio	Qualquer	Qualquer	M1
IV	T	N	

Nota: 1. T1 inclui o T1mic.

ANEXO 3 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS HISTOLÓGICOS**Carcinoma microinvasivo****Carcinoma mamário invasivo****Carcinoma ductal invasivo, SOE****Carcinoma tipo misto****Carcinoma pleomórfico****Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto****Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos****Carcinoma com elementos melanóticos****Carcinoma lobular invasivo****Carcinoma lobular clássico****Carcinoma lobular sólido****Carcinoma lobular alveolar****Carcinoma lobular pleomórfico****Carcinoma túbulo-lobular****Carcinoma lobular misto****Carcinoma tubular****Carcinoma cribriforme invasivo****Carcinoma com elementos medulares****Carcinoma medular****Carcinoma medular atípico****Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares****Carcinoma mucinoso****Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete****Carcinoma micropapilar invasivo****Carcinoma com diferenciação apócrina****Carcinoma metaplásico sem tipo especial****Carcinoma adenoescamoso de baixo grau****Carcinoma metaplásico fibromatose-símile****Carcinoma de células escamosas****Carcinoma de células fusiformes****Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal****Diferenciação condroide**

Diferenciação óssea

Diferenciação em outros tipos mesenquimais

Carcinoma metaplásico misto

Carcinoma mioepitelial

Fonte: OMS: Organização Mundial da Saúde; SOE: sem outra especificação.

4 ARTIGO 2

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DO CARCINOMA INFILTRANTE DA MAMA COM SUBTIPOS MOLECULARES TRIPLO-NEGATIVO E HER2 +.*Cláudia Leal Macêdo***Ivana Lucia Oliveira Nascimento ****Marco Antônio Vasconcelos Rêgo*****Helenemarie Schaer Barbosa*******RESUMO**

Objetivo: Analisar a frequência dos subtipos moleculares e as associações dos subtipos HER2 + e triplo-negativo com fatores prognósticos e preditivos em uma população de pacientes mastectomizadas. **Materiais e Métodos:** Em 171 pacientes realizou-se o estudo descritivo das variáveis clínico-patológicas. Na classificação dos subtipos os escores dos receptores hormonais foram obtidos por meio dos laudos imunoistoquímicos, sendo realizado a técnica imunoistoquímica para o marcador HER2. Utilizou-se a razão de prevalência como medida de associação entre os subtipos HER2 + e triplo-negativo e as variáveis clínicas e patológicas. **Resultados:** O subtipo luminal A foi observado em 65,5% dos tumores, o luminal B em 8,2%, o HER2 + em 3,5% e o triplo-negativo em 22,8% tumores. A maior percentagem de pacientes com idade acima de 40 anos foi nos tumores triplo-negativo (92,3%), já nas pacientes com idade \leq 40 anos, o subtipo HER2 + foi o mais frequente (33,3%). O grau histológico III e os tumores pT3 foram mais frequentes nos tumores triplo-negativos (59,0% e 41% respectivamente). Os subtipos HER2 + e triplo-negativo foram mais prevalentes nos pacientes com tumores de grau histológico III (RP=2,62 IC=95% 1,56-4,40) e também nos tumores pT3 (RP=1,81 IC=95% 1,10-2,97). **Conclusão:** O tamanho tumoral e grau histológico além da expressão imunoistoquímica dos receptores hormonais e da proteína HER2 permitem a definição consistente do perfil imunofenotípico bem como a associação com os subtipos considerados de pior prognóstico, HER2 + e triplo-negativo.

* Mestre em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia. Doutoranda de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. E-mail: claudiamacedo14@hotmail.com. Endereço para correspondência: Rua Sócrates Guanaes Gomes; n°. 107 apto. 1301; Bairro: Cidade Jardim; Salvador – BA.

** Doutora em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia. Docente na Universidade Federal da Bahia- UFBA. ICS- Instituto Ciências de Saúde; PPGIm (Programa de Pós Graduação em Imunologia). E-mail: ivana@nob-ba.com.br

*** Doutor em Saúde Coletiva, pela Universidade Federal da Bahia. Docente na Universidade Federal da Bahia- UFBA. FAMED- Faculdade de Medicina da UFBA. E-mail: mrego@ufba.br

**** Doutora em Patologia Humana, pela Universidade Federal da Bahia. Patologista do Hospital Aristides Maltez- Salvador – BA. E-mail: hschaer@uol.com.br

Palavras-chave: Câncer de mama. Imunoistoquímica. Medida de associação. Molecular. Prognóstico.

4.1 INTRODUÇÃO

O carcinoma mamário apresenta características clínicas e evolutivas heterogêneas que podem traduzir a diversidade biológica tumoral. Os marcadores moleculares isolados ou combinados tem sido utilizados na tentativa de interpretar a relação entre a biologia e o comportamento tumoral. Um conhecimento ainda limitado do perfil genômico dos carcinomas mamários foi alcançado com o estudo de microarranjos de c-DNA e procurou-se com a caracterização dos subtipos moleculares baseada nos padrões moleculares de expressão gênica relacionar o perfil morfológico e imunofenotípico com características prognósticas e preditivas ^[1, 2, 3]. Posteriormente, com a necessidade de métodos menos complexos e mais adaptados à rotina clínico-laboratorial, utilizou-se o estudo imunoistoquímico como substituto para a expressão gênica tumoral, correlacionando-se estes subtipos com fatores prognósticos e preditivos ^[3-8].

Esta classificação dos subtipos baseada inicialmente na expressão do receptor de estrógeno (RE), no receptor de progesterona (RP) e na proteína HER2 caracterizou o subtipo luminal A, como aqueles que são RE +/RP +/ HER2-; o luminal B como RE +/RP+/HER2 + ; o subtipo HER2 + como RE -/RP-/HER2 + e o triplo-negativo com todos os três marcadores negativos [9-11]. Com a adição da análise da expressão da CK 5/6 e do EGFR estes tumores triplo-negativos foram designados como do subtipo basal-*símile*, quando positivos para estes últimos marcadores. Deste modo foi também caracterizado outro subtipo designado como “mama normal”, que demonstra negatividade para todos os cinco marcadores tumorais utilizados ^[3, 6, 12].

Esta classificação pretende traduzir o perfil gênico e imunoistoquímico, bem como as associações entre estes marcadores tumorais. Assim tumores que são RE negativos podem estar associados à positividade ou negatividade do HER2 caracterizando o subtipo HER2 + e o triplo-negativo, respectivamente. A negatividade para o receptor hormonal e a superexpressão da proteína HER2 podem estar correlacionadas a fatores de pior prognóstico, tais como grau

histológico elevado, recidiva tumoral e sobrevida curta ^[13]. Os tumores de subtipo luminal A são mais frequentes e podem ser considerados como de melhor prognóstico, enquanto que os de subtipo luminal B podem estar associados com fatores de pior prognóstico ^[5, 7, 8]. Apesar das frequências mais elevadas dos subtipos luminais, a relevância desta classificação têm sido na identificação dos subtipos considerados de pior prognóstico, HER2 + e triplo-negativo ^[3, 4, 10, 11, 14].

Em casuísticas estrangeiras a frequência dos subtipos moleculares do carcinoma infiltrante da mama bem como as suas correlações com os fatores clínicos e patológicos vêm sendo determinados em alguns trabalhos ^[1, 3, 4, 15]. Contudo, no Brasil e principalmente na Bahia, são escassos os trabalhos de caracterização imunoistoquímica dos subtipos tumorais, bem como a sua associação com fatores clínicos e histopatológicos ^[12, 16, 17]. O objetivo básico deste trabalho é analisar a frequência dos diversos subtipos e caracterizar a associação dos subtipos considerados de pior prognóstico (HER2 + e triplo-negativo) com fatores prognósticos e preditivos em uma população de pacientes provenientes de um hospital oncológico na Bahia.

4.2 MATERIAIS E MÉTODOS

4.2.1 Tipo de investigação e população do estudo

Trata-se de um estudo analítico observacional do tipo transversal. A população de estudo foi constituída por todas as 312 pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma infiltrante da mama no ano de 2002 e submetidas à mastectomia simples. Estes dados foram obtidos no Hospital Aristides Maltez (HAM), referência para o tratamento de câncer no estado da Bahia. Desta população, foram excluídos 141 prontuários (28 não acessíveis devido a problemas técnicos, 110 devido à ausência de blocos parafinados com tumor no arquivo e três por serem de pacientes do sexo masculino). Nos cento e treze prontuários excluídos, todas as variáveis clínicas e patológicas foram categorizadas e demonstravam similaridade

com a população amostrada. A população efetivamente estudada foi constituída por 171 pacientes do sexo feminino.

4.2.2 Coleta de dados e variáveis estudadas

Os dados foram coletados a partir dos prontuários médicos de todas as pacientes submetidas à mastectomia simples e retirada dos linfonodos axilares cujo diagnóstico histopatológico foi feito entre primeiro de janeiro de 2002 e 31 de dezembro de 2002. Para a coleta de dados foi elaborada uma ficha padronizada (ANEXO 1). Foram analisadas as variáveis clínicas e patológicas e aquelas referentes aos escores dos marcadores imunoistoquímicos para classificação dos subtipos.

Foram analisadas as seguintes variáveis clínicas: data do diagnóstico, idade ao diagnóstico (em anos) categorizada em ≤ 40 anos e ≥ 40 anos. As variáveis paridade, história familiar, recidiva e metástases à distância foram categorizadas em: sem informação, sim, não. O *status* menopausal foi determinado pela informação do prontuário em sim, não e sem informação. Devido à escassez de informações em parte dos prontuários, o estadiamento clínico foi avaliado em 136 prontuários, sendo categorizados em estádios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV, segundo a União Internacional contra o Câncer (UICC) ^[18] (ANEXO 2).

As variáveis patológicas foram caracterizadas como tamanho tumoral, grau histológico, tipo histológico, *status* axilar e comprometimento das margens cirúrgicas. O tamanho tumoral foi determinado pelo estadiamento *p*TMN, considerando apenas o tamanho tumoral (T) ^[18]. Estas medidas foram classificadas como *p*T1, *p*T2 e *p*T3. Não houve tumores classificados como *p*T4 (ANEXO 2). Para determinação da variável grau histológico foi utilizado o sistema de graduação microscópica de Bloom-Richardson modificado nos casos de carcinoma ductal infiltrante (SOE) ^[19]. Foram considerados os graus I, II e III, de acordo com a soma das pontuações: grau I-bem diferenciado; grau II-moderadamente diferenciado e grau III-pouco diferenciado. Para a classificação histológica dos tumores foi empregada às recomendações do Colégio Americano de Patologistas ^[20] e OMS (ANEXO3). O *status* axilar foi categorizado como: sem informação, positivo, negativo. As margens

cirúrgicas comprometidas foram consideradas como aquelas com medida inferior a 1,0 mm e foram categorizadas em sem informação, sim, não. Na variável tratamento consideraram-se todos aqueles feitos nesta população até o período final do acompanhamento, sendo categorizado como: sem informação, hormonioterapia, quimioterapia, radioterapia e tratamentos combinados.

Em relação aos marcadores imunoistoquímicos, os escores dos receptores hormonais (RE e RP), foram obtidos por meio dos resultados dos exames imunoistoquímicos do laboratório de patologia do HAM, sendo realizado a técnica imunoistoquímica para o marcador HER2. As variáveis utilizadas representaram os escores de quantificação dos receptores hormonais e da proteína HER2, que foram categorizados em positivo e negativo.

4.2.3 Técnica histopatológica

Foram selecionados os blocos de parafina com tecido tumoral e realizados cortes sequenciais em micrótomo convencional com espessura de 4 micrômetros. Foram confeccionadas duas secções histológicas a partir de cada bloco tumoral. As secções histológicas foram estendidas em lâminas de vidro previamente tratadas com adesivo à base de silano (3-aminopropyltriethoxi-silano). Uma das lâminas foi corada pela hematoxilina-eosina para revisão histológica do grau e tipo histológico que foi realizada por dois patologistas treinados. Na outra lâmina restante foi realizada a marcação imunoistoquímica para proteína HER2.

4.2.4 Estudo imunoistoquímico

O método de imunoistoquímica utilizado para determinação da proteína HER2 foi o da Streptoavidina-Biotina–Peroxidase ^[44]. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato com pH 6,0. Após incubação com o anticorpo primário anti-c-erbB2 (clone SP3, diluição de 1:100, Spring), a imunodeteccção foi realizada com o anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690,

USA) seguida pelo complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA). Foi aplicado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Kit ENVISION, DAKO, K 3466, USA) (ANEXO 4). Em seguida as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris. Como controle utilizou-se tecido mamário com carcinoma fortemente positivo para a proteína HER2.

4.2.4.1 Critérios para interpretação da imunoistoquímica

Na avaliação da proteína HER2 foi considerado o critério de coloração da Sociedade Americana de Oncologistas Clínicos e do Colégio Americano de Patologistas sendo classificado como escore 0 , escore 1+, escore 2+ e escore 3+. O escore 0 e 1+, corresponde ao resultado negativo, o escore 2 corresponde ao duvidoso e o escore 3+ ao resultado positivo ^[21].

4.2.4.2 Critérios imunoistoquímicos para classificação dos subtipos moleculares

Na classificação dos subtipos foram utilizados os seguintes marcadores imunoistoquímicos: RE, RP, HER2. A classificação do presente estudo foi baseada no esquema utilizado por Nielsen (2004) e Carey (2006). O subtipo luminal A foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 -; o subtipo luminal B foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 + ; o subtipo HER 2 + como RE - e/ou RP- e HER2 + e o subtipo triplo-negativo, aqueles que eram RE - e/ou RP- , HER2 - ^[4] (Figuras 1,2,3,4).

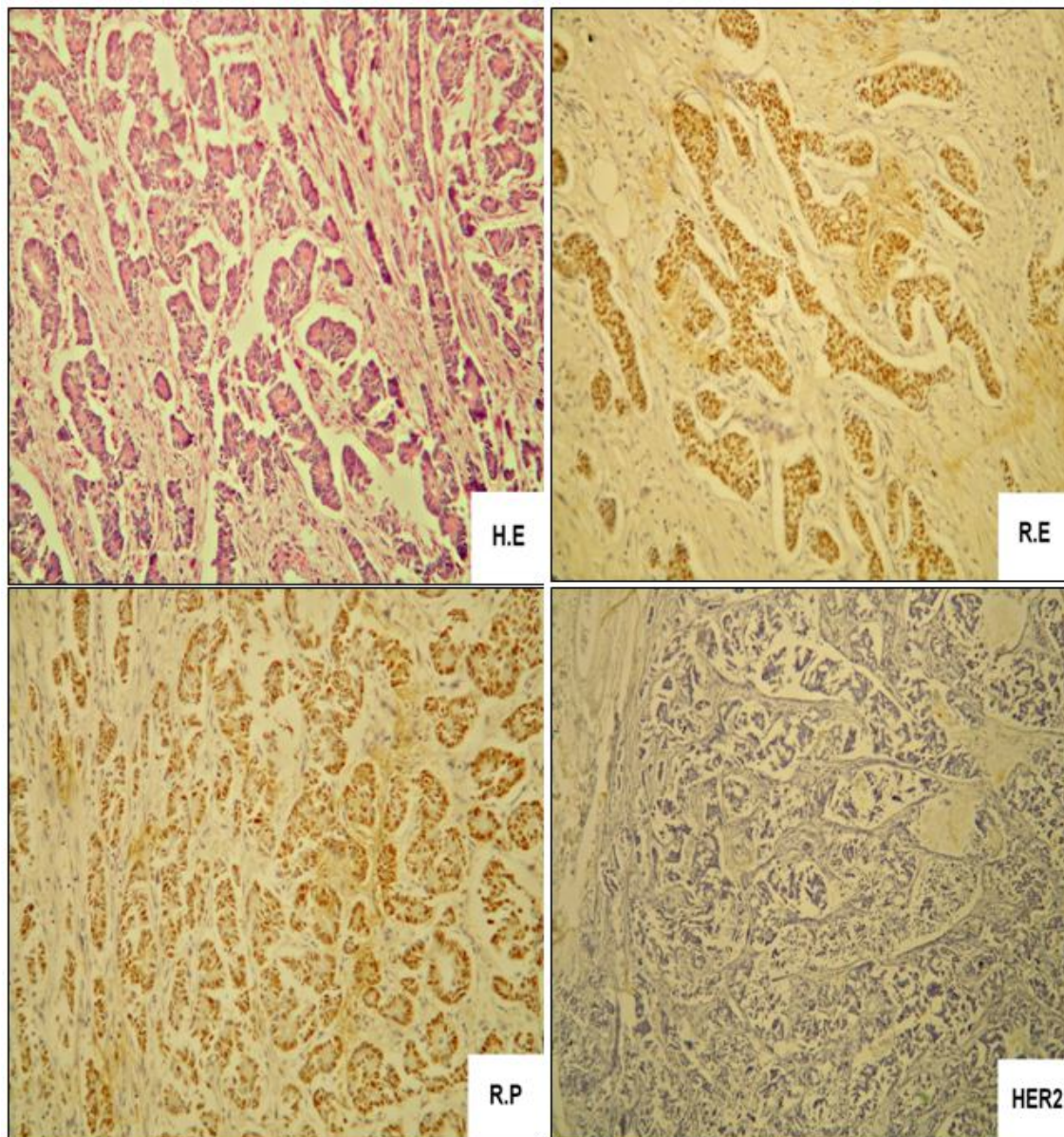


Figura 1- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal A (caso 7) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica negativa de membrana para o HER2.

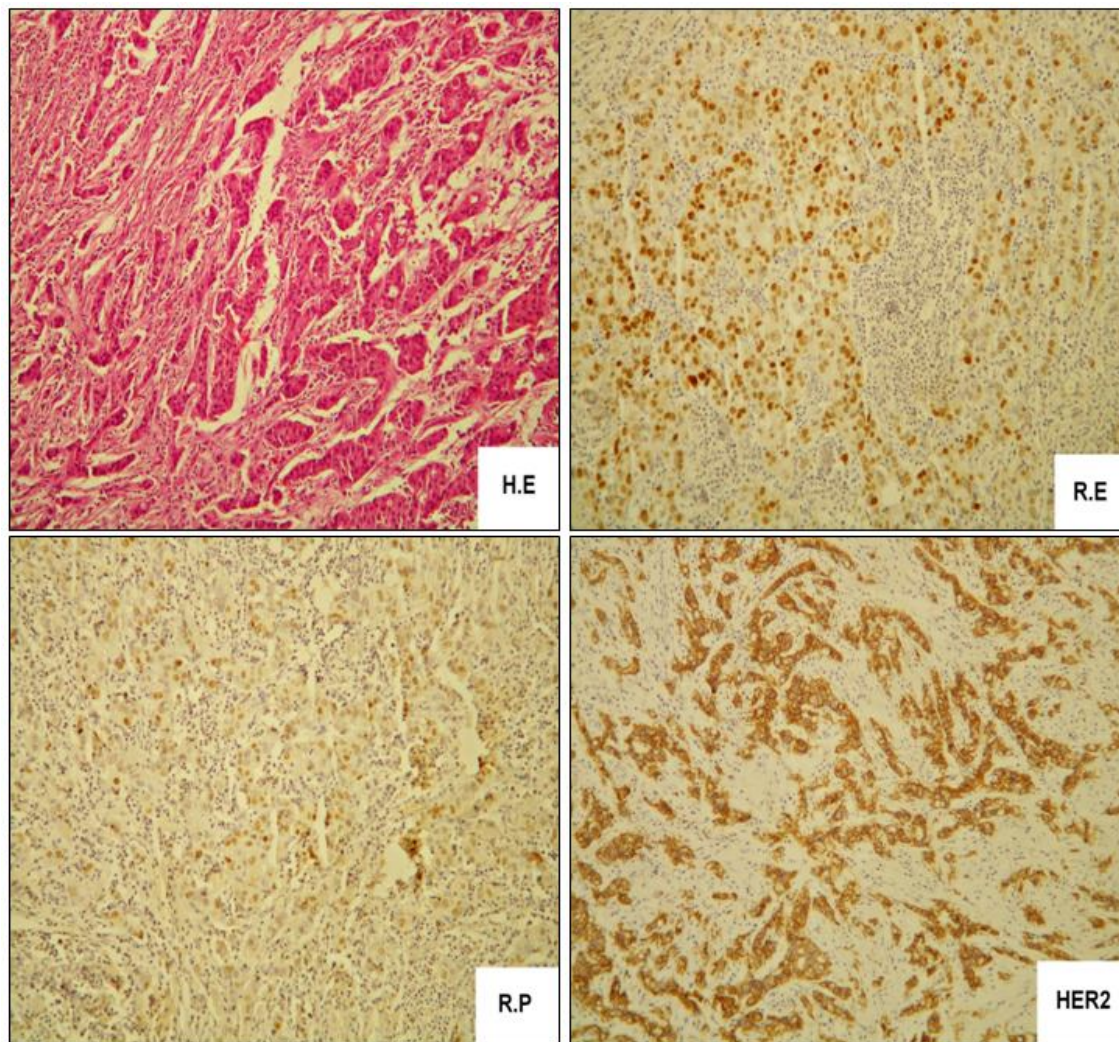


Figura 2- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal B (caso 72) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2.

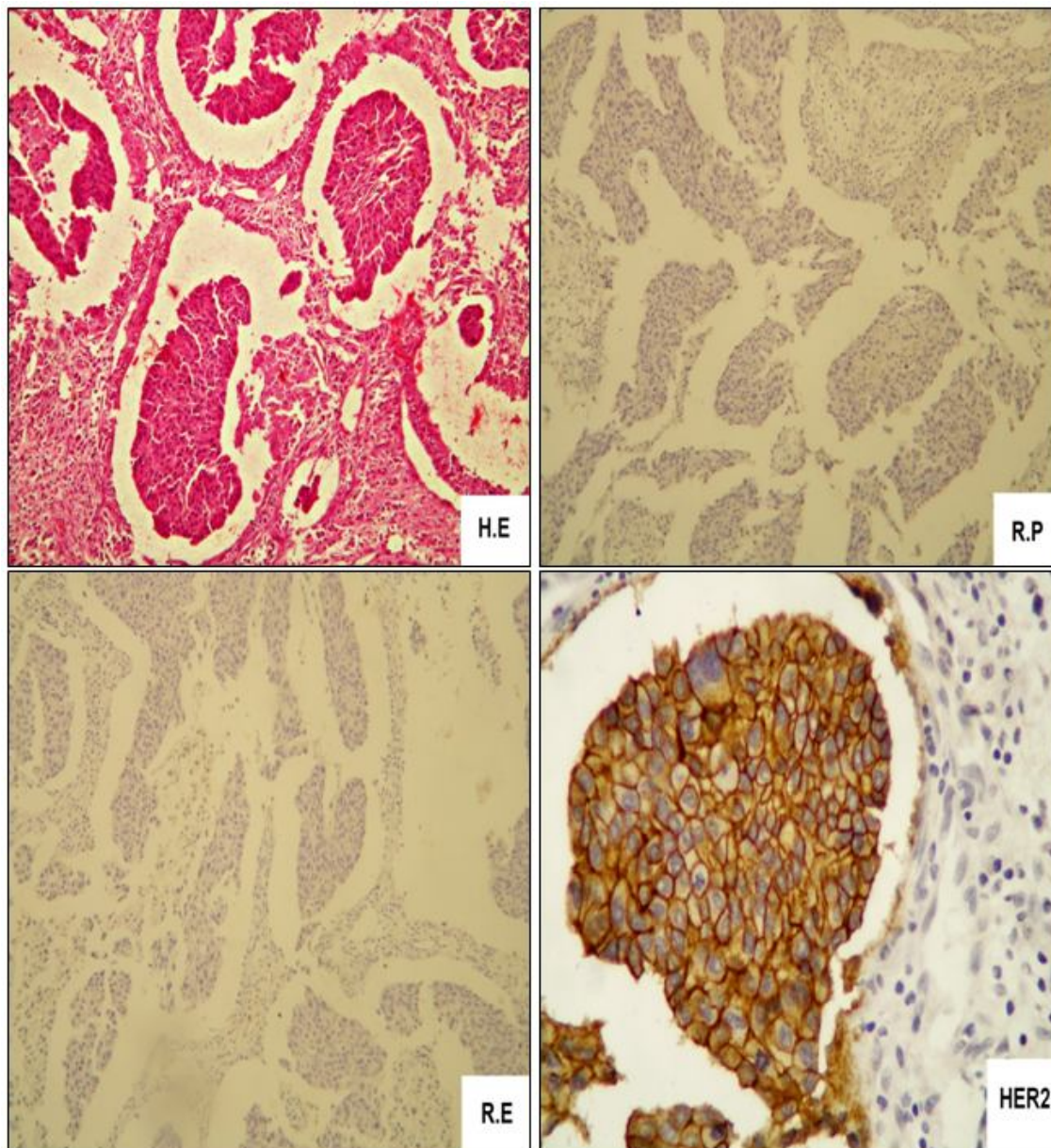


Figura 3- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular HER2 + (caso 132): coloração pela hematoxilina-eosina (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP (10x) e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2 (40x).

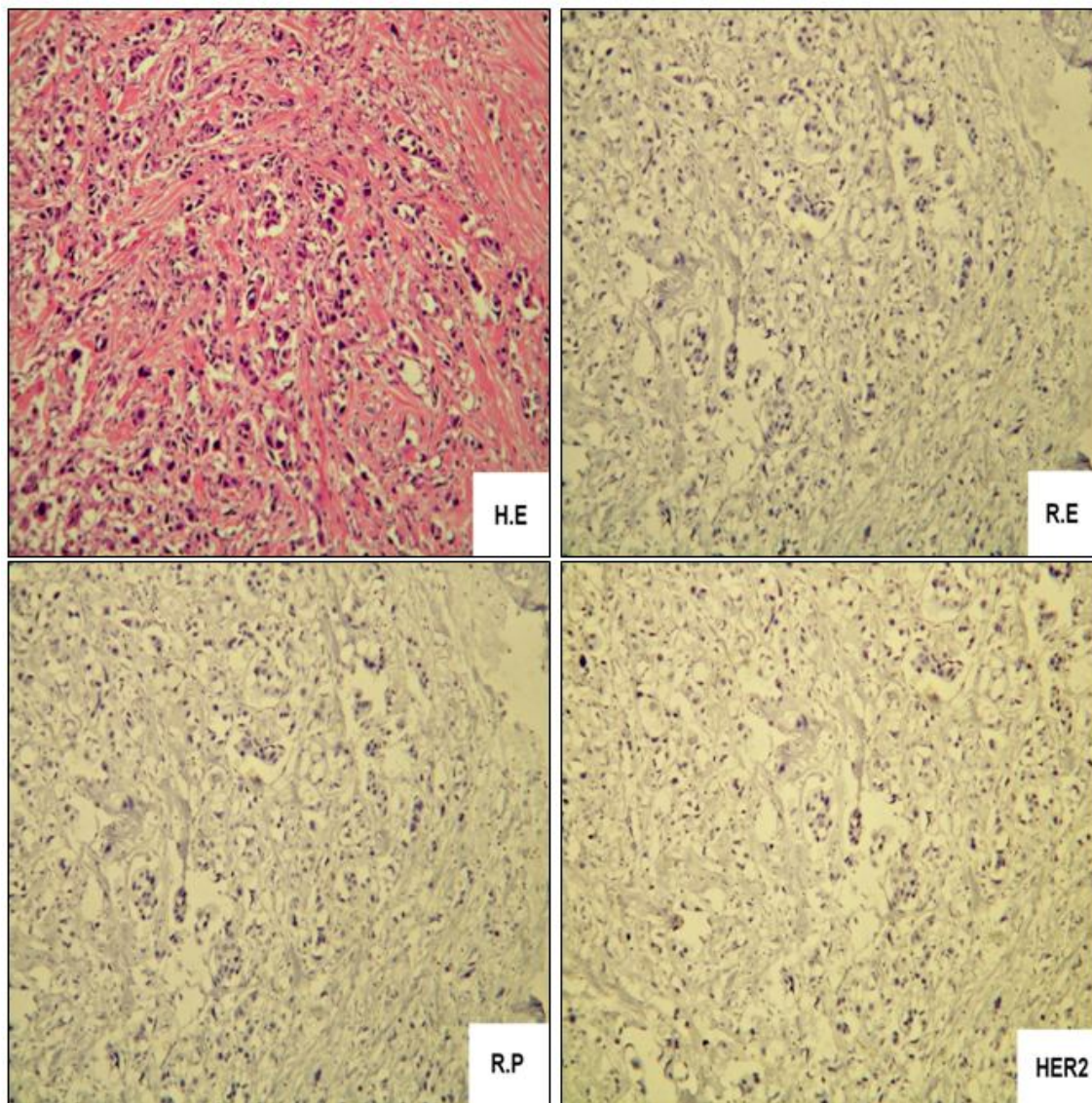


Figura 4- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular triplo-negativo (caso 14) (10x) : coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE; expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP; expressão imunoistoquímica negativa de membrana para o HER2.

4.2.5 Análise estatística

A partir dos dados obtidos da ficha específica, foi criado um banco de dados no programa EPI-INFO versão 6.03 (ANEXO 1). As variáveis qualitativas foram descritas através de suas frequências simples e frequências relativas. As variáveis quantitativas foram descritas por meio de medidas de tendência central e de dispersão. Neste estudo transversal, foram utilizadas a razão de prevalência como medida de associação entre as variáveis caracterizadas como desfecho, representadas pelos subtipos considerados de pior prognóstico (HER2 + e triplo-negativo) e as variáveis clínicas e patológicas, que foram caracterizadas como fatores de exposição ou fatores associados. Foram calculados intervalos de confiança de 95%, com resultados considerados como estatisticamente significantes quando o valor de $p \leq 0,05$. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Aristides Maltez – CEP/ LIGA CONTRA O CÂNCER DO HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ, sob o protocolo de número 262/10 (APÊNDICE A).

4.3 RESULTADOS

4.3.1 Características clínicas e patológicas

O subtipo luminal A foi observado em 112 tumores (65,5%), o luminal B em 14(8,2%), o HER2 + em 6 (3,5%) e o triplo-negativo em 39 (22,8%) (Figura 1,2,3,4). A maioria dos indivíduos tinha idade acima de 40 anos (85,9%) e essa proporção foi de 92,3% entre as mulheres com tumores triplo-negativo. Neste último subtipo, 69,2 % eram menopausadas. No grupo de pacientes jovens, o subtipo HER2 + foi o mais frequente (33,3%). Os subtipos HER2 + e o luminal B mostraram as maiores percentagens de pacientes com metástases à distância (33,3% e 28,6%, respectivamente). Em todos os subtipos, a maioria das pacientes estudadas se encontravam no estágio IIA (23,4%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características clínicas

<i>Características clínicas</i>	<i>Subtipos n(%)</i>	
	HER2 + 6(3,5%)	Triplo- negativo 39(22,8%)
Idade		
≤ 40 anos	2(33,3%)	3(7,7%)
> 40 anos	4(66,7%)	36(92,3%)
Status menopausal		
Sem informação	1(16,7%)	1(2,6%)
Sim	3(50,0%)	27(69,2%)
Não	2(33,3%)	11(28,2%)
Metástase à distância		
Sim	2(33,3%)	7(17,9%)
Não	4(66,7%)	32(82,1%)
Recidiva		
Sim	1(16,7%)	3(7,7%)
Não	5(83,3%)	36(92,3%)

Em relação às características patológicas, o grau histológico III foi o mais frequente nos subtipos triplo-negativo e HER2 + (59,0% e 83,3%, respectivamente). Entre os tumores de maior dimensão ($pT3$), o subtipo triplo-negativo foi o mais frequente (41,0%). No triplo-negativo, o tipo histológico especial mais frequente foi o carcinoma metaplásico, representando 7,6 % dos casos. Dentre todos os tipos histológicos, o carcinoma ductal infiltrante foi o mais frequente, sendo o HER2 + e o luminal B, os que demonstraram as maiores percentagens desse tipo (100% e 92,9%, respectivamente). A maior frequência de pacientes axila-positiva foi observada nos subtipos HER2 + e luminal B (83,3% e 71,4%, respectivamente). O tratamento mais utilizado nas pacientes mastectomizadas com subtipo triplo-negativo foi à radioterapia e quimioterapia, combinados, representando 33,4% das pacientes (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características patológicas e tratamento

<i>Características patológicas</i>	HER2 +	Triplo-negativo
	6 (3,5%)	39(22,8%)
Graus		
<i>I</i>	-	-
<i>II</i>	1 (16,7%)	16 (41%)
<i>III</i>	5 (83,3%)	23 (59%)
Tamanhos		
<i>pT1</i>	-	5 (12,8%)
<i>pT2</i>	6 (100%)	18 (46,2%)
<i>pT3</i>	-	16 (41,0%)
Tipos histológicos		
<i>Ductal infiltrante (SOE)</i>	6 (100%)	33 (84,6%)
<i>Lobular infiltrante</i>	-	-
<i>Metaplasico</i>	-	3 (7,6%)
<i>Papilifero</i>	-	1 (2,6%)
<i>Mucinoso</i>	-	-
<i>Apocrino</i>	-	1 (2,6%)
<i>Adenoide</i>	-	1 (2,6%)
Status axilar		
<i>Sem informação</i>	-	3 (7,6%)
<i>Positivo</i>	5 (83,3%)	23 (59,1%)
<i>Negativo</i>	1 (16,7%)	13 (33,3%)

4.3.2 Descrição das associações entre as características clinico-patológicas e subtipos moleculares

As associações entre as características clinico-patológicas e o subtipo triplo negativo e os dois subtipos agrupados luminais/HER2 + estão demonstradas nas tabelas 3 e 4. Observaram-se associações estatisticamente significantes entre o subtipo triplo negativo, o grau histológico e o tamanho tumoral. O subtipo triplo-negativo foi mais prevalente nos pacientes com tumores de grau histológico III (RP=2,29 IC=95% 0,17-1,53) do que nos de graus histológicos I/ II, e também nos tumores de maiores dimensões (*pT3*) do que nos tumores *pT1* / *pT2* (RP=2,28 IC=95% 1,34-3,87). No restante das características clínicas e patológicas, foram encontrados valores variados das razões de prevalência relacionadas às características clínicas, porém sem significância estatística. Observou-se que o

subtipo triplo negativo foi mais prevalente nos tumores com estadiamentos clínicos mais avançados (III + IV) (RP=1,87 IC=95% 0,91-3,84). Quando se agruparam os tumores com graus histológicos II/III e os tumores com tamanhos tumorais $pT3/pT2$, o subtipo triplo-negativo também foi o mais prevalente (RP=3,13 IC=95% 0,47-20,97 e RP=1,94 IC=95%,0,82-4,62, respectivamente). Observou-se ainda que o subtipo triplo-negativo foi o mais prevalente nos tumores de tipos histológicos especiais agrupados (RP=1,55 IC=95% 0,75-3,17) do que no ductal infiltrante (SOE).

Tabela 3 - Associações entre as características clínicas e subtipos do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características clínicas</i>	<i>Triplo -negativo</i>	<i>Luminais / HER2 +</i>	<i>RP(IC95%)</i>	<i>p</i>
Idade				
≤ 40 anos	3	21		
> 40 anos	36	111	0,51(0,17-1,53)	0,30
Paridade				
Não	6	28		
Sim	33	104	0,73(0,33-1,61)	0,42
Menopausa				
Sim	27	79		
Não	11	44	1,27(0,68-2,37)	0,43
Historia familiar				
Sim	7	18		
Não	32	112	1,26(0,63-2,53)	0,52
Metástase á distância				
Sim	7	30		
Não	32	102	0,78(0,37-1,61)	0,52
Recidiva				
Sim	3	9		
Não	35	117	1,09(0,39-3,02)	0,84
Estadiamento clinico				
III + IV	19	52	1,87(0,91-3,84)	0,07
I + II	9	54		

Tabela 4 - Associações entre as características patológicas e subtipos do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características patológicas</i>	<i>Triplo negativo</i>	<i>Luminais / HER2 +</i>	<i>RP(IC95%)</i>	<i>p</i>
Graus				
<i>Grau III</i>	23	43		
<i>Grau I + II</i>	16	89	2,29(0,17-1,53)	0,005*
Graus				
<i>Grau III e II</i>	38	120		
<i>Grau I</i>	1	12	3,13(0,47-20,97)	0,31
Tamanhos				
<i>pT3</i>	16	24		
<i>pT1+ pT2</i>	23	108	2,28(1,34-3,87)	0,006*
Tamanhos				
<i>pT3 + pT2</i>	34	99		
<i>pT1</i>	5	33	1,94(0,82-4,62)	0,16
Tipos histológicos				
<i>Ductal infiltrante (SOE)</i>	33	120		
<i>Especiais</i>	6	12	0,65(0,32-1,33)	0,26
Tipos histológicos				
<i>Especiais</i>	6	12		
<i>Ductal infiltrante (SOE)</i>	33	120	1,55(0,75-3,17)	0,26
Status axilar				
<i>Positivo</i>	23	75		
<i>Negativo</i>	13	54	1,21(0,66-2,21)	0,53
Comprometimento das margens				
<i>Sim</i>	4	14		
<i>Não</i>	35	116	6(0,39-2,39)	0,84

4.3.3 Descrição das associações entre características clínico-patológicas e os subtipos moleculares de pior prognóstico

As associações entre as características clínico-patológicas e os subtipos de pior prognóstico triplo-negativo / HER2 + e os luminais estão demonstradas nas Tabelas 5 e 6. Observaram-se associações estatisticamente significantes entre os subtipos de pior prognóstico, o grau histológico e o tamanho tumoral. Estes subtipos de pior prognóstico foram mais prevalentes nos pacientes com tumores de grau histológico III (RP=2,62 IC=95% 1,56-4,40) do que nos de grau histológico I/II e também nos tumores com maiores dimensões (pT3) do que nos tumores pT1/pT2 (RP=1,81 IC=95% 1,10-2,97). Quando se agruparam os tumores com tamanhos tumorais pT3/pT2, os subtipos de pior prognóstico foram mais prevalentes neste grupo (RP=2,29 IC=95% 0,97-5,39). Foram encontrados valores variados das

razões de prevalência relacionadas às características clínicas e patológicas, porém sem significância estatística. Os subtipos de pior prognóstico foram mais prevalentes nos estadiamentos clínicos mais avançados (III e IV) (RP=1,55 IC=95% 0,83-2,89) do que nos estadiamentos I e II. Estes subtipos também foram mais prevalentes quando se agruparam os tumores com grau histológico II/III (RP=3,62 IC=95% 0,54-24,20).

Tabela 5 - Associações entre as características clínicas e os dois subtipos de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características clínicas</i>	<i>Triplo negativo e HER2 +</i>	<i>Luminais</i>	<i>RP(IC95%)</i>	<i>p</i>
<i>Idade</i>				
<i>≤ 40 anos</i>	5	19		
<i>> 40 anos</i>	40	107	0,77(0,34-1,74)	0,68
<i>Paridade</i>				
<i>Não</i>	6	28		
<i>Sim</i>	39	98	0,62(0,29-1,34)	0,20
<i>Menopausa</i>				
<i>Sim</i>	30	76	1,20(0,68-2,10)	0,53
<i>Não</i>	13	42		
<i>Historia familiar</i>				
<i>Sim</i>	7	20		
<i>Não</i>	38	106	0,98(0,49-1,97)	0,96
<i>Metástase á distância</i>				
<i>Sim</i>	9	28	0,91(0,48-1,71)	0,76
<i>Não</i>	36	98		
<i>Recidiva</i>				
<i>Sim</i>	4	8	1,29(0,56-3,00)	0,82
<i>Não</i>	41	118		
<i>Estadiamento clinico</i>				
<i>III + IV</i>	21	50		
<i>I + II</i>	12	51	1,55(0,83-2,89)	0,16

Tabela 6 - Associações das características patológicas e os dois subtipos de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características patológicas</i>	<i>Triplo negativo+ HER2 +</i>	<i>Luminais</i>	<i>RP(IC(5%))</i>	<i>p</i>
Graus				
<i>Grau III</i>	28	38		
<i>Graus I e II</i>	17	88	2,62(1,56-4,40)	0,0001*
Graus				
<i>Grau III</i>	44	114		
<i>Graus II x I</i>	1	12	3,62(0,54-24,20)	0,21
Tamanhos				
<i>pT3</i>	16	24		
<i>pT2 e pT1</i>	29	102	1,81(1,10-2,97)	0,04*
Tamanhos				
<i>pT3 + pT2</i>	40	93		
<i>pT1</i>	5	33	2,29(0,97-5,39)	0,04*
Tipos histológicos				
<i>Ductal infiltrante (SOE)</i>	39	114		
<i>Especiais</i>	6	12	0,76(0,38-1,55)	0,47
Tipos histológicos				
<i>Especiais</i>	6	12		
<i>Ductal infiltrante (SOE)</i>	39	114	1,31(0,64-2,65)	0,47
Status axilar				
<i>Positivo</i>	28	70		
<i>Negativo</i>	14	53	1,37(0,78-2,40)	0,35
Comprometimento das margens				
<i>Sim</i>	4	14		
<i>Não</i>	41	110	0,82(0,33-2,02)	0,87

4.4 DISCUSSÃO

Na classificação molecular e imunoistoquímica dos subtipos dos carcinomas mamários observou-se na maioria dos estudos, uma frequência elevada do subtipo luminal A e menor frequência do subtipo triplo-negativo. Apesar disto, a maioria dos trabalhos de caracterização clínica e patológica dos subtipos moleculares tem sido direcionada aos subtipos triplo-negativo e HER2 +, considerados de pior prognóstico. No que se refere ao subtipo luminal A, a frequência no presente estudo é similar à encontrada na literatura [1-6, 15, 22]. Em relação ao triplo-negativo, observou-se uma frequência de 22,8%, que é elevada quando se compara com as casuísticas estrangeiras e nacionais, que referiam cerca de 6% a 16% [4,17, 23]. Porém, em outros trabalhos realizados em populações do estado de Minas Gerais, observaram-se frequências semelhantes ou mais elevadas [12, 16]. No trabalho de

Dutra et al (2009), observou-se uma maior frequência de triplo-negativo nas pacientes jovens e menor nas pós-menopausadas.

Esta frequência elevada de subtipo triplo-negativo na população estudada pode estar relacionada a fatores raciais. A população em estudo está constituída por mulheres de diversas regiões da Bahia, e em grande parte podem mostrar ascendência africana. Em um estudo realizado em pacientes com câncer de mama na Bahia observou-se maior frequência do subtipo triplo-negativo em um grupo de pacientes afrodescendentes, quando comparadas a do grupo racial branco [24]. Esta associação entre este subtipo e a descendência africana, foi também observada em outros estudos de outras regiões do mundo [25, 26].

Na população estudada as pacientes com subtipo triplo-negativo demonstraram idades superiores à 40 anos e em sua maioria eram menopausadas. Já no grupo de pacientes com idade inferior ou igual a 40 anos, o subtipo HER2 foi o mais frequente. Os trabalhos na literatura associam os subtipos triplo-negativo e HER2 + às pacientes jovens e pré-menopausadas [7, 9, 10, 22]. Porém, é interessante ressaltar que alguns destes estudos com tumores triplo-negativos, as pacientes que foram consideradas como jovens tinham idades superiores à 40 anos, o que incluiria as pacientes da população deste estudo.

Em outro trabalho com pacientes chinesas não se observou associação do subtipo triplo-negativo com pacientes com idade abaixo de 40 anos [11]. Neste mesmo estudo e em outro com mulheres japonesas, observou-se que o subtipo triplo-negativo era mais frequente na pós-menopausa, achado semelhante ao presente estudo [14]. No que se refere às pacientes com subtipos luminais, semelhantemente a outros estudo observou-se uma maior porcentagem de pacientes pós-menopausadas [5, 6, 7, 22, 28].

Ainda em relação à história reprodutiva, em todos os subtipos, houve um percentual mais elevado de pacientes que pariram durante o período de seguimento (80,1%). Na revisão realizada para este trabalho, foram encontrados apenas dois estudos que descreveram as associações entre os subtipos com outros fatores de risco, como menarca precoce, obesidade, dentre outros [5, 28]. Yang e colaboradores (2010) descrevem uma maior frequência de pacientes nulíparas nos tumores com receptor de estrógeno positivo [28]. Este achado é semelhante ao encontrado neste estudo, onde dentre as nulíparas o subtipo mais frequente foi o luminal A, com 18,8%. Em relação à história familiar observou-se que dentre todos os subtipos a

maioria das pacientes tinham história familiar negativa, confirmando que os tumores esporádicos são mais incidentes na população [29]. Ressalta-se com estes resultados que o levantamento dos dados clínicos e epidemiológicos pode contribuir na identificação mais individualizada da população estudada, o que pode influenciar nas políticas de prevenção e de rastreamento, bem como em escolhas terapêuticas mais direcionadas.

Dentre todos os subtipos, o HER2 + demonstrou uma maior frequência de metástases à distância e recidiva tumoral, o que também foi observado em algumas casuísticas [7,13,30]. O trabalho de Iwase et al. (2010), mostrou similaridades com o presente estudo no que se refere ao número de pacientes estudadas, bem como a quantidade de pacientes com subtipo HER2 +. Outros estudos, porém, não mostram frequências elevadas de metástase à distância e de recidiva tumoral neste subtipo [4-6, 10].

Em relação ao subtipo luminal A e triplo-negativo, não foram observadas frequências expressivas de metástase à distância e de recidiva tumoral. Em relação ao subtipo luminal A, estes achados estão em concordância com a literatura [7,8], o que não se observa com o triplo-negativo onde alguns estudos mostram maior frequência destes dois desfechos [9, 31-33]. Estes achados podem refletir as características inerentes à população do estudo que apresentou percentuais baixos de metástase à distância e de recidiva tumoral. Em um trabalho anterior com uma população com axila-negativa, oriunda do mesmo serviço foi demonstrado também baixa frequência de recidiva tumoral [27]. O subtipo triplo-negativo foi o mais frequente dentre os estádios clínicos mais avançados (IIIA, IIIB e IV), o que poderia estar relacionado à sua associação com fatores de pior prognóstico [9].

Baseado nesta associação com fatores de pior prognóstico, observou-se neste estudo que dentre os tumores $pT3$, o subtipo triplo-negativo era o mais frequente e também dentre os tumores de grau III, juntamente com o subtipo HER2 +. O subtipo HER2 + demonstrou maior frequência de pacientes com axila positiva (83,3%). Estes achados estão em concordância com a maioria dos estudos na literatura [9- 11, 31, 32, 34].

Além dos tumores de maior dimensão e com grau elevado, observou-se uma percentagem expressiva de pacientes com subtipo triplo-negativo com axila positiva (59,1%). No trabalho de Dent et al (2007) e Albergaria et al (2011), a frequência de metástases axilares linfonodais no subtipo triplo-negativo foi semelhante ao nosso

estudo com 54% e 51,4 % respectivamente [10, 35]. Estes aspectos estão em concordância com estudos que demonstram que o *status* axilar e o tamanho tumoral são fatores prognósticos determinantes no subtipo triplo-negativo [10, 31, 35].

Salienta-se ainda que todos os subtipos no presente estudo demonstraram maior percentagem de margens cirúrgicas livres, outra característica desta população do estudo. Contudo, os escassos estudos na literatura, apenas caracterizam as margens tumorais como infiltrativas, não se determinando o parâmetro desta medida [11, 31, 36, 37]. Assim, é importante a realização de estudos posteriores com caracterização e comparação entre estas medidas, já que o comprometimento das margens cirúrgicas pode estar relacionado a outros fatores prognósticos, como a recidiva local.

Dentre todos os subtipos neste estudo, o tipo histológico ductal infiltrante foi o mais frequente. Em diversos trabalhos com subtipos moleculares do câncer de mama, observaram-se frequências variadas deste tipo histológico [4, 8, 14, 38]. No presente estudo, observou-se que todos os tumores de subtipo HER2 + eram do tipo ductal infiltrante, achado semelhante ao trabalho de Spitale (2009) [8]. Em um trabalho com mulheres brasileiras, Cintra et al (2012), descreveu também o ductal infiltrante como o tipo histológico mais frequente dentre os subtipos, sendo o lobular infiltrante o segundo mais comum [16].

Este último dado difere da população em estudo, onde o carcinoma metaplásico e o apócrino foram os mais comuns, dentre os tipos especiais, sendo mais frequente no subtipo triplo-negativo e no luminal B respectivamente. Esta frequência do carcinoma metaplásico no subtipo triplo-negativo é semelhante a alguns trabalhos na literatura [5, 38, 39]. Contudo, seria necessário um número maior de tumores com tipos histológicos especiais para melhor avaliar a sua relação com o prognóstico. Alguns estudos de expressão gênica mostram que o subtipo luminal B quando comparados ao luminal A mostram pior prognóstico, pois neste subtipo observa-se elevada expressão de genes de proliferação, observando-se assim expressão elevada do KI-67 [5, 7, 8]. Assim, seria interessante a inclusão deste marcador no painel imunohistoquímico, para avaliar a relação entre a proliferação celular e a evolução da doença.

O estudo das frequências das variáveis estudadas demonstrou que a população em estudo tinha uma média de idade de 53 anos, eram pós-menopausadas, com frequências elevadas de metástases axilares, com maior

frequência de carcinoma de tipo histológico ductal infiltrante e de tumores $pT2$ e de grau II. Observou-se ainda uma frequência dos fatores patológicos $pT3$ e grau III em subtipos relacionados a pior prognóstico.

Os fatores patológicos avaliados podem estar relacionados as características de cada subtipo. Assim, foram realizados estudos de associação com razões de prevalência entre as características clínicas e patológicas e os subtipos considerados de pior prognóstico, o triplo-negativo e o HER2 +. O subtipo triplo-negativo, considerado de pior prognóstico, foi o mais prevalente nos tumores de maior dimensão ($pT3$) e nos tumores de grau histológico III, pouco diferenciados. Estas associações significantes foram semelhantes às encontradas em vários estudos na literatura [9, 11, 27, 31, 35, 37]. Observou-se ainda que quando se agrupou os tumores de maior dimensão ($pT2$ e $pT3$), e os graus histológicos II/III, o subtipo triplo-negativo demonstrou razões de prevalência elevadas (RP=1,94 e RP=3,13), porém sem significância estatística.

Estas medidas de associação podem demonstrar que nesta população estudada, os fatores prognósticos tamanho tumoral e grau histológico podem auxiliar na determinação dos subtipos de pior prognóstico. O tamanho tumoral é uma das variáveis mais significantes na avaliação prognóstica do câncer de mama está diretamente relacionado a metástases axilares. No presente estudo esta relação com metástases axilares não foi observada, sendo semelhante aos achados de Dent (2007) e Thike (2010) [10,14]. A determinação padronizada dos tamanhos tumorais realizada pelo sistema de estadiamento patológico $pTNM$, foi utilizado neste presente estudo e demonstra que pode ser um dos parâmetros para identificar os subtipos de pior prognóstico. Porém mais recentemente, Park (2011) demonstrou que este sistema pode não ser suficiente para categorizar a biologia tumoral e prever a evolução clínica, especificamente no subtipo triplo-negativo [40]. Assim, é fundamental, a pesquisa de outros marcadores tumorais específicos para este grupo e que possam traduzir o comportamento biológico.

O grau histológico elevado foi outro fator associado ao subtipo triplo-negativo neste estudo, relacionando significativamente estes tumores a um pior prognóstico. Este achado está em concordância com estudos que demonstram que o grau histológico permanece ainda como um forte fator prognóstico e pode traduzir as características clínicas e morfológicas tumorais, tendo a mesma importância prognóstica que as metástases axilares [41,45].

Em relação as variáveis clínicas e patológicas tais como o estadiamento clínico, a história familiar positiva e os tipos histológicos especiais, os tumores com subtipo triplo-negativo demonstraram valores de razões de prevalência consideráveis, porém sem significância estatística. Observou-se uma razão de prevalência de 1,26 do subtipo triplo-negativo em relação à história familiar positiva. Alguns trabalhos mostram a associação da mutação do BRCA1 com o subtipo triplo-negativo [3,42]. Em um trabalho realizado em uma população proveniente do estado da Bahia, foi relatada a presença de uma das mutações do BRCA1 [43]. Assim, nas amostras tumorais da população estudada, a utilização de métodos diagnósticos para caracterização das mutações do BRCA1, o que poderia complementar a caracterização morfológica e molecular destas pacientes.

Foram realizadas ainda outras medidas de associação considerando desta vez, o triplo-negativo e o subtipo HER2 +, como subtipos de pior prognóstico. Houve também uma associação significativa entre estes dois subtipos e o grau histológico III e o tamanho tumoral $pT3$, que são fatores histopatológicos determinantes relacionados a um pior prognóstico. No presente estudo, estes subtipos estavam também relacionados a outros fatores de pior prognóstico, tais como metástases axilares e estadiamentos clínicos mais elevados (III e IV), o que poderia fortalecer ainda mais esta associação. Além disto, na análise multivariada realizada nesta população (ainda não publicado) observou-se que os tumores com subtipo HER2 + apresentaram um maior risco de morte quando comparados aos luminais, o que foi também observado na literatura [7, 8].

Na população estudada destacam-se alguns achados, tais como frequência mais elevada de tumores triplo-negativo do que nas casuísticas estrangeiras e nacionais além de uma frequência menor de metástases à distância e de recidiva tumoral. Além disto, houve associação significativa entre os subtipos triplo-negativo e HER2 + com tumores de maior dimensão e de grau histológico elevado.

Ressalta-se que estes fatores prognósticos ainda permanecem como determinantes do prognóstico, além de serem acessíveis e bem estabelecidos na rotina histopatológica. A combinação entre os fatores prognósticos clínico-morfológicos e os marcadores imunoistoquímicos representados pelos receptores hormonais e a proteína HER2 permitem a definição consistente do perfil imunofenotípico bem como a associação com os subtipos considerados de pior prognóstico, HER2 + e triplo-negativo.

4.5 REFERENCIAS

- [1] PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602.
- [2] SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Jul 8;100(14):8418-23. Epub 2003 Jun 26. PubMed PMID: 12829800; PubMed Central PMCID: PMC166244
- [3] NIELSEN, T. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**. 2004 Aug 15;10(16):5367-74. PubMed PMID: 15328174.
- [4] CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA**. 2006 Jun 7;295(21):2492-502. PubMed PMID: 16757721
- [5] YANG, X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 2007 Mar;16(3):439-43. PubMed PMID: 17372238
- [6] CHEANG, M. C. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res**. 2008 Mar 1;14(5):1368-76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1658. PubMed PMID: 18316557.
- [7] NGUYEN, P. L. et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. **J Clin Oncol**. 2008 May 10;26(14):2373-8. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4287. Epub 2008 Apr 14. Erratum in: **J Clin Oncol**. 2008 Jun;26(18):3110. PubMed PMID: 1841363
- [8] SPITALE, A. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. **Ann Oncol**. 2009 Apr;20(4):628-35. doi: 10.1093/annonc/mdn675. Epub 2008 Dec 12. PubMed PMID: 19074747.
- [9] BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the

so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**. 2007 May 1;109(9):1721-8. PubMed PMID: 17387718

[10] DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res**. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34. PubMed PMID: 17671126.

[11] TISCHKOWITZ, M. et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. **BMC Cancer**. 2007 Jul. 24;7:134. PubMed PMID: 17650314; PubMed Central PMCID: PMC1948892.

[12] DUTRA, M. C. et al. Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very young and postmenopausal women]. **Rev Bras Ginecol Obstet**. 2009 Feb;31(2):54-60. Portuguese. PubMed PMID: 19407909.

[13] KIM, M. J. et al. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. **Hum Pathol**. 2006 Sep;37(9):1217-26. Epub 2006 Jul 18. PubMed PMID: 16938528

[14] THIKE, A. A. et al. Triple-negative breast cancer: clinic pathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. **Mod Pathol**. 2010 Jan;23(1):123-33. doi: 10.1038/modpathol.2009.145. Epub 2009 Oct 23. PubMed PMID: 19855377

[15] MORIYA, T. et al. Molecular morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. **Med Mol Morphol**. 2010 Jun;43(2):67-73. doi: 10.1007/s00795-010-0504-5. Epub 2010 Aug 4. Review. PubMed PMID: 20683691.

[16] CINTRA, J. R. et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. **Rev. Assoc Med Bras**. 2012 Apr;58(2):178-87. English, Portuguese. PubMed PMID: 22569612

[17] DE BROT, M. et al. Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome. **Rev Assoc Med Bras**. 2009 Sep-Oct;55(5):529-34. Portuguese. PubMed PMID: 19918651

[18] EDGE, S. B. **American Joint Committee on Cancer: AJCC cancer staging manual**. 7th edition. New York: Springer; 2010.

- [19] ROBBINS, P. et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. **Hum Pathol.** 1995 Aug;26(8):873-9. PubMed PMID: 7635449
- [20] FITZGIBBONS, P. L. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med.** 2000 Jul;124(7):966-78. Review. PubMed PMID: 10888772
- [21] WOLFF, 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.** 2007;131(1):18-43. doi: 10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2. PubMed PMID: 19548375
- [22] DEL CASAR, J. M. et al. Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2008 Dec;141(2):147-52. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.07.021. Epub 2008 Sep 2. PubMed PMID: 18768247.
- [23] BLOWS, F. M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. **PLoS Med.** 2010 May 25;7(5):e1000279. doi: 10.1371/journal.pmed.1000279. PubMed PMID: 20520800; PubMed Central PMCID: PMC2876119
- [24] CORRÊA, P. B. et al. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. **Revista Ciências Médicas e Biológicas** v. 9, p. 3-7, 2010
- [25] MORRIS, G. J. et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **Cancer.** 2007 Aug 15;110(4):876-84. PubMed PMID: 17620276.
- [26] STEAD, L. A. et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. **Breast Cancer Res.** 2009;11(2):R18. doi: 10.1186/bcr2242. Epub 2009 Mar 25. PubMed PMID: 19320967; PubMed Central PMCID: PMC2688946..
- [27] RAMOS FILHO, A. O. A. et al. Fatores preditivos de recidiva do carcinoma mamário axila-negativo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 2002, 48(4): 499-503.

[28] YANG, X. R. et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **J Natl Cancer Inst.** 2011 Feb 2;103(3):250-63. doi: 10.1093/jnci/djq526. Epub 2010 Dec 29. PubMed PMID: 21191117; PubMed Central PMCID: PMC3107570

[29] COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet.* 2001 Oct 27;358(9291):1389-99. Review. PubMed PMID: 1170548

[30] IWASE, H. et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. **Breast Cancer.** 2010 Apr;17(2):118-24. doi: 10.1007/s12282-009-0113-0. Epub 2009 May 23. PubMed PMID: 19466512.

[31] RAKHA, E. A. et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer.** 2007 Jan 1;109(1):25-32. PubMed PMID: 17146782.

[32] ANDERS, C. K.; CAREY, L. A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. **Clin Breast Cancer.** 2009 Jun;9 Suppl 2:S73-81. doi: 10.3816/CBC.2009.s.008. Review. PubMed PMID: 19596646; PubMed Central PMCID: PMC2919761

[33] DESMEDT, C. et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. **Clin Cancer Res.** 2008 Aug 15;14(16):5158-65. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4756. PubMed PMID: 18698033

[34] ZAHA, D. C.; LAZĂR, E.; LĂZUREANU, C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. **Rom J Morphol Embryol.** 2010;51(1):85-9. PubMed PMID: 20191125.

[35] ALBERGARIA, A. et al. Nottingham Prognostic Index in triple-negative breast cancer: a reliable prognostic tool? **BMC Cancer.** 2011 Jul 15;11:299. doi: 10.1186/1471-2407-11-299. PubMed PMID: 21762477; PubMed Central PMCID: PMC3151231

[36] FULFORD, L. G. et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology.* 2006 Jul;49(1):22-34. PubMed PMID: 16842243.

[37] LIVASY, C. A. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol.** 2006 Feb;19(2):264-71. PubMed PMID: 16341146.

[38] WEBSTER, L. R. et al. Poor-prognosis estrogen receptor-positive breast cancer identified by histopathologic subclassification. **Clin Cancer Res.** 2008 Oct 15;14(20):6625-33. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-0701. PubMed PMID: 18927304.

[39] WEIGELT, B. et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. **J Pathol.** 2008 Oct;216(2):141-50. doi: 10.1002/path.2407. PubMed PMID: 18720457.

[40] PARK, Y.H. et al. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. **Ann Oncol.** 2011 Jul;22(7):1554-60. doi: 10.1093/annonc/mdq617. Epub 2011 Jan 17. PubMed PMID: 21242587

[41] ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology.** n.19, v.5, p. 403-10. Nov. 1991.

[42] FOULKES, W. D. et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** 2003 Oct 1;95(19):1482-5. PubMed PMID: 14519755.

[43] MACHADO, T. M. B. et al. Mutações nos genes BRCA em pacientes com câncer de mama e ovários hereditários da Bahia. **Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética** • 30 de agosto a 02 de setembro de 2009. Centro de Convenções do Hotel Monte Real Resort • Águas de Lindóia • SP • Brasil www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06-2 Abe-Sandes, C1,2; Abe-Sandes, K1,3; 1

[44] BOENISCH, T. **Imunochemical staining methods.** Naish SJ (ed) Dako Corporation, Carpinteria, USA, 1989.

[45] RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res.** 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607. Epub 2010 Jul 30. Review. PubMed PMID: 20804570; PubMed Central PMCID: PMC2949637.

4.6 APÊNDICE



LIGA BAHIANA CONTRA O CÂNCER
HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ
DEPARTAMENTO DE ENSINO E PESQUISA

Salvador, 31 de março de 2010

CI Nº 11/2010

Dra. Helenemarie Schaer Barbosa
Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HAM

Comunicamos a V.Sa., ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Artur Ventura de Matos as pesquisas intituladas “**CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS CARCINOMAS DA MAMA E CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICOS**” dos pesquisadores **Helenemarie Schaer Barbosa e Claudia Leal Macedo**, a serem realizados nesse Serviço.

Atenciosamente,

Enfa. Stela Maria Leal Pinto Dantas
Presidente do DEP

ANEXO 2 ESTADIAMENTO CLINICO E PATOLÓGICO

CLASSIFICAÇÃO TNM CLÍNICA, UICC, 2003
Classificação clínica (cTNM) 6ª edição (UICC)
T Tumor primário
Tx Tumor primário não pode ser avaliado
T0 Não há evidência de tumor primário
Tis Carcinoma <i>in situ</i> Tis (CDIS) Carcinoma ductal <i>in situ</i> Tis (CLIS) Carcinoma lobular <i>in situ</i> Tis (Paget) Doença de Paget do mamilo sem tumor na mama
Nota: A doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor
T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão. T1mic Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão Notas: Microinvasão é a extensão de células neoplásicas além da membrana basal, alcançando os tecidos adjacentes, sem focos tumorais maiores do que 0,1 cm em sua maior dimensão. Quando há focos múltiplos de microinvasão, somente o tamanho do maior foco é utilizado para classificar a microinvasão. (Não usar a soma dos focos individuais) A presença de múltiplos focos de microinvasão deve ser anotada como se faz com os carcinomas invasores extensos múltiplos. T1a Com mais de 0,1 cm, até 0,5 cm em sua maior dimensão T1b Com mais de 0,5 cm, até 1 cm em sua maior dimensão T1c Com mais de 1 cm, porém não mais de 2 cm em sua maior dimensão
T2 Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão
T3 Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4 Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele, somente como descritos em T4a a T4d Nota: A parede torácica inclui costelas, músculos intercostais, músculo serrátil anterior, mas não inclui o músculo peitoral. T4a Extensão à parede torácica T4b Edema (inclusive "pele de laranja" 'peau d'orange'), ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama T4c Ambos (T4a e T4b), acima T4d Carcinoma inflamatório
Nota: O carcinoma inflamatório da mama é caracterizado por um endurecido difuso e intenso da pele da mama com bordas erisipelóides, geralmente sem massa tumoral subjacente. Se a biópsia de pele for negativa e não existir tumor primário localizado mensurável, o carcinoma inflamatório clínico (T4d) é classificado patologicamente como pTX. A retração da pele, do mamilo ou outras alterações cutâneas, exceto aquelas incluídas em T4b e T4d, podem ocorrer em T1, T2 ou T3, sem alterar a classificação.
N Linfonodos regionais
NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (p. ex., por terem sido previamente removidos)
N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1 Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral(ais), móvel(eis)

N2 Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)

N2a Metástase em linfonodo(s) axilar(es) fixos uns aos outros ou a outras estruturas

N2b Metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)

N3 Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s)

Notas: *cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia)

N3a Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es)

N3b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) e axilares

N3c Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)

M - Metástase à Distância

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância

A categoria M1 pode ser adicionalmente especificada de acordo com as seguintes notações:

Pulmonar PUL (C34)

Medula óssea MO [MAR](C42.1)

Óssea OSS (C40, 41)

Pleural PLE (C38.4)

Hepática HEP (C22)

Peritoneal PER (C48.1,2)

Cerebral CER [BRA] (C71)

Supra-renal (Adrenal) ADR (C74)

Linfonodal LIN [LYM](C77)

Pele CUT [SKI](C44)

Outras OUT [OTH]

Copyright © 1996-2007 INCA - Ministério da Saúde

pT - Tumor Primário

A classificação histopatológica requer o exame do carcinoma primário sem tumor macroscópico nas margens de ressecção. Um caso pode ser classificado como

pT se houver somente tumor microscópico em uma margem.

As categorias pT correspondem às categorias T.

Nota: Ao se classificar a categoria pT, o tamanho do tumor é a medida do componente invasivo. Se há um grande componente in situ (p. ex., 4 cm) e um pequeno componente invasor (p. ex., 0,5 cm), o tumor é codificado como pT1a.

pN - Linfonodos Regionais

A classificação histopatológica requer a ressecção e o exame, pelo menos, dos linfonodos axilares inferiores (nível I). Tal ressecção incluirá, geralmente, 6 ou mais linfonodos. Se os linfonodos são negativos, mesmo que o número usualmente examinado seja não encontrado, classifica-se como pN0.

O exame de um ou mais linfonodos sentinelas pode ser usado para a classificação patológica. Se a classificação é baseada somente em biópsia do linfonodo sentinela sem dissecação subsequente dos linfonodos axilares, deve ser designado como (sn) para linfonodo sentinela, p. ex., pN1(sn).

pNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (não removidos para estudo ou previamente removidos) pN0 Ausência de metástase em linfonodos regionais*

Nota: *Casos somente com células tumorais isoladas (CTI [ITC]) nos linfonodos regionais são classificados como pN0. As CTI [ITC] são células tumorais únicas ou em pequenos grupamentos celulares, não maiores que 0,2 mm em sua maior dimensão, que são geralmente detectadas por imunohistoquímica ou métodos moleculares, mas que poderiam ter sido verificados pela coloração de rotina (H&E). As CTI [ITC], tipicamente, não mostram evidência de atividade metastática, p. ex., proliferação ou reação estromal.

pN1mi Micrometástase (maior que 0,2 mm, porém não maior que 2 mm em sua maior dimensão)

pN1 Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), e/ou linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is) com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente**

pN1a Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) incluindo pelo menos um maior que 2 mm em sua maior dimensão

pN1b Metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente**

pN1c Metástase em 1-3 linfonodos axilares e metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodosentinela, porém não clinicamente aparente**

pN2 Metástase em 4-9 linfonodos axilares homolaterais, ou em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), clinicamente aparente***, na ausência de metástase em linfonodos axilares

Notas: **não clinicamente aparente = não detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia).

***cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia) ou macroscopicamente visível patologicamente.

pN2a Metástase em 4-9 linfonodos axilares incluindo, pelo menos, um maior que 2 mm

pN2b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), clinicamente aparente, na ausência de metástase em linfonodos axilares

pN3 Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares homolaterais; ou em linfonodos infra-claviculares homolaterais; ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na

presença de um ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais de 3 linfonodos axilares clinicamente negativos, metástase microscópica em linfonodos mamários internos; ou em linfonodos supraclaviculares homolaterais

pN3a Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos um maior que 2 mm) ou metástase em linfonodos infraclaviculares

pN3b Metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na presença de linfonodos axilares positivos; ou metástase em mais de 3 linfonodos axilares e em linfonodos mamários internos com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente

pN3c Metástase em linfonodos supraclaviculares

pM - Metástase à distância

As categorias pM correspondem às categorias M.

Sumarizando essas classificações teremos o agrupamento dessas classificações em estágios, conforme o quadro a seguir:

Grupamento por Estádios

Estádio 0	Tis	N0	M0	
Estádio I	T1 ¹	N0	M0	
Estádio II	T0	N1	M0	
IIA	T1 ¹	N1 ¹	M0	
	T2	N0	M0	
Estádio	T2	N1	M0	
IIB	T3	N0	M0	
	T0	N2	M0	
	T1 ¹	N2	M0	
	T2	N2	M0	
	T3	N1, N2	M0	
Estádio	T4	N0, N1,	M0	
IIIB		N2		
Estádio	Qualquer	N3	M0	
IIIC	T			
Estádio	Qualquer	Qualquer	M1	
IV	T	N		

Nota: 1. T1 inclui o T1mic.

ANEXO 3 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS HISTOLÓGICOS**Carcinoma microinvasivo****Carcinoma mamário invasivo****Carcinoma ductal invasivo, SOE****Carcinoma tipo misto****Carcinoma pleomórfico****Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto****Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos****Carcinoma com elementos melanóticos****Carcinoma lobular invasivo****Carcinoma lobular clássico****Carcinoma lobular sólido****Carcinoma lobular alveolar****Carcinoma lobular pleomórfico****Carcinoma túbulo-lobular****Carcinoma lobular misto****Carcinoma tubular****Carcinoma cribriforme invasivo****Carcinoma com elementos medulares****Carcinoma medular****Carcinoma medular atípico****Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares****Carcinoma mucinoso****Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete****Carcinoma micropapilar invasivo****Carcinoma com diferenciação apócrina****Carcinoma metaplásico sem tipo especial****Carcinoma adenoescamoso de baixo grau****Carcinoma metaplásico fibromatose-símile****Carcinoma de células escamosas****Carcinoma de células fusiformes****Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal****Diferenciação condroide**

Diferenciação óssea

Diferenciação em outros tipos mesenquimais

Carcinoma metaplásico misto

Carcinoma mioepitelial

Fonte: OMS: Organização Mundial da Saúde; SOE: sem outra especificação.

ANEXO 4

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (ANTICORPO anti-c-erbB-2)

Streptoavidina-Biotina –Peroxidase

- 1 Desparafinizar as secções histológicas em xilol (2 banhos de 10 min), desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 min.) e hidratar em água corrente;
- 2 Recuperação antigênica em tampão citrato (0,1 M, pH 6,0) para os anticorpos *c-erbB-2* em banho-maria por 30 min a uma temperatura de 97°C;
- 3 Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ por 20 minutos a temperatura ambiente;
- 4 Lavar as secções em água corrente;
- 5 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por 30 minutos;
- 6 Incubar as secções com anticorpo primário a 4°C por 24 horas (overnight);
- 7 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 8 Incubar as secções com o anticorpo secundário biotinilado (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 min a uma temperatura de 30°C;
- 9 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 10 Incubar as secções com o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 minutos a uma temperatura de 30°C;
- 11 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 12 Aplicar o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Kit ENVISION, DAKO, K 3466, USA) sobre as secções até a mudança de coloração;
- 13 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes e depois em água corrente;
- 14 Contracorar com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavar em água corrente, desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 minutos) e clarificar em xilol (2 banhos de 1 minuto);
- 15 Montar as lâminas com bálsamo de Canadá.

5 ARTIGO 3

CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DOS CARCINOMAS MAMÁRIOS COM SUBTIPOS MOLECULARES BASAL-SÍMILE E HER2 +.*Cláudia Leal Macêdo***Ivana Lucia Oliveira Nascimento ****Marco Antônio Vasconcelos Rêgo*****Helenemarie Schaer Barbosa*******RESUMO**

Objetivo: Descrever as características clínicas e morfológicas tumorais do carcinoma infiltrante da mama de subtipo basal-símile, identificado por imunoistoquímica, bem como analisar as associações deste subtipo e do HER2 + em uma população de pacientes mastectomizadas. **Material e Métodos:** Em 171 pacientes realizou-se o estudo descritivo das variáveis clínico-patológicas. Para a classificação dos subtipos os escores dos receptores hormonais foram obtidos por meio dos laudos imunoistoquímicos, sendo realizada a técnica imunoistoquímica para o marcador HER2, CK5/6, EGFR, CK8 e p63. Foi utilizada a razão de prevalência entre os subtipos HER2 + e basal-símile e as variáveis clínicas e patológicas. **Resultados:** O subtipo luminal A foi observado em 65,5% dos tumores, o luminal B em 8,2%, o HER2 + em 3,5%, o subtipo basal-símile em 15,8% e o subtipo “mama normal” em 7,0% dos tumores. A maior percentagem de pacientes com idade acima de 40 anos foi nos subtipos basal-símile (92,6%). No subtipo basal-símile, 88,9% das amostras eram positivas para as CK5/6 e 25,9% para o EGFR. Os subtipos HER2 + e o basal-símile foram mais prevalentes nos pacientes com tumores de grau histológico III (RP=2,78 IC=95% 1,47-5,27) e também nos tumores pT3 (RP=1,87 IC=95% 1,01-3,46). **Conclusão:** Os fatores prognósticos tumorais representados pelo tamanho tumoral e grau histológico além da expressão imunoistoquímica dos receptores hormonais, proteína HER2 e as CK5/6 e/ou EGFR

* Mestre em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia. Doutoranda de Imunologia do Instituto de Ciências da Saúde da Universidade Federal da Bahia. E-mail: claudiamacedo14@hotmail.com. Endereço para correspondência: Rua Sócrates Guanaes Gomes; n°. 107 apto. 1301; Bairro: Cidade Jardim; Salvador – BA.

** Doutora em Imunologia, pela Universidade Federal da Bahia. Docente na Universidade Federal da Bahia- UFBA. ICS- Instituto Ciências de Saúde; PPGIm (Programa de Pós Graduação em Imunologia). E-mail: ivana@nob-ba.com.br

*** Doutor em Saúde Coletiva, pela Universidade Federal da Bahia. Docente na Universidade Federal da Bahia- UFBA. FAMED- Faculdade de Medicina da UFBA. E-mail: mrego@ufba.br

**** Doutora em Patologia Humana, pela Universidade Federal da Bahia. Patologista do Hospital Aristides Maltez- Salvador – BA. E-mail: hschaer@uol.com.br

permitem a definição do perfil imunofenotípico bem como a associação com os subtipos considerados de pior prognóstico, HER2 + e basal-*símile*.

Palavras Chave: Câncer de mama. Citoqueratina. Classificação. Imunoistoquímica.

5.1 INTRODUÇÃO

O carcinoma infiltrante da mama representa um grupo de tumores heterogêneos com uma ampla diversidade de características morfológicas e evolutivas. A classificação molecular dos subtipos baseada inicialmente apenas em ensaios de expressão gênica representou mais uma tentativa de estabelecer algum tipo de relação entre as características intrínsecas da neoplasia com a evolução da doença. Os estudos realizados com esta classificação demonstraram associações entre as células de origem, luminais e basais e os fatores clínico-patológicos ^[1,2]. Como os métodos de expressão gênica não podem ser utilizados em larga escala, devido a sua complexidade e alto custo, buscou-se a imunoistoquímica para correlacionar a expressão gênica dos subtipos com a expressão fenotípica determinando grupos de tumores semelhantes ^[3-8].

Assim de acordo com a expressão fenotípica de alguns marcadores, os subtipos tumorais foram classificados em luminal A, como aqueles que são RE +/RP +/ HER2-; o luminal B como RE +/RP+/HER2 + ; o subtipo HER2 + como RE -/RP-/HER2 + e o triplo-negativo com todos os três marcadores negativos. De acordo com a expressão positiva das CK 5/6 e do EGFR estes tumores foram subdivididos em subtipo basal-*símile* e subtipo “mama normal” ou não classificável se demonstra negatividade para todos os cinco marcadores citados acima ^[1-5].

O subtipo basal-*símile* foi considerado por alguns autores como sinônimo do triplo-negativo, mas posteriormente identificaram-se diferenças na sua expressão gênica e perfil imunoistoquímico, já que a adição das CK5/6, do EGFR e mais recentemente da p63 identificaram de forma mais específica este subtipo, sendo demonstradas correlação com fatores prognósticos e evolutivos ^[1-6,10-13]. Contudo, a caracterização imunofenotípica deste subtipo ainda é controversa ^[14].

O subtipo basal-*símile* e o HER2 + vêm sendo associados a fatores de pior prognóstico. Os carcinomas com subtipo basal-*símile* apresentam algumas

características clínicas e morfológicas específicas tais como alto grau histológico, elevada atividade mitótica além de alguma relação com tumores de maior dimensão [2-7, 11, 15]. Há escassos estudos no Brasil e na Bahia sobre a caracterização imunoistoquímica dos subtipos do carcinoma infiltrante da mama, bem como de suas associações com os fatores clínicos e histopatológicos [5, 10, 16]. Assim, o objetivo básico deste trabalho é descrever as características clínicas e morfológicas tumorais do carcinoma infiltrante da mama de subtipo basal-*símile*, identificado por imunoistoquímica, bem como analisar as associações deste subtipo e do HER2 + em uma população de pacientes provenientes de um hospital oncológico na Bahia.

5.2 MATERIAIS E MÉTODOS

5.2.1 Tipo de investigação e população do estudo

Trata-se de um estudo analítico observacional do tipo transversal. A população de estudo foi constituída por todas as 312 pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma infiltrante da mama no ano de 2002 e submetidas à mastectomia simples. Estes dados foram obtidos no Hospital Aristides Maltez (HAM), referência para o tratamento de câncer no estado da Bahia. Desta população, foram excluídos 141 prontuários (28 não acessíveis devido a problemas técnicos, 110 devido à ausência de blocos parafinados com tumor no arquivo e três por serem de pacientes do sexo masculino). Nos cento e treze prontuários excluídos, todas as variáveis clínicas e patológicas foram categorizadas e demonstravam similaridade com a população amostrada. A população efetivamente estudada foi constituída por 171 pacientes do sexo feminino.

5.2.2 Coleta de dados e variáveis estudadas

Os dados para este estudo foram coletados a partir dos prontuários médicos no HAM de todas as pacientes submetidas à mastectomia simples com retirada dos linfonodos axilares cujo diagnóstico histopatológico foi realizado entre primeiro de janeiro de 2002 a 31 de dezembro de 2002. Para a coleta de dados foi elaborada uma ficha padronizada utilizando o programa Microsoft-Office Excell-2010 (ANEXO 1). Foram analisadas as variáveis clínicas, patológicas e aquelas referentes aos escores dos marcadores imunohistoquímicos.

Foram analisadas as seguintes variáveis clínicas: data do diagnóstico, idade ao diagnóstico (em anos) categorizada em ≤ 40 anos e ≥ 40 anos. As variáveis paridade, história familiar, recidiva e metástases à distância foram categorizadas em: sem informação, sim, não. O *status* menopausal foi determinado pela informação do prontuário em sim, não e sem informação. Em relação ao estadiamento clínico a avaliação foi realizada em 136 prontuários, devido à falta e escassez de informações, sendo categorizados em estádios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV, segundo a União Internacional contra o Câncer (UICC) ^[17] (ANEXO 2).

As variáveis patológicas foram caracterizadas como tamanho tumoral, grau histológico, tipo histológico, *status* axilar e comprometimento das margens cirúrgicas. O tamanho tumoral foi determinado pelo estadiamento *p*TMN, considerando apenas o tamanho tumoral (T) ^[17]. Estas medidas foram classificadas como *p*T1, *p*T2 e *p*T3. Não houve tumores classificados como *p*T4 (ANEXO 2). Para determinação da variável grau histológico foi utilizado o sistema de gradação microscópica de Bloom-Richardson modificado nos casos de carcinoma ductal infiltrante (SOE) ^[18]. Foram considerados os graus I, II e III, de acordo com a soma das pontuações: grau I-bem diferenciado; grau II-moderadamente diferenciado e grau III-pouco diferenciado. Para a classificação histológica dos tumores foi empregada as recomendações do Colégio Americano de Patologistas ^[19] e OMS (ANEXO 3). O *status* axilar foi categorizado como: sem informação, positivo, negativo e a variável comprometimento das margens cirúrgicas em: sem informação, sim, não. Na variável tratamento consideraram-se todos aqueles feitos nesta população até o período final do acompanhamento, sendo categorizado como: sem informação, hormonioterapia, quimioterapia, radioterapia e tratamentos combinados.

Em relação aos marcadores imunoistoquímicos, os escores dos receptores hormonais (RE e RP) foram obtidos por meio dos resultados dos exames imunoistoquímicos do laboratório de patologia do HAM, sendo realizado a técnica imunoistoquímica para o marcador HER2, CK 5/6, EGFR, CK 8 e a p63. As variáveis utilizadas representaram os escores de quantificação dos receptores e dos marcadores tumorais que foram categorizados em positivo e negativo.

5.2.3 Técnica histopatológica

Foram selecionados os blocos de parafina com tecido tumoral e realizados cortes sequenciais em micrótomo convencional com espessura de 04 micrômetros. Foram confeccionadas duas secções histológicas a partir de cada bloco tumoral. Os cortes histológicos foram estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas com adesivo à base de silano (3-aminopropyltriethoxi-silano). Uma das lâminas foi corada pela hematoxilina-eosina para revisão histológica do grau e tipo histológico que foi realizada pela orientadora e pós-graduanda. As cinco lâminas restantes foram utilizadas para a realização do estudo imunoistoquímico.

5.2.4 Estudo imunoistoquímico

5.2.4.1 Anticorpos utilizados

O painel de anticorpos monoclonais que foram utilizados está expresso na Quadro 1. Os receptores hormonais não foram realizados, pois já faziam parte do laudo histopatológico da população estudada.

Quadro 1- Clones, diluição, fabricante dos anticorpos e recuperação antigênica dos anticorpos utilizados na imunistoquímica

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Recuperação antigênica	Controle positivo externo
Anti-c- <i>erbB-2</i>	SP3	1:1000	SPRING	Tampão citrato ph 6,0	Carcinoma infiltrante da mama
Anti-CK 5/6	34 β E12	1:100	DBS	Enzimática-pronase	Adenocarcinoma da próstata
Anti-CK 8	35 β E11	1:100	DBS	Enzimática-pronase	Adenocarcinoma pulmonar
Anti-EGFR	H11	1:50	BIOCARE MEDICAL	Enzimática-pronase	Carcinoma escamocelular
Anti-p63	4A4	1:200	DBS	Tampão citrato ph 6,0	Carcinoma de nasofaringe

Fonte: SPRING, DBS, BIOCARE MEDICAL

5.2.4.2 Técnica de imunistoquímica

O método de imunistoquímica utilizado para determinação da proteína HER2 foi o da Streptoavidina-Biotina-Peroxidase [20]. A recuperação antigênica foi realizada em tampão citrato com pH 6,0. Após incubação com os anticorpos primários anti-c-*erbB2*, anti-CK5/6, anti-EGFR e anti-p63, a imunodeteção foi realizada com o anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) seguida pelo complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA). Foi aplicado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Kit ENVISION, DAKO, K 3466, USA). Em seguida as lâminas foram coradas com hematoxilina de Harris (ANEXO 4, ANEXO 5 e ANEXO 6).

5.2.4.3 Critérios para interpretação da imunistoquímica

Na avaliação da proteína HER2 foi considerado o critério de coloração da Sociedade Americana de Oncologistas Clínicos e do Colégio Americano de Patologistas sendo classificado como escore 0, escore 1+, escore 2+ e escore 3+. O escore 0 e 1+, corresponde ao resultado negativo, o escore 2 corresponde ao

duvidoso e o escore 3+ ao resultado positivo ^[21]. A avaliação dos marcadores tumorais EGFR, p63, CK 5/6 e a CK8 seguiu critérios referidos na literatura ^[22]. Foram consideradas como expressão positiva quando mais de 10% das células tumorais demonstravam forte coloração na membrana e negativa, quando havia ausência de expressão em 10% ou menos de células tumorais.

5.2.4.4 Critérios imunistoquímicos para classificação dos subtipos oleculares

Na classificação dos subtipos foram utilizados os seguintes marcadores imunistoquímicos: RE, RP, HER2, CK5/6 e o EGFR. A classificação do presente estudo foi baseada no esquema utilizado por Nielsen (2004) e Carey (2006). O subtipo luminal A foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 -; o subtipo luminal B foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 +; o subtipo HER 2 + como RE - e/ou RP- e HER2 +; o subtipo basal-símile como RE - e/ou RP- , HER2 - e CK5/6 + e/ou EGFR + e o subtipo “mama normal” como RE - e/ou RP- , HER2 - e CK5/6 - e/ou EGFR - ^[2,4] (Figuras 1, 2, 3,4, 5).

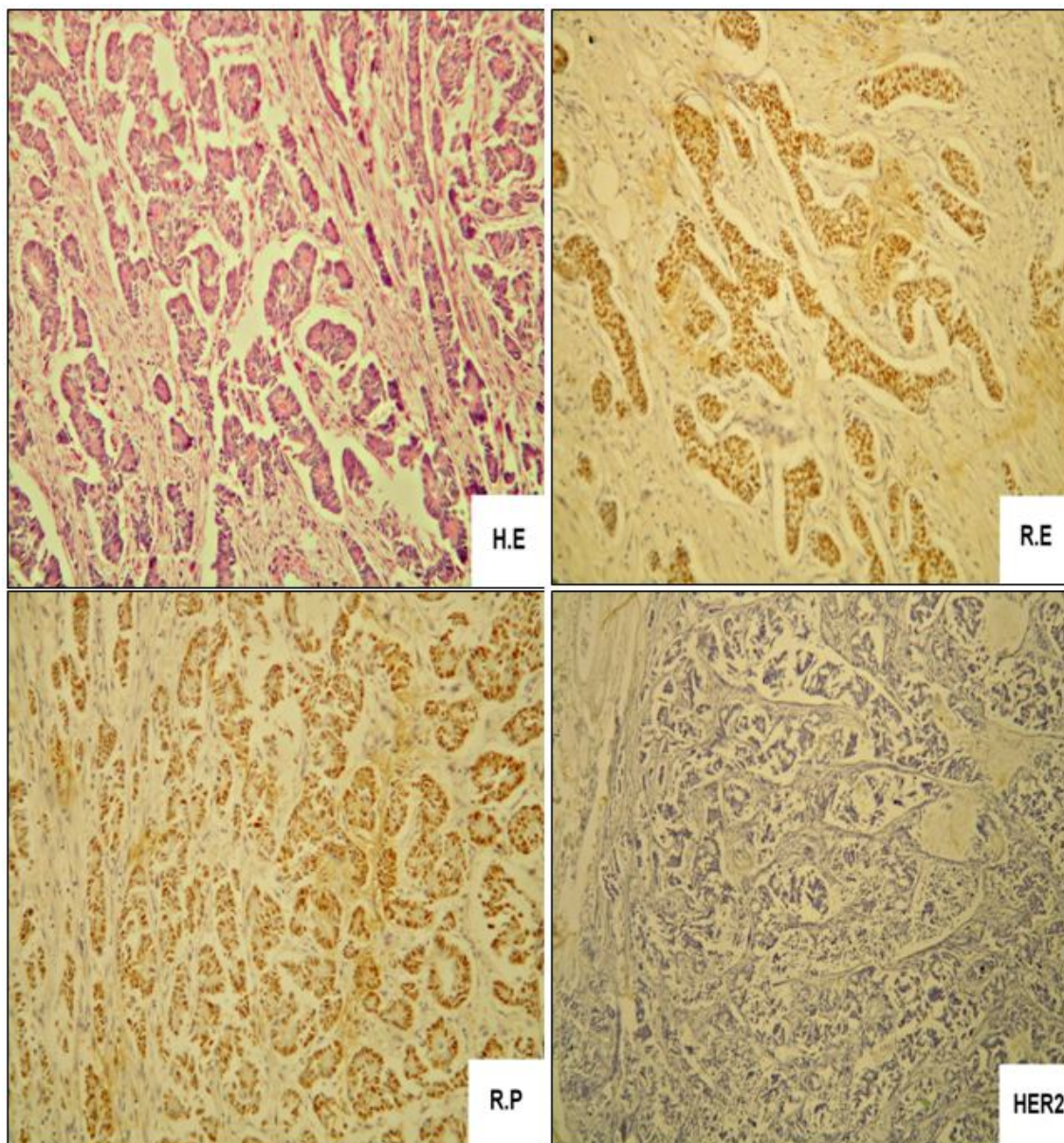


Figura 1- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal A (caso 7) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica negativa para o HER2.

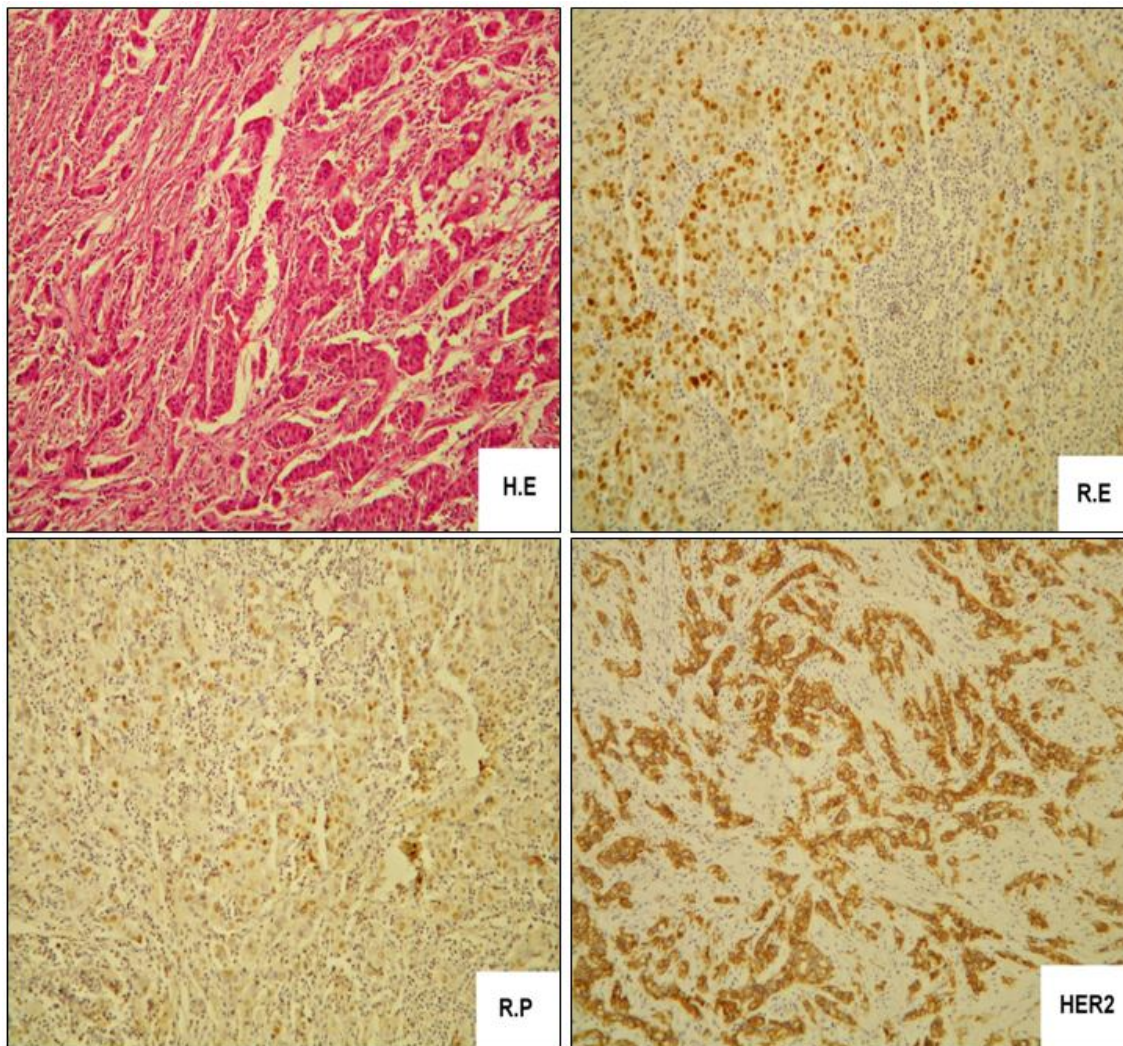


Figura 2- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular Luminal B (caso 72) (10 x): coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RE; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para RP e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2.

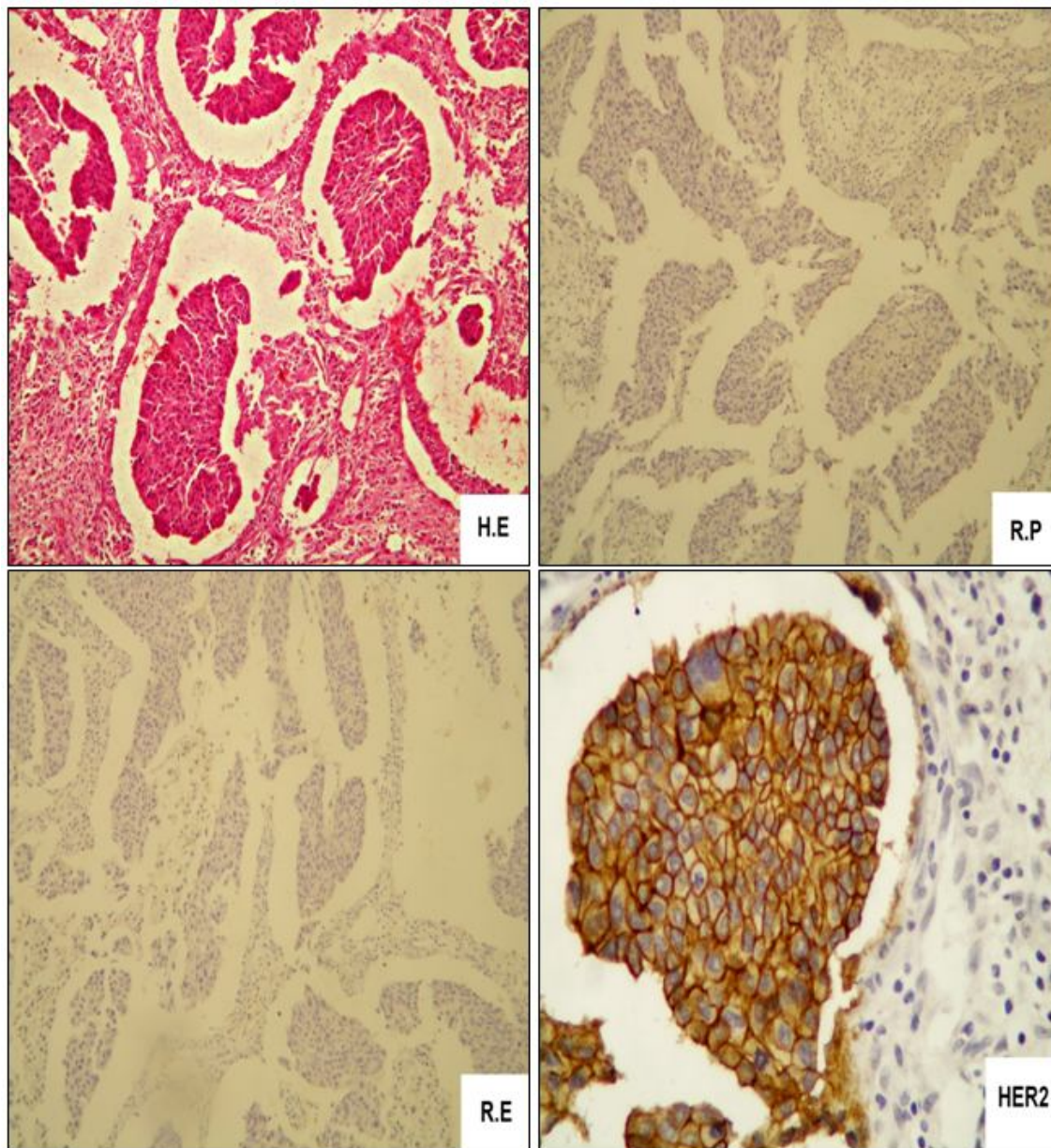


Figura 3- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular HER2 + (caso 132): coloração pela hematoxilina-eosina (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP (10x) e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para o HER2 (40x).

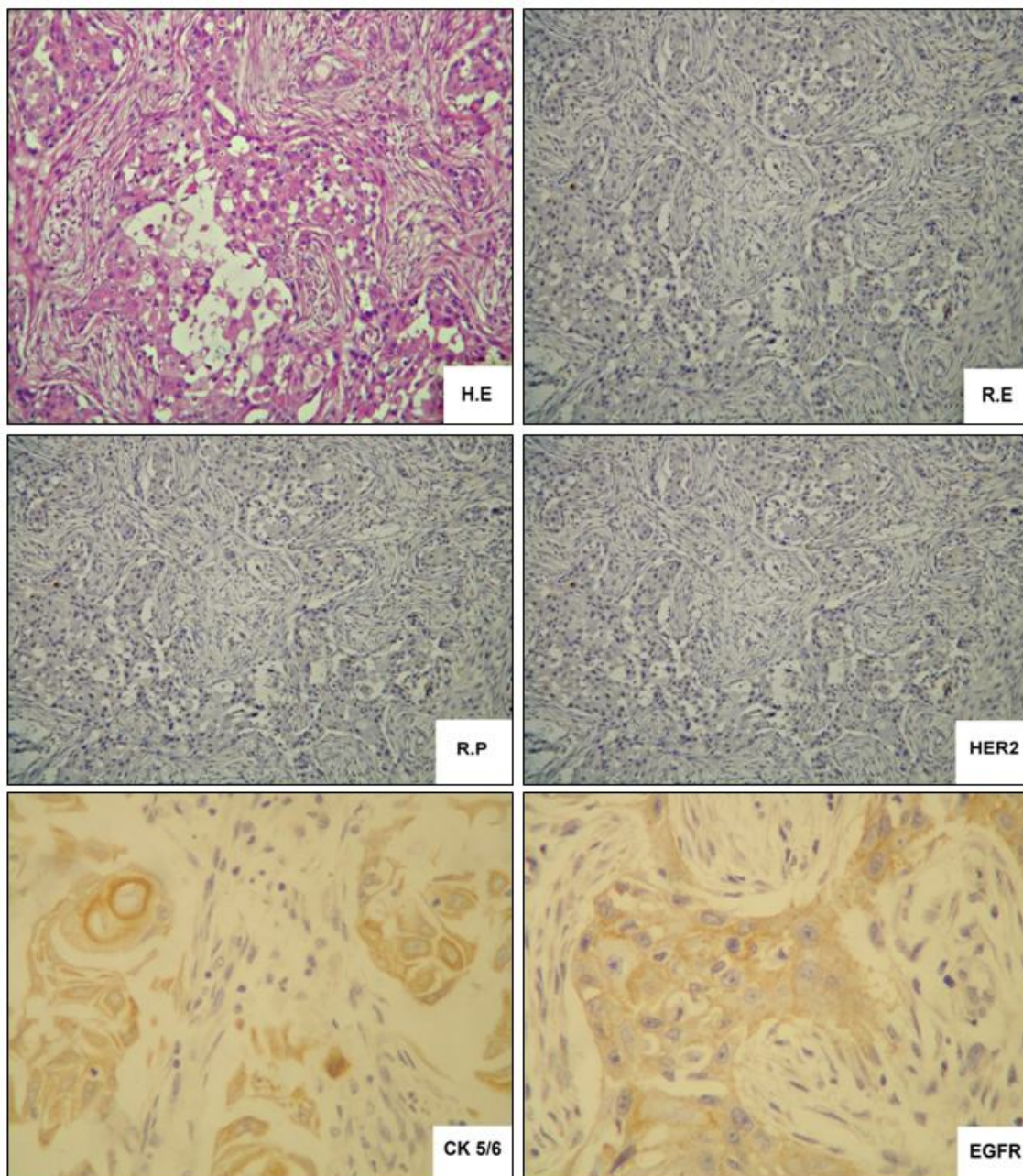


Figura 4- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular basal-*simile* (caso 35) : coloração pela hematoxilina-eosina (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE (10x); expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP (10x) e expressão imunoistoquímica negativa para o HER2 10x); expressão imunoistoquímica positiva de membrana da CK5/6; expressão imunoistoquímica positiva de membrana do EGFR.

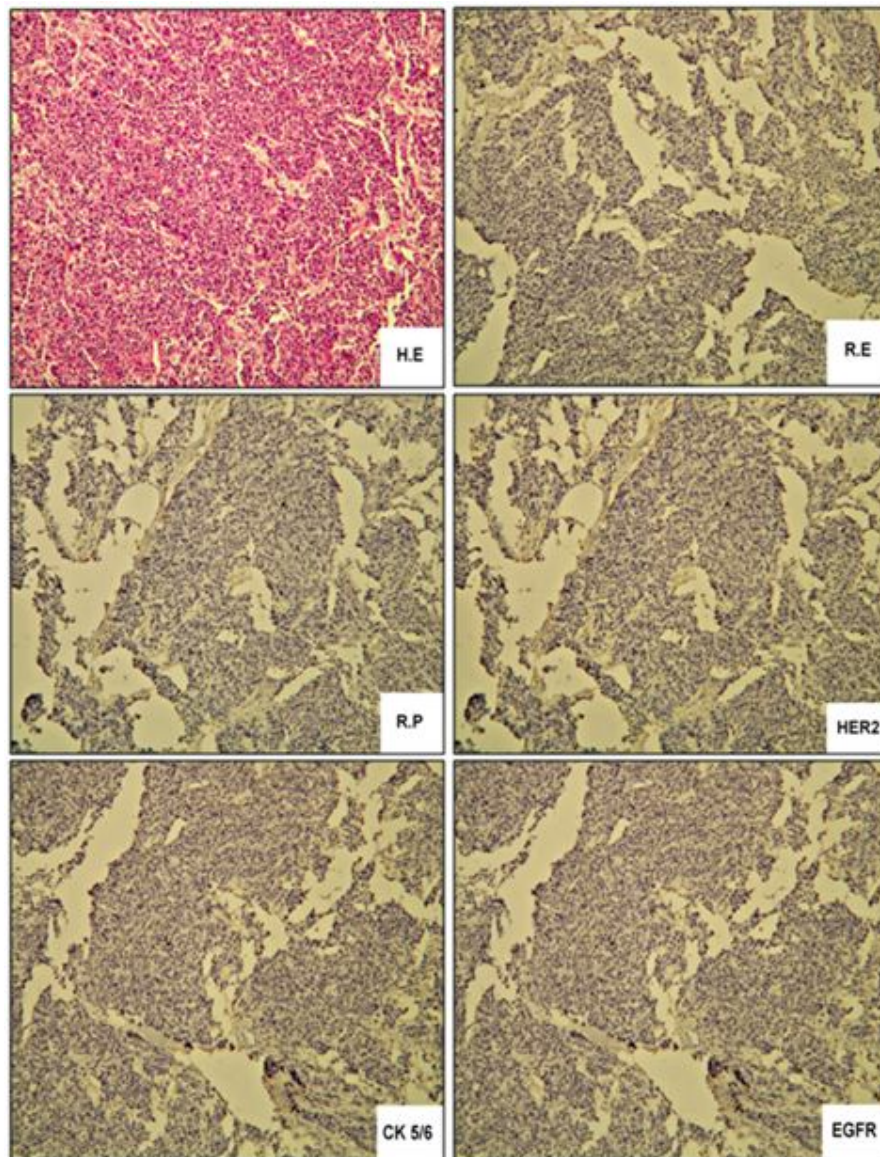


Figura 5- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular mama normal (caso 97) (10x) : coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RE; expressão imunoistoquímica negativa nuclear para RP; expressão imunoistoquímica negativa para o HER2; expressão imunoistoquímica negativa de membrana da CK5/6; expressão imunoistoquímica negativa de membrana do EGFR.

5.2.5 Análise estatística

A partir dos dados obtidos da ficha específica foi criado um banco de dados no programa EPI-INFO versão 6.03. As variáveis qualitativas foram descritas através de suas frequências simples e frequências relativas. As variáveis quantitativas foram descritas por meio de medidas de tendência central e de dispersão. Neste estudo transversal, foram utilizadas a razão de prevalência como medida de associação entre as variáveis caracterizadas como desfecho, representadas pelos subtipos considerados de pior prognóstico (HER2 + e *basal-símile*) e as variáveis clínicas e patológicas, que foram caracterizadas como fatores de exposição ou fatores prognósticos associados. Foram calculados intervalos de confiança de 95%, e os resultados foram considerados como estatisticamente significantes quando o valor de $p \leq 0,05$. Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Aristides Maltez –CEP/ LIGA CONTRA O CÂNCER DO HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ sob o protocolo de número 262/10 (APENDICE A).

5.3 RESULTADOS

5.3.1 Características clínicas e patológicas

O subtipo luminal A foi observado em 112 tumores (65,5%), o luminal B em 14 (8,2%), o HER2 + em 6 (3,5%), o subtipo *basal-símile* em 27 (15,8%) e o subtipo “mama normal” em 12 (7,0%). A maioria dos indivíduos tinha idade acima de 40 anos (85,9%) e essa proporção foi de 92,6% entre as mulheres com tumores *basal-símile*. Neste último subtipo, 59,3% das pacientes estavam menopausadas. No grupo de pacientes jovens, o subtipo HER2 foi o mais frequente (33,3%). Os subtipos HER2 (+) e o luminal B mostraram as maiores percentagens de pacientes com metástases à distância (33,3% e 22,2%, respectivamente). A recidiva tumoral ocorreu em 16,7 % dos subtipos HER2 + e o “mama normal” e em 3,7 % do subtipo *basal-símile*. Em todos os subtipos, a maioria das pacientes estudadas se encontrava no estágio clínico IIA (23,4%) (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características clínicas

<i>Características clínicas</i>	<i>Subtipos n(%)</i>				
	Luminal A 112(65,5%)	Luminal B 14(8,2%)	HER2 + 6 (3,5%)	Basal-símile 27(15,8%)	“Mama normal” 12(7,0%)
Idade					
≤ 40 anos	17 (15,2%)	2(14,3%)	2(33,3%)	2(7,4%)	1(8,3%)
≥ 40 anos	95 (84,8%)	12(85,7%)	4(66,7%)	25(92,6%)	11(91,7%)
Paridade					
Sem informação	3 (2,7%)	3(21,4%)	-	1(3,7%)	-
Sim	88 (78,6%)	10(71,4%)	6(100%)	22(81,5%)	11(91,7%)
Não	21(18,8%)	1(7,1%)	-	4(14,8%)	1(8,3%)
Status menopausal					
Sem informação	6 (5,4%)	2(14,3%)	1(16,7%)	1(3,7%)	-
Sim	68 (60,7%)	8(57,1%)	3(50,0%)	16(59,3%)	11(91,7%)
Não	38(33,9%)	4(28,6%)	2(33,3%)	10(37,0%)	1(8,3%)
Historia familiar					
Sem informação	-	-	-	-	-
Sim	16(14,3%)	4 (28,6%)	-	4(14,8%)	3(25%)
Não	96(85,7%)	10(71,4%)	6(100%)	23(85,2%)	9(75%)
Metástase á distância					
Sim	24(21,4%)	4 (28,6%)	2(33,3%)	6(22,2%)	1(8,3%)
Não	88(78,6%)	10 (71,4%)	4(66,7%)	21(77,8%)	11(91,7%)
Recidiva					
Sim	7(6,3%)	1(7,1%)	1(16,7%)	1(3,7%)	2(16,7%)
Não	105(93,8%)	13(92,9%)	5(83,3%)	26(96,3%)	10(83,3%)
Estadiamento clinico					
Sem informação	23 (20,6%)	2(14,3)	1(16,7%)	8(29,6%)	1(8,3%)
I	17(15,2%)	4(28,6%)	1(16,7%)	1(3,7%)	-
IIA	27(24,1%)	3(21,4%)	2(33,3%)	3(11,1%)	5(41,7%)
IIB	25(22,3%)	1(7,1%)	-	4(14,8%)	1(8,3%)
IIIA	8(7,1%)	2(14,3%)	2(33,3%)	5(18,5%)	3(25,0%)
IIIB	12(10,7%)	2(14,3%)	-	5(18,5%)	1(8,3%)
IV	-	-	-	1(3,7%)	1(8,3%)

Em relação às características patológicas, o grau histológico III foi o mais frequente nos subtipos HER2 + e no basal-símile (83,3% e 59,3%, respectivamente). Entre os tumores de maior dimensão (pT3), o subtipo basal-símile é o mais frequente (44,4%). Nos tumores basal-símile, o tipo histológico especial mais frequente foi o carcinoma metaplásico (11,1%). Dentre os tipos histológicos, o carcinoma ductal infiltrante foi o mais frequente, sendo o HER2 + e o luminal B, os de maiores proporções (100% e 92,9%, respectivamente). A maior frequência de pacientes axila positiva foi observada nos subtipos HER2 + e luminal B (83,3% e

71,4%, respectivamente). O tratamento mais utilizado nas pacientes com subtipo basal-símile foi a radioterapia e quimioterapia, combinados (41,7%)(Tabela 2) .

Tabela 2 - Distribuição das pacientes nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama segundo as características patológicas e tratamento

Características patológicas	Subtipos n(%)				
	Luminal A	Luminal B	HER2 +	Basal-símile	“Mama normal”
	112 (65,5%)	14 (8,2%)	6 (3,5%)	27(15,8%)	12(7,0%)
Graus					
I	12 (10,7%)	-	-	-	-
II	69 (61,6%)	7 (50%)	1 (16,7%)	11(40,7%)	5(41,7%)
III	31(27,7%)	7 (50%)	5 (83,3%)	16(59,3%)	7(58,3%)
Tamanhos					
pT1	29 (25,9%)	4 (28,6%)	-	4(14,8%)	1(8,3%)
pT2	61 (54,5%)	8 (57,1%)	6 (100%)	11(40,7%)	7(58,3%)
pT3	22 (19,6%)	2 (14,3%)	-	12(44,4%)	4(33,3%)
Tipos histológicos					
Ductal infiltrante (SOE)	101 (90,2%)	13 (92,9%)	6 (100%)	22(81,5%)	11(91,7%)
Lobular infiltrante	4 (3,6%)	-	-	-	-
Metaplasico	1 (0,9%)	-	-	3(11,1%)	-
Papilifero	-	-	-	-	1(8,3%)
Mucinoso	3 (2,7%)	-	-	-	-
Apocrino	3 (2,7%)	1 (7,1%)	-	1(3,7%)	-
Adenoide	-	-	-	1(3,7%)	-
Status axilar					
Sem informação	3 (2,7%)	-	-	3(11,1%)	-
Positivo	60 (53,6%)	10 (71,4%)	5 (83,3%)	16(59,3%)	7(58,3%)
Negativo	49 (43,8%)	4 (28,6%)	1 (16,7%)	8(29,6%)	5(41,7%)
Comprometimento das margens cirúrgicas					
Sem informação	2(1,8%)	-	-	-	-
Sim	12 (10,7%)	2 (14,3%)	-	2(7,4%)	2(16,7%)
Não	98 (87,5%)	12 (85,7%)	6 (100%)	25(92,6%)	10(83,3%)
Tratamentos mais frequentes					
Sem informação	-	-	-	5(18,5%)	1(8,3%)
Hormonioterapia	8 (7,1%)	-	-	-	1(8,3%)
Quimioterapia	-	-	-	2(7,4%)	-
Radioterapia	2 (1,8%)	2 (14,3%)	-	1(3,7%)	-
Radioterapia + quimioterapia + hormonioterapia	42 (37,5%)	6 (42,9%)	-	2(7,4%)	2(16,7%)
Radioterapia + quimioterapia	19 (17,0%)	2 (14,3%)	6 (100%)	10(37,0%)	5(41,7%)
Radioterapia + hormonioterapia	28 (25%)	3 (21,4%)	-	4(14,8%)	3(25,5%)
Quimioterapia + hormonioterapia	-	-	-	3(11,1%)	-

5.3.2 Marcadores imunoistoquímicos

No subtipo basal-*símile*, houve 24 casos positivos para as citoqueratinas de alto peso (88,9%), 12 positivos para as citoqueratinas de baixo peso (44,4%), oito para a p63 (29,6%) e sete para o EGFR (25,9%) (Figura 6). Observou-se ainda que 20,8% das amostras do subtipo basal-*símile* demonstravam positividade para CK5/6 e o EGFR e 8,3% demonstravam positividade para CK5/6, EGFR e a p63. No subtipo luminal A, que por definição são receptores hormonais positivos, os marcadores mais frequentes foram as citoqueratinas de alto peso, expressadas em 67% dos casos; 92,9% nos casos do luminal B foram positivas para as citoqueratinas de baixo peso e a p63. No subtipo HER2 + foram as CKs de alto e baixo peso as mais frequentes, com 50% dos casos. Já no subtipo “mama normal”, as citoqueratinas de baixo peso e a p63 foram positivas em 25% e em 8,3% dos casos (Tabela 3).

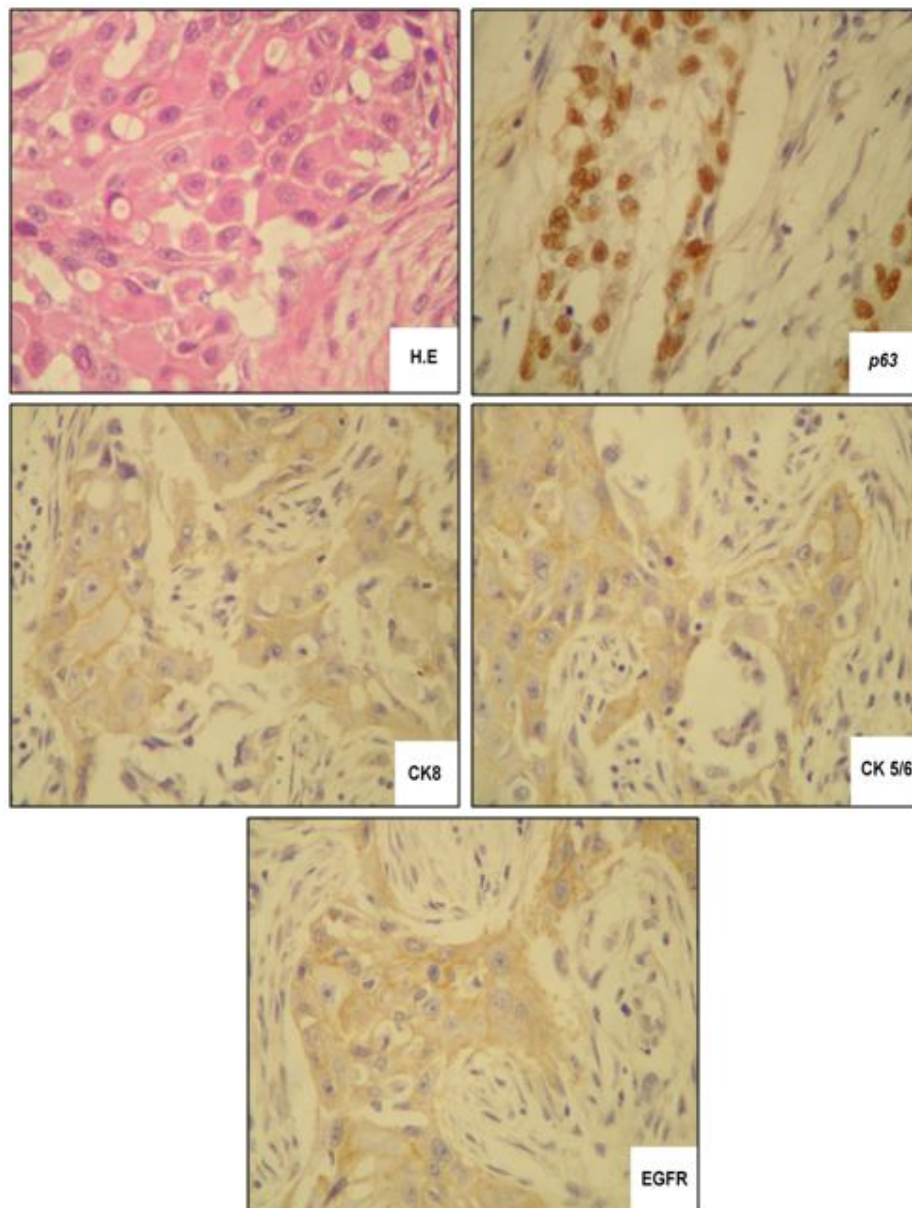


Figura 6- Estudo histopatológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma infiltrante da mama com subtipo molecular basal-*símile* (caso 144) (40x) : coloração pela hematoxilina-eosina; expressão imunoistoquímica positiva nuclear para *p63* ; expressão imunoistoquímica positiva de membrana para CK8 e expressão imunoistoquímica positiva de membrana para a CK5/6; expressão imunoistoquímica positiva de membrana do EGFR.

Tabela 3 - Distribuição dos marcadores imunohistoquímicos nos subtipos do carcinoma infiltrante da mama

Marcadores	Subtipos(n/%)				
	Luminal A 112(65,5%)	Luminal B 14(8,2%)	HER2 + 6 (3,5%)	Basal -símile 27(15,8%)	"Mama normal" 12(7,0%)
RE					
Positivo	112(100%)	14(100%)	0	0	0
Negativo	0	0	6(100%)	27(100%)	12(100%)
RP					
Positivo	100(89,3%)	11(78,6%)	0	0	0
Negativo	12(10,7%)	3(21,4%)	6(100%)	27(100%)	12(100%)
HER2					
Positivo	0	14(100%)	6(100%)	0	0
Negativo	112(100%)	0	0	27(100%)	12(100%)
EGFR					
Positivo	17(15,2%)	5(35,7%)	2(33,3%)	7(25,9%)	0
Negativo	95(84,8%)	9 (64,3%)	4(66,7%)	20(74,1%)	12(100%)
CK de alto peso					
Positivo	75(67,0%)	10(71,4%)	3(50%)	24(88,9%)	0
Negativo	37(33,0%)	4(28,6%)	3(50%)	3(11,1%)	12(100%)
CK de baixo peso					
Positivo	70(62,5%)	13(92,9%)	3(50%)	12(44,4%)	3(25,0%)
Negativo	42(37,5%)	1(7,1%)	3(50%)	15(55,6%)	9(75%)
p63					
Positivo	11(9,8%)	13(92,9%)	1(16,7%)	8(29,6%)	1(8,3%)
Negativo	101(90,2%)	1(7,1%)	5(83,3%)	19(70,4%)	11(91,7%)

5.3.3 Descrição das associações entre características clínico-patológicas e os subtipos moleculares

As associações entre as características clínico-patológicas e o subtipo basal-*símile* e não basal estão demonstradas nas tabelas 4 e 5. Observaram-se associações estatisticamente significantes entre o subtipo basal-*símile*, o grau histológico e o tamanho tumoral. O subtipo basal-*símile* era mais prevalente nos pacientes com tumores de grau histológico III (RP=2,31 IC=95% 1,15-4,68) do que nos de graus histológicos I/II e também nos tumores de maior dimensão $pT3$ (RP=2,62 IC=95% 1,34-5,13) do que nos tumores $pT1$ / $pT2$. No restante das características clínicas e patológicas, foram encontrados valores variados das razões de prevalência, porém sem significância estatística. O subtipo basal-*símile* foi o mais prevalente nos tumores com tamanhos agrupados $pT3/pT2$ (RP=1,64 IC=95% 0,61-4,46) do que nos tumores de menor dimensão $pT1$. Observou-se ainda que o subtipo basal-*símile* foi mais prevalente nos tumores de tipos histológicos especiais agrupados (RP=1,93 IC=95% 0,83-4,47) do que no ductal infiltrante (SOE). O subtipo basal-*símile* foi mais prevalente nos tumores com estadiamentos clínicos mais avançados (III + IV) (RP=3,11 IC=95% 1,08-8,95) do que nos estadiamentos I e II.

Tabela 4 - Associações entre as características clínicas e os subtipos do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características clínicas</i>	<i>Basal-símile</i>	<i>Não Basal</i>	<i>RP(IC95%)</i>	<i>Valor de p</i>
<i>Idade</i>				
≤ 40 anos	2	22		
≥ 40 anos	25	122	0,49(0,12-1,94)	0,44
<i>Paridade</i>				
Não	4	23		
Sim	22	125	0,92(0,35-2,46)	0,89
<i>Menopausa</i>				
Sim	16	90		
Não	10	45	0,83(0,40-1,71)	0,61
<i>Historia familiar</i>				
Sim	4	23		
Não	23	121	0,93(0,35-2,47)	0,89
<i>Metástase á distância</i>				
Sim	6	31		
Não	21	113	1,03(0,45-2,38)	0,94
<i>Recidiva</i>				
Sim	1	11		
Não	26	133	0,51(0,08-3,44)	0,74
<i>Estadiamento clinico</i>				
III + IV	14	57		
I + II	4	59	3,11(1,08-8,95)	0,02
*				

Tabela 5 - Associações entre as características patológicas e os subtipos do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características patológicas</i>	<i>Basal-símile</i>	<i>Não Basal</i>	<i>RP(IC95%)</i>	<i>Valor de p</i>
Graus				
<i>Grau III</i>	16	50		
<i>Grau II + I</i>	11	94	2,31(1,15-4,68)	0,01*
Tamanhos				
<i>pT3</i>	12	28		
<i>pT1 + pT2</i>	15	116	2,62(1,34-5,13)	0,004*
Tamanhos				
<i>pT3 + pT2</i>	23	4		
<i>pT1</i>	4	34	1,64(0,61-4,46)	0,31
Tipos histológicos				
<i>Ductal infiltrante (SOE)</i>	22	131		
<i>Especiais</i>	5	13	0,52(0,22-1,20)	0,52
Tipos histológicos				
<i>Especial</i>	5			
<i>Ductal infiltrante (SOE)</i>	22	131	1,93(0,83-4,47)	0,26
Status axilar				
<i>Positiva</i>	16	82		
<i>Negativa</i>	8	59	1,37(0,62-3,01)	0,43
Comprometimento das margens				
<i>Sim</i>	2	16		
<i>Não</i>	25	126	0,67(0,17-2,60)	0,79

5.3.4 Descrição das associações entre as características clínico-patológicas e os subtipos moleculares de pior prognóstico

As associações entre as características clínico-patológicas e os subtipos de pior prognóstico, tipo basal-*símile* /HER2 + e os subtipos luminais/ “mama normal” estão demonstradas nas tabelas 6 e 7. Foram encontradas associações estatisticamente significantes entre os subtipos de pior prognóstico, o grau histológico e o tamanho tumoral. Estes subtipos de pior prognóstico são mais prevalentes nos pacientes com tumores de grau histológico III (RP=2,78 IC=95% 1,47-5,27) do que nos de grau histológico I e II, e também nos tumores de maiores dimensões $pT3$ (RP=1,87 IC=95% 1,01-3,46) do que nos tumores $pT1/pT2$. Foram encontrados valores variados das razões de prevalência em relação às características clínicas e patológicas, porém sem significância estatística. Os subtipos de pior prognóstico foram mais prevalentes nos estadiamentos clínicos mais avançados (III e IV) (RP=2,03 IC=95% 0,84-4,61) do que nos estadiamentos I e II. Estes subtipos de pior prognóstico também foram mais prevalentes nos tumores com tamanhos agrupados $pT3/pT2$ (RP=2,07 IC=95% 0,78-5,53) do que nos tumores de menor dimensão $pT1$. Observou-se que estes subtipos foram mais prevalentes nos tumores de tipos histológicos especiais agrupados (RP=1,52 IC=95% 0,67-3,43) do que no ductal infiltrante (SOE). Em relação ao *status* axilar observou-se que estes subtipos foram mais prevalentes em pacientes com axila positiva (RP=1,52 IC=95% 0,67-3,43).

Tabela 6 - Associações entre características clínicas e o subtipos de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características clínicas</i>	<i>Basal-símile / HER2 +</i>	<i>Luminais / "mama normal"</i>	<i>RP(IC95%)</i>	<i>p</i>
Idade				
≤ 40 anos	4	20		
≥ 40 anos	29	118	0,84(0,33-2,19)	0,94
Paridade				
Não	4	23		
Sim	28	109	0,72(0,28-1,90)	0,68
Menopausa				
Sim	19	87		
Não	12	43	0,82(0,43-1,57)	0,55
Historia familiar				
Sim	4	23		
Não	29	115	0,74(0,28-1,92)	0,70
Metástase á distância				
Sim	8	29		
Não	25	109	1,16(0,57-2,35)	0,68
Recidiva				
Sim	2	10		
Não	30	122	0,84(0,23-3,11)	0,90
Estadiamento clinico				
III + IV	16	55		
I + II	7	56	2,03(0,89-4,61)	0,08

Tabela 7 - Associações das características patológicas e o subtipos de pior prognóstico do carcinoma infiltrante da mama

<i>Características patológicas</i>	<i>Basal-símile / HER2 +</i>	<i>Luminais / "mama normal"</i>	<i>RP(IC95%)</i>	<i>p</i>
Graus				
Grau III	21	45	2,78(1,47-5,27)	0,002*
Grau I + II	12	93		
Tamanhos				
pT3	12	28		
pT1 + pT2	21	110	1,87(1,01-3,46)	0,05*
Tamanhos				
pT3 + pT2	29	104		
pT1	4	34	2,07(0,78-5,53)	0,12
Tipos histológicos				
Ductal infiltrante (SOE)	28	125		
Especial	5	13	0,66(0,29-1,49)	0,33
Tipos histológicos				
Especial	5	13		
Ductal infiltrante (SOE)	28	125	1,52(0,67-3,43)	0,51
Status axilar				
Positivo	21	77		
Negativo	9	58	1,60(0,78-3,27)	0,27
Comprometimento das margens				
Sim	2	16		
Não	31	120	0,54(0,14-2,07)	0,52

5.4 DISCUSSÃO

A subdivisão sugerida por alguns autores do subtipo triplo-negativo em basal-*símile* e “mama normal” baseadas na expressão das CKs basais 5/6 e EGFR permanece controversa na literatura [7, 37, 40, 41]. No presente estudo considerou-se a classificação imunohistoquímica utilizada nos trabalhos de Nielsen (2004) e Cheang (2008), onde a adição das CKs basais 5/6 e/ou do EGFR pode aumentar a sensibilidade na determinação do subtipo basal-*símile*, já que a positividade destes dois marcadores foi associada à evolução clínica mais agressiva como grau histológico elevado e redução da sobrevida geral [1-6].

Há escassos trabalhos na literatura descrevendo os fatores clínicos e patológicos associados ao subtipo basal-*símile* (CK5/6 +e ou EGFR +) observando-se que a sua associação com fatores de pior prognóstico ainda permanece controversa [8, 12, 23, 24, 25]. Assim, no presente estudo descreveu-se as características clínico-patológicas associadas aos subtipos considerados de pior prognóstico, basal-*símile* e HER2 +, em uma população de mulheres mastectomizadas do Estado da Bahia.

Neste estudo o subtipo basal-*símile* mostrou uma frequência de 15,8%, semelhante às de casuísticas estrangeiras, tais como no trabalho pioneiro de expressão gênica de Perou (2000) e também no de Nielsen (2004), que mostraram frequências em torno de 15%. Outros trabalhos mostraram frequências discretamente elevadas quando comparadas ao presente estudo [3, 4, 9]. Esta frequência é elevada quando se comparou aos escassos trabalhos na literatura nacional, onde Matos et al (2005) e De Brot et al (2009), demonstraram frequências de 7,6% e de 6,3%, respectivamente [5,10].

As diferenças nos resultados obtidos podem estar relacionadas aos critérios de positividade utilizados nos diversos trabalhos. No presente estudo o mesmo critério de positividade foi utilizado por Matos *et al* (2005) para os marcadores basais (CK5/6 e EGFR), que foi de mais de 10% das células positivas. Já no trabalho de De Brot et al (2009), este critério era de mais de 1% das células positivas [5,10]. Além disso, outros aspectos podem explicar as diferenças entre estas frequências, como os fatores inerentes ao tipo de população estudada, tais como o perfil dos receptores hormonais, ou mesmo do perfil gênico, já que em Matos et al (2005) havia uma

relação entre o subtipo basal-*símile* com as mutações do BRCA1^[5]. Fatores étnicos, genéticos e raciais podem influenciar os subtipos, pois determinam diferenças intrínsecas na biologia tumoral^[4].

Assim, faz-se necessário em estudos posteriores, avaliar além das características clínico-patológicas, o perfil gênico desta população na tentativa de se identificar fatores peculiares desta população não somente em relação às mutações no BRCA1, mas também de outros genes, como o *TP53*. Foi realizado um estudo com outro grupo de pacientes oriundas deste mesmo hospital (HAM) consideradas como afro-brasileiras, onde foram descritas alterações peculiares dos nucleotídeos que não se observava em pacientes brancas oriundas do estado de São Paulo^[26].

O trabalho de Carey et al (2006), realizado na Carolina do Norte demonstrou que o fenótipo basal-*símile* era mais frequente em pacientes afro-americanas^[4]. Em trabalho recente com uma população da cidade de Salvador, observou-se maior frequência do subtipo triplo negativo em afrodescendentes do que em pacientes brancas^[27]. Ressalta-se, porém, que neste último trabalho, não foi considerado o uso dos marcadores basais.

Nesta população do estudo observou-se que as pacientes com tumores de subtipo basal-*símile* demonstraram idades superiores à 40 anos e a maioria destas era menopausada. Apesar dos relatos na literatura, associando este subtipo a pacientes jovens, a média de idade relatada em alguns trabalhos variou de 49,9 anos a 53,9 anos que é a faixa etária, onde estavam a maioria das pacientes deste trabalho (92,8%)^[4, 11, 15]. Já no grupo de pacientes com idade inferior ou igual à 40 anos, o subtipo HER2 foi o mais frequente, o que foi descrito na literatura onde o subtipo HER2 + esteve relacionado às pacientes jovens e pré-menopausadas^[6, 28].

A maioria das mulheres do estudo já tinha parido, observando-se que a nuliparidade foi o evento menos frequente em todos os subtipos. Há poucos relatos na literatura, correlacionando fatores de risco reprodutivo com os subtipos e que descrevem também baixas frequências de pacientes nulíparas nos tumores com fenótipo triplo-negativo^[29, 30]. Em relação à história familiar observou-se que dentre todos os subtipos a maioria das pacientes tinha história familiar negativa, confirmando a incidência maior de tumores esporádicos na população^[31].

No presente estudo os tumores com subtipo basal-*símile* demonstraram baixa frequência de metástases à distância e de recidiva tumoral. A literatura mostra resultados controversos pois, foram descritas altas taxas de recidiva tumoral e

metástases à distância neste subtipo [4, 9, 24, 32] ao lado de outros onde não se observa estas associações [12, 33]. Estas diferenças podem traduzir as características peculiares da população estudada, que demonstrou no geral, baixas frequências destes dois desfechos. Isto pode explicar ainda a heterogeneidade deste subtipo que pode mostrar grupos de tumores com características de bom e mau prognóstico, o que já foi descrito em alguns trabalhos na literatura [11, 24, 34, 28].

Ao contrário das baixas frequências destes dois desfechos, os tumores com subtipo basal-*símile* demonstraram elevada frequência de metástases axilares, o que é contrário ao observado em alguns estudos na literatura, onde estes tumores têm uma menor tendência a evoluir com metástases axilares [4, 8, 9, 11]. Este é outro fator prognóstico que pode estar relacionado às características intrínsecas desta população e que deve ser considerado na avaliação prognóstica individualizada, inclusive na determinação do tratamento.

A avaliação do estadiamento clínico foi prejudicada devido à qualidade das informações contidas nos prontuários, sendo caracterizado apenas em 136 pacientes. A maioria das pacientes com tumores de subtipo basal-*símile* estavam no estágio IIIA e IIIB, onde já se observa metástases axilares, fator considerado de pior prognóstico. Alguns estudos na literatura mostram no subtipo basal-*símile* frequências elevadas de tumores de maior dimensão bem como de grau histológico elevado [6, 7, 35]. Estes achados são semelhantes aos do presente estudo, onde além do subtipo HER2 e do subtipo “mama normal”, o basal-*símile* apresentou uma maior frequência de tumores com grau histológico III e de tumores com mais de 5,0 cm na sua maior dimensão.

O tipo histológico ductal infiltrante (SOE) foi o mais frequente dentre todos os subtipos, correspondendo a 89,5%, como observado em outros estudos [3, 6, 7, 23, 29, 30]. Nos tumores basal-*símile* o carcinoma metaplásico, foi o tipo histológico especial mais frequente, achado semelhante a outro estudo como o de Reis-Filho et al (2006) que utilizando o mesmo painel imunoistoquímico demonstrou alta frequência do fenótipo basal nos carcinomas metaplásicos [36]. Os tipos histológicos especiais representaram apenas 10,5% dos casos, resultando em número pequeno de casos e não se observando nesta população e em outro estudo, associação com fatores de pior prognóstico [34].

Observou-se alta frequência (88,9%) de amostras positivas para as CKs 5/6 no subtipo basal-*símile*, sendo mais elevada do que as encontradas nos trabalhos

de Matos et al (2005) e De Brot et al com 66,7% e 75%, respectivamente ^[5,10]. Além das diferenças nos escores de positividade, como observado no trabalho de De Brot, outros fatores podem explicar estas diferenças tais como: características intrínsecas à população ou mesmo da afinidade antigênica dos anticorpos empregados. Observa-se ainda que estes autores utilizaram apenas a CK5 como marcador basal e não a CK5/6, utilizada neste presente estudo ^[5,10]. Os outros marcadores utilizados representados pelo EGFR e a *p63* demonstraram frequências mais baixas em relação aos trabalhos citados acima ^[5,10].

Evidenciou-se nesta população estudada as CK5/6 foram os marcadores determinantes do fenótipo basal-*símile*, em conjunto, com a negatividade dos receptores hormonais. Alguns trabalhos associam a positividade destas CKs com fatores de pior prognóstico e evolução clínica mais agressiva ^[5, 37] o que poderia explicar uma maior prevalência do subtipo basal-*símile* em estadiamentos clínicos mais avançados (III + IV).

Observou-se ainda que nestes tumores com subtipo basal-*símile* houve expressão da CK8 em 44 % das amostras, percentual mais baixo do que nos subtipos luminais. Salienta-se ainda que esta expressão foi fortemente positiva quando se comparava com a expressão das CK5/6 e que a co-expressão destas duas citoqueratinas foi observada em 37% das amostras. Estes aspectos já haviam sido descritos em alguns trabalhos ^[1, 8, 23, 25]. No trabalho de Abd El-Rehim *et al* (2004) associou-se este fenótipo bimodal com tumores pouco diferenciados e metastáticos ^[23].

Os tumores com subtipo basal-*símile* mostraram uma maior prevalência nos tumores de maior dimensão e de grau histológico elevado. Esta associação foi observada em tumores acima de 2,0 cm, bem como quando agrupamos os tamanhos *pT2* e *pT3*, caracterizando assim um fator determinante nesta população estudada. Em relação ao tamanho tumoral, os achados na literatura são conflitantes, embora alguns autores tenham observado que tumores de maior dimensão eram mais frequentes no subtipo basal-*símile* ^[25, 38].

A associação descrita no presente estudo entre o grau histológico e o subtipo basal-*símile* foi demonstrada em vários trabalhos ^[8, 25, 32, 33]. O grau histológico III estava presente em 59,3% dos tumores com subtipo basal-*símile*, o que representou uma frequência reduzida quando se compara com os estudos citados acima, em que se observaram percentagens de até 75%. As características morfológicas dos

tumores com subtipo basal-*símile* ainda não são consideradas específicas, porém alguns autores descrevem alterações morfológicas e proliferativas mais frequentes, tais como o padrão de crescimento sólido e sincicial além do crescimento expansivo com bordas não infiltrativas, infiltrado linfocitário e alta atividade mitótica.

No presente estudo estas alterações morfológicas estavam incluídas na classificação determinada pelo sistema de Bloom-Richardson, modificado por Nottingham onde nos tumores de grau III do subtipo basal-*símile*, observaram-se baixa formação tubular, nucleomegalia e grande número de figuras de mitoses atípicas. Alguns autores descrevem ainda áreas de necrose geográfica e de cicatriz central [12, 25]. Nestes trabalhos seria necessário ainda distinguir tumores do subtipo basal-*símile* daqueles que são de alto grau e não basais (triplo-negativo), principalmente no que se refere à evolução da doença. Assim, seria necessário caracterizar separadamente estes fatores citológicos e arquiteturais para melhor determinação e posterior definição morfológica destes tumores, na tentativa de traçar um perfil mais individualizado da população estudada.

Observou-se ainda neste trabalho, que o agrupamento do subtipo basal-*símile* com o subtipo HER2 +, considerado também de pior prognóstico [8] eram mais prevalentes nos tumores de grau III e nos tumores de maior dimensão tumoral (pT3). Outros fatores, tais como o estadiamento clínico, os tipos histológicos especiais e a axila positiva, apesar de não significantes, mostraram também razões de prevalências consideráveis, o que pode ajudar na determinação de fatores peculiares do subtipo basal-*símile* em outros estudos.

As características clínicas e patológicas e as associações com fatores de pior prognóstico observadas no presente estudo com o subtipo basal-*símile* foram semelhantes aos resultados obtidos com esta mesma população com subtipo triplo-negativo (ainda não publicados). Estes dados demonstram que a expressão positiva das CK5/6 e/ou EGFR foi a diferença entre estes subtipos, sugerindo-se que a subdivisão do triplo-negativo em basal-*símile* não seria necessária. Este dado vem corroborar as determinações recentes da Conferência de St Gallen onde não foi recomendada a incorporação das CK5/6 ou do EGFR para nortear as decisões clínicas nos tumores do subtipo basal-*símile* [14].

Entre os achados principais deste estudo, destacam-se a elevada frequência dos tumores com subtipo basal-*símile* em relação às escassas casuísticas nacionais além de menor frequência de metástases à distância e de recidiva tumoral. Além

disto, houve associação significativa entre os subtipos basal-símile e HER2 + com tumores de maior dimensão e de grau histológico elevado. Assim, este estudo pode demonstrar que na rotina diária, fatores morfológicos do tumor além de um painel imunoistoquímico composto pelos receptores hormonais e pela proteína HER2 podem ajudar na caracterização dos subtipos, bem como na determinação daqueles de pior prognóstico. Ressalta-se porém, a necessidade de se avaliar em populações amostrais mais numerosas, as correlações existentes entre a expressão gênica, o perfil imunoistoquímico e a evolução destas pacientes.

5.5 REFERENCIAS

[1] PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602.

[2] NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**. 2004 Aug 15;10(16):5367-74. PubMed PMID: 15328174

[3] CHEANG, M. C. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res**. 2008 Mar 1;14(5):1368-76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1658. PubMed PMID: 18316557

[4] CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA**. 2006 Jun 7;295(21):2492-502. PubMed PMID: 16757721

[5] MATOS, I. et al. cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch*. 2005 Oct;447(4):688-94. Epub 2005 Oct 19. PubMed PMID: 16012853.

[6] NGUYEN, P. L. et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. **J Clin Oncol**. 2008 May 10;26(14):2373-8. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4287. Epub 2008 Apr 14. Erratum in: *J Clin Oncol*. 2008 Jun;26(18):3110. PubMed PMID: 1841363

- [7] SPITALE, A. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. **Ann Oncol.** 2009 Apr;20(4):628-35. doi: 10.1093/annonc/mdn675. Epub 2008 Dec 12. PubMed PMID: 19074747.
- [8] KIM, M. J. et al. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. **Hum Pathol.** 2006 Sep;37(9):1217-26. Epub 2006 Jul 18. PubMed PMID: 16938528.
- [9] BANERJEE, S. et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. **J Clin Pathol.** 2006 Jul;59(7):729-35. Epub 2006 Mar 23. PubMed PMID: 16556664; PubMed Central PMCID: PMC1860434
- [10] DE BROT, M. et al. Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome. **Rev Assoc Med Bras.** 2009 Sep-Oct;55(5):529-34. Portuguese. PubMed PMID: 19918651
- [11] FULFORD, L. G. et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. **Breast Cancer Res.** 2007;9(1):R4. PubMed PMID: 17217540; PubMed Central PMCID: PMC1851397.
- [12] FULFORD, L. G. et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. **Histopathology.** 2006 Jul;49(1):22-34. PubMed PMID: 16842243.
- [13] KUSIŃSKA, R. et al. Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma--relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2. **Pol J Pathol.** 2005;56(3):107-10. PubMed PMID: 16334976.
- [14] GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol.** 2011 Aug;22(8):1736-47. doi: 10.1093/annonc/mdr304. Epub 2011 Jun 27. PubMed PMID: 21709140; PubMed Central PMCID: PMC3144634
- [15] DEL CASAR, J. M. et al. Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.** 2008 Dec;141(2):147-52. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.07.021. Epub 2008 Sep 2. PubMed PMID: 18768247

[16] CINTRA, J. R. et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. **Rev Assoc Med Bras**. 2012 Apr;58(2):178-87. English, Portuguese. PubMed PMID: 22569612.

[17] EDGE, S. B. **American Joint Committee on Cancer: AJCC cancer staging manual**. 7th edition. New York: Springer; 2010

[18] ROBBINS, P. et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. **Hum Pathol**. 1995 Aug;26(8):873-9. PubMed PMID: 7635449.

[19] FITZGIBBONS, P. L. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**. 2000 Jul;124(7):966-78. Review. PubMed PMID: 10888772.

[20] BOENISCH, T. **Imunochemical staining methods**. Naish SJ (ed) Dako Corporation, Carpinteria, USA, 1989.

[21] HAMMOND, M. E. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Arch Pathol Lab Med**. 2010 Jul;134(7):e48-72. doi: 10.1043/1543-2165-134.7.e48. Review. PubMed PMID: 20586616.

[22] ABD EL-REHIM, D. M. et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterized series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer**. 2005 Sep 1;116(3):340-50. PubMed PMID: 15818618

[23] ABD EL-REHIM, D. M. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **J Pathol**. 2004 Jun;203(2):661-71. PubMed PMID: 15141381

[24] RAKHA, E. A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol**. 2006 Mar;208(4):495-506

[25] LIVASY, C. A. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol**. 2006 Feb;19(2):264-71. PubMed PMID: 16341146.

[26] NAGAI, M. A. et al. TP53 mutations in primary breast carcinomas from white and African-Brazilian patients. **Int J Oncol.** 2003 Jul;23(1):189-96. PubMed PMID: 12792793

[27] CORRÊA, P. B. et al. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. **Revista Ciências Médicas e Biológicas** v. 9, p. 3-7, 2010

[28] BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer.** 2007 May 1;109(9):1721-8. PubMed PMID: 17387718

[29] YANG, X. R. et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **J Natl Cancer Inst.** 2011 Feb 2;103(3):250-63. doi: 10.1093/jnci/djq526. Epub 2010 Dec 29. PubMed PMID: 21191117; PubMed Central PMCID: PMC3107570

[30] YANG, X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.** 2007 Mar;16(3):439-43. PubMed PMID: 17372238.

[31] COLLABORATIVE GROUP ON HORMONAL FACTORS IN BREAST CANCER. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. **Lancet.** 2001 Oct 27;358(9291):1389-99. Review. PubMed PMID: 1170548.

[32] POTEMSKI, P. et al. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. **Oncology.** 2005;69(6):478-85. Epub 2006 Jan 12. PubMed PMID: 16410686

[33] CALZA, S, et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. **Breast Cancer Res.** 2006;8(4):R34. PubMed PMID: 16846532; PubMed Central PMCID: PMC1779468.

[34] LAAKSO, M. et al. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. **Clin Cancer Res.** 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4185-91. PubMed PMID: 16857790.

[35]BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. **Curr Mol Med.** 2012 Jan;12(1):96-110. Review. PubMed PMID: 22082486; PubMed Central PMCID: PMC3343384

[36]REIS-FILHO, J. S. et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. **Histopathology.** 2006 Jul;49(1):10-21. PubMed PMID: 16842242

[37]RAKHA, E. A. et al. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. **Histopathology.** 2007 Mar;50(4):434-8. PubMed PMID: 17448018.

[38]FOULKES, W. D. et al.. The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. **Cancer Res.** 2004 Feb 1;64(3):830-5. PubMed PMID: 14871808.

[39]FOULKES, W. D. et al. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. **Breast Cancer Res Treat.** 2009 Sep;117(1):199-204. doi: 10.1007/s10549-008-0102-6. Epub 2008 Jul 4. PubMed PMID: 18600446.

[40]KREIKE, B. et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Res.** 2007;9(5):R65. PubMed PMID: 17910759; PubMed Central PMCID: PMC2242660.

[41]RAKHA, E. A. et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. **Clin Cancer Res.** 2009 Apr 1;15(7):2302-10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2132. Epub 2009 Mar 24. PubMed PMID: 19318481.

5.6 APÊNDICE



LIGA BAHIANA CONTRA O CÂNCER
HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ
DEPARTAMENTO DE ENSINO E PESQUISA

Salvador, 31 de março de 2010

CI Nº 11/2010

Dra. Helenemarie Schaer Barbosa
Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do HAM

Comunicamos a V.Sa., ter sido aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Artur Ventura de Matos as pesquisas intituladas “**CARACTERIZAÇÃO DOS SUBTIPOS IMUNOHISTOQUÍMICOS DOS CARCINOMAS DA MAMA E CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICOS**” dos pesquisadores **Helenemarie Schaer Barbosa e Claudia Leal Macedo**, a serem realizados nesse Serviço.

Atenciosamente,

Enfa. Stela Maria Leal Pinto Dantas
Presidente do DEP

ANEXO 2 ESTADIAMENTO CLINICO E PATOLÓGICO

CLASSIFICAÇÃO TNM CLÍNICA, UICC, 2003
Classificação clínica (cTNM) 6ª edição (UICC)
T Tumor primário
Tx Tumor primário não pode ser avaliado
T0 Não há evidência de tumor primário
Tis Carcinoma <i>in situ</i> Tis (CDIS) Carcinoma ductal <i>in situ</i> Tis (CLIS) Carcinoma lobular <i>in situ</i> Tis (Paget) Doença de Paget do mamilo sem tumor na mama
Nota: A doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor
T1 Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão. T1mic Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão Notas: Microinvasão é a extensão de células neoplásicas além da membrana basal, alcançando os tecidos adjacentes, sem focos tumorais maiores do que 0,1 cm em sua maior dimensão. Quando há focos múltiplos de microinvasão, somente o tamanho do maior foco é utilizado para classificar a microinvasão. (Não usar a soma dos focos individuais) A presença de múltiplos focos de microinvasão deve ser anotada como se faz com os carcinomas invasores extensos múltiplos. T1a Com mais de 0,1 cm, até 0,5 cm em sua maior dimensão T1b Com mais de 0,5 cm, até 1 cm em sua maior dimensão T1c Com mais de 1 cm, porém não mais de 2 cm em sua maior dimensão
T2 Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão
T3 Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão
T4 Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica ou à pele, somente como descritos em T4a a T4d Nota: A parede torácica inclui costelas, músculos intercostais, músculo serrátil anterior, mas não inclui o músculo peitoral. T4a Extensão à parede torácica T4b Edema (inclusive "pele de laranja" 'peau d'orange'), ou ulceração da pele da mama, ou nódulos cutâneos satélites confinados à mesma mama T4c Ambos (T4a e T4b), acima T4d Carcinoma inflamatório
Nota: O carcinoma inflamatório da mama é caracterizado por um endurecido difuso e intenso da pele da mama com bordas erisipelóides, geralmente sem massa tumoral subjacente. Se a biópsia de pele for negativa e não existir tumor primário localizado mensurável, o carcinoma inflamatório clínico (T4d) é classificado patologicamente como pTX. A retração da pele, do mamilo ou outras alterações cutâneas, exceto aquelas incluídas em T4b e T4d, podem ocorrer em T1, T2 ou T3, sem alterar a classificação.
N Linfonodos regionais
NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (p. ex., por terem sido previamente removidos)
N0 Ausência de metástase em linfonodos regionais N1 Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral(ais), móvel(eis)

N2 Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is) fixo(s) ou metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)

N2a Metástase em linfonodo(s) axilar(es) fixos uns aos outros ou a outras estruturas

N2b Metástase clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na ausência de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es)

N3 Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es) homolateral(ais) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es); ou clinicamente aparente* em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na presença de evidência clínica de metástase em linfonodo(s) axilar(es); ou metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es) homolateral(is) com ou sem envolvimento de linfonodo(s) axilar(es) ou mamário(s) interno(s)

Notas: *cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia)

N3a Metástase em linfonodo(s) infraclavicular(es)

N3b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) e axilares

N3c Metástase em linfonodo(s) supraclavicular(es)

M - Metástase à Distância

MX A presença de metástase à distância não pode ser avaliada

M0 Ausência de metástase à distância

M1 Metástase à distância

A categoria M1 pode ser adicionalmente especificada de acordo com as seguintes notações:

Pulmonar PUL (C34)

Medula óssea MO [MAR](C42.1)

Óssea OSS (C40, 41)

Pleural PLE (C38.4)

Hepática HEP (C22)

Peritoneal PER (C48.1,2)

Cerebral CER [BRA] (C71)

Supra-renal (Adrenal) ADR (C74)

Linfonodal LIN [LYM](C77)

Pele CUT [SKI](C44)

Outras OUT [OTH]

Copyright © 1996-2007 INCA - Ministério da Saúde

pT - Tumor Primário

A classificação histopatológica requer o exame do carcinoma primário sem tumor macroscópico nas margens de ressecção. Um caso pode ser classificado como

pT se houver somente tumor microscópico em uma margem.

As categorias pT correspondem às categorias T.

Nota: Ao se classificar a categoria pT, o tamanho do tumor é a medida do componente invasivo. Se há um grande componente in situ (p. ex., 4 cm) e um pequeno componente invasor (p. ex., 0,5 cm), o tumor é codificado como pT1a.

pN - Linfonodos Regionais

A classificação histopatológica requer a ressecção e o exame, pelo menos, dos linfonodos axilares inferiores (nível I). Tal ressecção incluirá, geralmente, 6 ou mais linfonodos. Se os linfonodos são negativos, mesmo que o número usualmente examinado seja não encontrado, classifica-se como pN0.

O exame de um ou mais linfonodos sentinelas pode ser usado para a classificação patológica. Se a classificação é baseada somente em biópsia do linfonodo sentinela sem dissecação subsequente dos linfonodos axilares, deve ser designado como (sn) para linfonodo sentinela, p. ex., pN1(sn).

pNX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados (não removidos para estudo ou previamente removidos) pN0 Ausência de metástase em linfonodos regionais*

Nota: *Casos somente com células tumorais isoladas (CTI [ITC]) nos linfonodos regionais são classificados como pN0. As CTI [ITC] são células tumorais únicas ou em pequenos grupamentos celulares, não maiores que 0,2 mm em sua maior dimensão, que são geralmente detectadas por imunohistoquímica ou métodos moleculares, mas que poderiam ter sido verificados pela coloração de rotina (H&E). As CTI [ITC], tipicamente, não mostram evidência de atividade metastática, p. ex., proliferação ou reação estromal.

pN1mi Micrometástase (maior que 0,2 mm, porém não maior que 2 mm em sua maior dimensão)

pN1 Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) homolateral(is), e/ou linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is) com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente**

pN1a Metástase em 1-3 linfonodo(s) axilar(es) incluindo pelo menos um maior que 2 mm em sua maior dimensão

pN1b Metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente**

pN1c Metástase em 1-3 linfonodos axilares e metástase microscópica em linfonodos mamários internos detectada por dissecação de linfonodosentinela, porém não clinicamente aparente**

pN2 Metástase em 4-9 linfonodos axilares homolaterais, ou em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), clinicamente aparente***, na ausência de metástase em linfonodos axilares

Notas: **não clinicamente aparente = não detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia).

***cl clinicamente aparente = detectado por exame clínico ou por estudos de imagem (excluindo linfocintigrafia) ou macroscopicamente visível patologicamente.

pN2a Metástase em 4-9 linfonodos axilares incluindo, pelo menos, um maior que 2 mm

pN2b Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), clinicamente aparente, na ausência de metástase em linfonodos axilares

pN3 Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares homolaterais; ou em linfonodos infra-claviculares homolaterais; ou metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(is), na

presença de um ou mais linfonodos axilares positivos; ou em mais de 3 linfonodos axilares clinicamente negativos, metástase microscópica em linfonodos mamários internos; ou em linfonodos supraclaviculares homolaterais

pN3a Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares (pelo menos um maior que 2 mm) ou metástase em linfonodos infraclaviculares

pN3b Metástase clinicamente aparente em linfonodo(s) mamário(s) interno(s), na presença de linfonodos axilares positivos; ou metástase em mais de 3 linfonodos axilares e em linfonodos mamários internos com metástase microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, porém não clinicamente aparente

pN3c Metástase em linfonodos supraclaviculares

pM - Metástase à distância

As categorias pM correspondem às categorias M.

Sumarizando essas classificações teremos o agrupamento dessas classificações em estágios, conforme o quadro a seguir:

Grupamento por Estádios

Estádio 0	Tis	N0	M0	
Estádio I	T1 ¹	N0	M0	
Estádio II	T0	N1	M0	
IIA	T1 ¹	N1 ¹	M0	
	T2	N0	M0	
Estádio	T2	N1	M0	
IIB	T3	N0	M0	
	T0	N2	M0	
	T1 ¹	N2	M0	
	T2	N2	M0	
	T3	N1, N2	M0	
Estádio	T4	N0, N1,	M0	
IIIB		N2		
Estádio	Qualquer	N3	M0	
IIIC	T			
Estádio	Qualquer	Qualquer	M1	
IV	T	N		

Nota: 1. T1 inclui o T1mic.

ANEXO 3 CLASSIFICAÇÃO DOS TIPOS HISTOLÓGICOS**Carcinoma microinvasivo****Carcinoma mamário invasivo****Carcinoma ductal invasivo, SOE****Carcinoma tipo misto****Carcinoma pleomórfico****Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto****Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos****Carcinoma com elementos melanóticos****Carcinoma lobular invasivo****Carcinoma lobular clássico****Carcinoma lobular sólido****Carcinoma lobular alveolar****Carcinoma lobular pleomórfico****Carcinoma túbulo-lobular****Carcinoma lobular misto****Carcinoma tubular****Carcinoma cribriforme invasivo****Carcinoma com elementos medulares****Carcinoma medular****Carcinoma medular atípico****Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares****Carcinoma mucinoso****Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete****Carcinoma micropapilar invasivo****Carcinoma com diferenciação apócrina****Carcinoma metaplásico sem tipo especial****Carcinoma adenoescamoso de baixo grau****Carcinoma metaplásico fibromatose-símile****Carcinoma de células escamosas****Carcinoma de células fusiformes****Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal****Diferenciação condroide**

Diferenciação óssea

Diferenciação em outros tipos mesenquimais

Carcinoma metaplásico misto

Carcinoma mioepitelial

Fonte: OMS: Organização Mundial da Saúde; SOE: sem outra especificação.

ANEXO 4

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (ANTICORPO anti-c-erbB-2)

Streptoavidina-Biotina –Peroxidase

- 1 Desparafinizar as secções histológicas em xilol (2 banhos de 10 min), desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 min.) e hidratar em água corrente;
- 2 Recuperação antigênica em tampão citrato (0,1 M, pH 6,0) para os anticorpos *c-erbB-2* em banho-maria por 30 min a uma temperatura de 97°C;
- 3 Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ por 20 minutos a temperatura ambiente;
- 4 Lavar as secções em água corrente;
- 5 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por 30 minutos;
- 6 Incubar as secções com anticorpo primário a 4°C por 24 horas (overnight);
- 7 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 8 Incubar as secções com o anticorpo secundário biotinilado (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 min a uma temperatura de 30°C;
- 9 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 10 Incubar as secções com o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 minutos a uma temperatura de 30°C;
- 11 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 12 Aplicar o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Kit ENVISION, DAKO, K 3466, USA) sobre as secções até a mudança de coloração;
- 13 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes e depois em água corrente;
- 14 Contracorar com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavar em água corrente, desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 minutos) e clarificar em xilol (2 banhos de 1 minuto);
- 15 Montar as lâminas com bálsamo de Canadá.

ANEXO 5

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (ANTICORPO anti-p63)

Streptoavidina-Biotina –Peroxidase

- 1 Desparafinizar as secções histológicas em xilol (2 banhos de 10 min), desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 min.) e hidratar em água corrente;
- 2 Recuperação antigênica em tampão citrato (0,1 M, pH 6,0) para os anticorpo anti-p63 em banho-maria por 30 min a uma temperatura de 97°C; adicionado Tween (0,2%);
- 3 Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ por 20 minutos a temperatura ambiente;
- 4 Lavar as secções em água corrente;
- 5 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por 30 minutos;
- 6 Incubar as secções com anticorpo primário a 4°C por 24 horas (overnight);
- 7 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 8 Incubar as secções com o anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 min a uma temperatura de 30°C;
- 9 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 10 Incubar as secções com o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 minutos a uma temperatura de 30°C;
- 11 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes;
- 12 Aplicar o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Kit ENVISION, DAKO, K 3466, USA) sobre as secções até a mudança de coloração;
- 13 Lavar as secções em PBS (0,16M, pH 7,6) por duas vezes e depois em água corrente;
- 14 Contracorar com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavar em água corrente, desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 minutos) e clarificar em xilol (2 banhos de 1 minuto);
- 15 Montar as lâminas com bálsamo de Canadá.

ANEXO 6

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (ANTICORPOS anti-CK5/6, anti-CK8 e anti-EGFR)

Streptoavidina-Biotina –Peroxidase

- 1 Desparafinizar as secções histológicas em xilol (2 banhos de 10 min), desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 min.) e hidratar em água corrente;
- 2 Recuperação antigênica pela técnica enzimática pronase para os anticorpos a uma temperatura ambiente por 10 minutos;
- 3 Bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ por 20 minutos a temperatura ambiente;
- 4 Lavar as secções em água corrente;
- 5 Lavar as secções em PBS (0,16M, *pH* 7,6) por 30 minutos;
- 6 Incubar as secções com anticorpo primário a 4°C por 24 horas (overnight);
- 7 Lavar as secções em PBS (0,16M, *pH* 7,6) por duas vezes;
- 8 Incubar as secções com o anticorpo secundário biotilado (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 min a uma temperatura de 30°C;
- 9 Lavar as secções em PBS (0,16M, *pH* 7,6) por duas vezes;
- 10 Incubar as secções com o complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (Kit LSAB plus System-HRP-DAKO, K0690, USA) por 25 minutos a uma temperatura de 30°C;
- 11 Lavar as secções em PBS (0,16M, *pH* 7,6) por duas vezes;
- 12 Aplicar o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (Kit ENVISION, DAKO, K 3466, USA) sobre as secções até a mudança de coloração;
- 13 Lavar as secções em PBS (0,16M, *pH* 7,6) por duas vezes e depois em água corrente;
- 14 Contracorar com hematoxilina de Harris por 30 segundos, lavar em água corrente, desidratar em álcool absoluto (2 banhos de 5 minutos) e clarificar em xilol (2 banhos de 1 minuto);
- 15 Montar as lâminas com bálsamo de Canadá.

6 CONCLUSÃO GERAL

Os resultados obtidos no presente estudo permitem as seguintes conclusões:

- A população estudada apresentou média de idade inferior à de países desenvolvidos e semelhantes às de outras regiões brasileiras; baixa incidência de metástase à distância e de recidiva tumoral, além da maioria dos pacientes estarem no estágio clínico II da doença. Estes achados podem traduzir a redução de casos avançados do câncer de mama, observada recentemente no Brasil;
- Os tumores *pT2*, de grau II e tipo histológico ductal infiltrante foram mais frequentes em concordância com os observados em outras regiões brasileiras, e houve elevada frequência de metástases axilares. Estes achados podem contribuir conjuntamente com o perfil histopatológico na determinação do prognóstico e de condutas terapêuticas mais efetivas para esta população;
- A taxa de sobrevida foi superior à de outros estados brasileiros e semelhante àquela dos países desenvolvidos, o que pode refletir características peculiares da população estudada, tais como: estágios clínicos mais iniciais, fácil acesso aos métodos diagnósticos e melhor padronização do estadiamento e tratamento;
- O comprometimento das margens cirúrgicas, metástases à distância e o *status* menopausal foram as variáveis que influenciaram de forma significativa a sobrevida, enfatizando a importância da padronização destes dados nos prontuários médicos;
- O estudo imunoistoquímico com a determinação dos receptores hormonais, da proteína HER2 e das citoqueratinas basais, permitiu a identificação dos subtipos de pior prognóstico triplo-negativo, basal-símile e HER2 + que demonstraram características clínicas e patológicas peculiares;

- Na análise multivariada os tumores com subtipos luminal A, luminal B e HER2 + foram as variáveis significantes que influenciaram na sobrevida, observando-se que o subtipo HER2 + demonstrou maior risco de morte, semelhantemente ao observado na literatura;
- Os tumores com subtipo triplo-negativo mostraram frequência mais elevada do que a observada nas casuísticas estrangeiras e nacionais, o que pode estar relacionado às características genéticas e ascendência africana da população;
- Observou-se associação significativa entre o subtipo triplo-negativo e o agrupamento do triplo negativo com o HER2 + e os tumores *pT3* e com grau histológico III, indicando que estes subtipos podem ser considerados de pior prognóstico;
- Os tumores com subtipo basal-*símile* tiveram frequências semelhantes ao de casuísticas estrangeiras sendo mais elevadas do que nos escassos estudos nacionais. Esta diferença pode estar relacionada aos critérios de positividade bem como a fatores inerentes à população;
- Observou-se associação significativa entre o subtipo basal-*símile* e o agrupamento basal *símile* com o HER2 + e os tumores *pT3* e com grau histológico III, indicando que estes subtipos podem também ser considerados de pior prognóstico;
- A expressão positiva das CK5/6 e/ou EGFR foi a única diferença entre o subtipo basal-*símile* e o triplo-negativo, já que a maioria das características clínico-patológicas e a expressão dos receptores hormonais e do HER2 eram semelhantes. Este achado pode indicar que não é necessária esta subdivisão do subtipo triplo-negativo em basal-*símile*;
- Em conjunto, a determinação das características clínico-patológicas e a avaliação padronizada dos marcadores imunoistoquímicos, representados pelos receptores hormonais e proteína HER2 possibilitam definir um perfil fenotípico

consistente que mostra correlação com os subtipos do carcinoma infiltrante da mama.

7 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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 cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer**. 2005 Sep 1; 116(3):340-50. PubMed PMID: 15818618

ABD EL-REHIM, D.M. et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. **J Pathol**. 2004 Jun; 203(2):661-71. PubMed PMID: 15141381.

ABRAHAM, B. K. et al. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clin Cancer Res**. 2005 Feb 1; 11(3):1154-9. PubMed PMID: 15709183.

ABREU, E.; KOIFMAN, S. **Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 48, n.1, Jan/Fev/Mar, 2002. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/rbc/n_48/v01/pdf/revisao.pdf>. Acesso em: 10/02/2013.

ADEBAMOWO, C. A. et al. Immunohistochemical and molecular subtypes of breast cancer in Nigeria. **Breast Cancer Res Treat**. 2008 Jul; 110(1):183-8. Epub 2007 Aug 3. PubMed PMID: 17674190.

ADEBAMOWO, C. A.; AJAYI, O. O. Breast cancer in Nigeria. **West Afr J Med**. 2000 Jul-Sep; 19(3):179-91. Review. PubMed PMID: 11126081.

ALBERGARIA, A. et al. Nottingham Prognostic Index in triple-negative breast cancer: a reliable prognostic tool? **BMC Cancer**. 2011 Jul 15;11:299. doi: 10.1186/1471-2407-11-299. PubMed PMID: 21762477; PubMed Central PMCID: PMC3151231

ALESKANDARANY, M. A. et al. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, and triple-negative biologic classes of breast cancer. **Breast Cancer Res**. 2012 Jan 6; 14(1):R3. PubMed PMID: 22225836; PubMed Central PMCID: PMC3496118.

AL-HAJJ, M. et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 2003 Apr 1; 100(7):3983-8. Epub 2003 Mar 10. Erratum in: Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 May 27; 100(11):6890. PubMed PMID: 12629218; PubMed Central PMCID: PMC153034.

ALI, H. R. et al. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. **Breast Cancer Res.** 2011;13(6):R118. doi: 10.1186/bcr3061. Epub 2011 Nov 23. PubMed PMID: 22112299; PubMed Central PMCID: PMC3326560.

AL-KURAYA, K. et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. **Cancer Res.** 2004 Dec 1; 64(23):8534-40. PubMed PMID: 15574759.

ALLRED, D. C. et al. Overexpression of HER-2/neu and its relationship with other prognostic factors change during the progression of in situ to invasive breast cancer. **Hum Pathol.** 1992 Sep; 23(9):974-9. PubMed PMID: 1355464.

ALLRED, D. C.; HARVEY, J. M.; BERARDO, M.; CLARK, G. M. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod Pathol.** 1998 Feb;11(2):155-68. Review. PubMed PMID: 9504686.

ALVARENGA, C. A. et al. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. **J Clin Pathol.** 2011 Jun; 64(6):493-7. doi: 10.1136/jcp.2011.089862. Epub 2011 Mar 22. PubMed PMID: 21427448.

ALVES, V. A. F., BACCHI, C. E., VASSALLO, J. **Manual de imuno-histoquímica.** São Paulo: Sociedade Brasileira de Patologia, 1999. 269 p.

ANDERS, C. K.; CAREY, L. A. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. **Clin Breast Cancer.** 2009 Jun; 9 Suppl 2:S73-81. doi: 10.3816/CBC.2009.s.008. Review. PubMed PMID: 19596646; PubMed Central PMCID: PMC2919761.

ANDERSON, W. F.; CHATTERJEE, N.; ERSHLER, W. B.; BRAWLEY, O. W. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **Breast Cancer Res Treat.** 2002 Nov; 76(1):27-36. PubMed PMID: 12408373.

ANDERSON, W.F. et al. Tumor variants by hormone receptor expression in white patients with node-negative breast cancer from the surveillance, epidemiology, and end results database. **J Clin Oncol.** n.1, v.19, p.18-27: Jan. 2001.

ARIAZI, E. A.; CLARK, G. M.; MERTZ, J. E. Estrogen-related receptor alpha and estrogen-related receptor gamma associate with unfavorable and favorable

biomarkers, respectively, in human breast cancer. **Cancer Res.** 2002 Nov 15; 62(22):6510-8. PubMed PMID: 12438245.

AWADELKARIM, K. D. et al. Pathological, clinical and prognostic characteristics of breast cancer in Central Sudan versus Northern Italy: implications for breast cancer in Africa. **Histopathology.** 2008 Mar; 52(4):445-56. doi: 10.1111/j.1365-2559.2008.02966.x. PubMed PMID: 18315597.

BACCHI, C. E.; HER-2/neu (C-erbB-2) e câncer da mama. **Rev Bras Mastol** 2001; 11:143-50.

BADVE, S. Equivalency of RT-PCR and immunohistochemistry: fact or factoid. **Breast Cancer Res Treat.** 2009 Jul; 116(1):145-7. doi: 10.1007/s10549-008-0176-1. Epub 2008 Sep 12. Review. PubMed PMID: 18787946.

BADVE, S. et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. **Mod Pathol.** 2011 Feb; 24(2):157-67. doi: 10.1038/modpathol.2010.200. Epub 2010 Nov 12. Review. PubMed PMID: 21076464.

BADVE, S.; NAKSHATRI, H. Oestrogen-receptor-positive breast cancer: towards bridging histopathological and molecular classifications. **J Clin Pathol.** 2009 Jan; 62(1):6-12. doi: 10.1136/jcp.2008.059899. Epub 2008 Sep 15. Review. PubMed PMID: 18794199.

BAGARIA, S. P. ET AL. Prognostic value of basal phenotype in HER2-overexpressing breast cancer. **Ann Surg Oncol.** 2012 Mar; 19(3):935-40. doi: 10.1245/s10434-011-2032-5. Epub 2011 Aug 31. PubMed PMID: 21879270

BANERJEE, S. et al. Smith IE. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. **J Clin Pathol.** 2006 Jul; 59(7):729-35. Epub 2006 Mar 23. PubMed PMID: 16556664; PubMed Central PMCID: PMC1860434

BARBARESCHI, M. et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. **Am J Surg Pathol.** 2001 Aug; 25(8):1054-60. PubMed PMID: 11474290.

BARROS, A.C.D. et al. **Mastologia:** Condutas. Rio de Janeiro: Revinter, 1999.
BAUER, K. R. et al. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the

so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**. 2007 May 1;109(9):1721-8. PubMed PMID: 17387718.

BERRY, D. A. et al. HER-2/neu and p53 expression versus tamoxifen resistance in estrogen receptor-positive, node-positive breast cancer. **J Clin Oncol**. 2000 Oct 15; 18(20):3471-9. PubMed PMID: 11032587.

BERTOLO, C. et al. Differences and molecular immunohistochemical parameters in the subtypes of infiltrating ductal breast cancer. **Am J Clin Pathol**. 2008 Sep; 130(3):414-24. doi: 10.1309/J3QV9763DYPV338D. PubMed PMID: 18701415

BERTUCCI, F. et al. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. **Cancer Res**. 2006B May 1; 66(9):4636-44. PubMed PMID: 16651414

BERTUCCI, F. et al. Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. **Hum Mol Genet**. 2000 Dec 12; 9(20):2981-91. PubMed PMID: 11115842.

BERTUCCI, F. et al. How basal are triple-negative breast cancers? **Int J Cancer**. 2008A Jul 1; 123(1):236-40. doi: 10.1002/ijc.23518. PubMed PMID: 18398844.

BERTUCCI, F. et al. How different are luminal A and basal breast cancers? **Int J Cancer**. 2009 Mar 15; 124(6):1338-48. doi: 10.1002/ijc.24055. PubMed PMID: 19058218.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D. Reasons for breast cancer heterogeneity. **J Biol**. 2008; 7(2):6. doi: 10.1186/jbiol67. Review. PubMed PMID: 18304379; PubMed Central PMCID: PMC2263121.

BERTUCCI, F.; BIRNBAUM, D.; GONCALVES, A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. **Mol Cell Proteomics**. 2006A Oct; 5(10):1772-86. Epub 2006 May 29. Review. PubMed PMID: 16733261.

BERTUCCI, F.; CERVERA, N.; BIRNBAUM, D. A gene signature in breast cancer. **N Engl J Med**. 2007 May 3;356(18):1887-8; author reply 1887-8. PubMed PMID: 17476019.

BERTUCCI, F.; FINETTI, P.; BIRNBAUM, D. Basal breast cancer: a complex and deadly molecular subtype. **Curr Mol Med.** 2012 Jan; 12(1):96-110. Review. PubMed PMID: 22082486; PubMed Central PMCID: PMC3343384.

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 EGFR-activating mutations. **Mod Pathol.** 2005 Aug; 18(8):1027-33. PubMed PMID: 15920544.

BHARGAVA, R. et al. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases. **Cancer.** 2010 Mar 15; 116(6):1431-9. doi: 10.1002/cncr.24876. Erratum in: *Cancer.* 2011 May 15; 117(10):2238. PubMed PMID: 20131351.

BHARGAVA, R. et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. **Int J Clin Exp Pathol.** 2009; 2(5):444-55. Epub 2009 Feb 9. PubMed PMID: 19294003; PubMed Central PMCID: PMC2655155.

BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; MCMANUS, K.; DABBS, D. J. CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the "basal-like" phenotype of breast carcinoma. **Am J Clin Pathol.** 2008 Nov; 130(5):724-30. doi: 10.1309/AJCP3KFF1LTYWQIY. PubMed PMID: 18854264

BIRNBAUM, D. et al. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). **Int J Oncol.** 2004 Aug; 25(2):249-58. Review. PubMed PMID: 15254720.

BLENKIRON, C. et al. MicroRNA expression profiling of human breast cancer identifies new markers of tumor subtype. **Genome Biol.** 2007; 8(10):R214. PubMed PMID: 17922911; PubMed Central PMCID: PMC2246288.

BLOWS, F. M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* 2010 May 25; 7(5):e1000279. doi: 10.1371/journal.pmed.1000279. PubMed PMID: 20520800; PubMed Central PMCID: PMC2876119.

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.* 2002 Jun; 82(6):737-46. PubMed PMID: 12065684.

BORG, A. et al. HER-2/neu amplification predicts poor survival in node-positive breast cancer. **Cancer Res.** 1990 Jul 15; 50(14):4332-7. PubMed PMID: 1973070

BOSE, S.; MOHAMMED, M.; SHINTAKU, P.; RAO, P. N. Her-2/neu gene amplification in low to moderately expressing breast cancers: possible role of chromosome 17/Her-2/neu polysomy. **Breast J.** 2001 Sep-Oct; 7(5):337-44. PubMed PMID: 11906444.

BURSTEIN, H. J. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. **N Engl J Med.** 2005 Oct 20; 353(16):1652-4. PubMed PMID: 16236735.

CAKIR, A.; GONUL, I. I.; ULUOGLU, O. A comprehensive morphological study for basal-like breast carcinomas with comparison to nonbasal-like carcinomas. **Diagn Pathol.** 2012 Oct 20; 7:145. doi: 10.1186/1746-1596-7-145. PubMed PMID: 23082819; PubMed Central PMCID: PMC3488514.

CALDARELLA, A. et al. Female breast cancer status according to ER, PR and HER2 expression: a population based analysis. *Pathol Oncol Res.* 2011 Sep; 17(3):753-8. doi: 10.1007/s12253-011-9381-z. Epub 2011 Apr 10. PubMed PMID: 21479875.

CALLAGY, G. et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol.* 2003 Mar;12(1):27-34. PubMed PMID: 12605033

CALZA, S. et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. **Breast Cancer Res.** 2006; 8(4):R34. PubMed PMID: 16846532; PubMed Central PMCID: PMC1779468.

CANCELLO, G. et al. Prognosis in women with small (T1mic,T1a,T1b) node-negative operable breast cancer by immunohistochemically selected subtypes. *Breast Cancer Res Treat.* 2011 Jun; 127(3):713-20. doi: 10.1007/s10549-011-1465-7. Epub 2011 Mar 31. PubMed PMID: 21452022.

CAREY, L. A. Directed therapy of subtypes of triple-negative breast cancer. **Oncologist.** 2010;15 Suppl 5:49-56. doi: 10.1634/theoncologist.2010-S5-49. PubMed PMID: 21138955

CAREY, L. A. et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA.** 2006 Jun 7; 295(21):2492-502. PubMed PMID: 16757721.

CARLOMAGNO, C. et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. **J Clin Oncol.** 1996 Oct; 14(10):2702-8. PubMed PMID: 8874330

CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D. E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer.** 1989 Jan 1; 63(1):181-7. PubMed PMID: 2910416.

CHAGAS, C.R. **Tratado de Mastologia da SBM.** 1 ed. Brasil: Revinter, 2011. Volume 1. 741p.

CHANG, H. Y. et al. Gene expression signature of fibroblast serum response predicts human cancer progression: similarities between tumors and wounds. **PLoS Biol.** 2004 Feb; 2(2):E7. Epub 2004 Jan 13. PubMed PMID: 14737219; PubMed Central PMCID: PMC314300.

CHEANG, M. C. et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. **Clin Cancer Res.** 2008 Mar 1; 14(5):1368-76. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-1658. PubMed PMID: 18316557.

CHEANG, M. C. et al. Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. **J Clin Oncol.** 2006 Dec 20; 24(36):5637-44. Epub 2006 Nov 20. PubMed PMID: 17116944.

CHEANG, M. C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** 2009 May 20; 101(10):736-50. doi: 10.1093/jnci/djp082. Epub 2009 May 12. PubMed PMID: 19436038; PubMed Central PMCID: PMC2684553.

CHIN, S. F. et al. High-resolution aCGH and expression profiling identifies a novel genomic subtype of ER negative breast cancer. **Genome Biol.** 2007; 8(10):R215. PubMed PMID: 17925008; PubMed Central PMCID: PMC2246289.

CHO, E. Y. et al. Comparison of Her-2, EGFR and cyclin D1 in primary breast cancer and paired metastatic lymph nodes: an immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization study. **J Korean Med Sci.** 2008 Dec; 23(6):1053-61. doi: 10.3346/jkms.2008.23.6.1053. Epub 2008 Dec 24. PubMed PMID: 19119452; PubMed Central PMCID: PMC2610643.

CHOI, Y. et al. The hormone receptor, human epidermal growth factor receptor 2, and molecular subtype status of individual tumor foci in multifocal/multicentric invasive ductal carcinoma of breast. **Hum Pathol**. 2012 Jan;43(1):48-55. doi: 10.1016/j.humpath.2010.08.026. Epub 2011 Jul 5. PubMed PMID: 21733550.

CHOI, Y. et al. Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: better prediction model for survival. **BMC Cancer**. 2010 Sep 23;10:507. doi: 10.1186/1471-2407-10-507. Erratum in: BMC Cancer. 2011;11:13. PubMed PMID: 20860845; PubMed Central PMCID: PMC2957395.

CHRYSOGELOS, S. A.; YARDEN, R. I.; LAUBER, A. H. Murphy JM. Mechanisms of EGF receptor regulation in breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat**. 1994B;31(2-3):227-36. PubMed PMID: 7881101

CHRYSOGELOS, S.A.; DICKSON, R. B. EGF receptor expression, regulation, and function in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**. 1994A Jan;29(1):29-40. Review. PubMed PMID: 8018962

CINTRA, J. R. et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. **Rev Assoc Med Bras**. 2012 Apr;58(2):178-87. English, Portuguese. PubMed PMID: 22569612.

CLARK, G. M. et al. Mitosin (a new proliferation marker) correlates with clinical outcome in node-negative breast cancer. *Cancer Res*. 1997 Dec 15;57(24):5505-8. PubMed PMID: 9407959.

CLARK, G.M., OSBORNE, C.K., MCGUIRE, W.L. Correlations between estrogen receptor, progesterone receptor, and patient characteristics in human breast cancer. **J Clin Oncol**. n.2, v.10, p. 1102-9. Oct. 1984.

CLARK, S. E. et al. Molecular subtyping of DCIS: heterogeneity of breast cancer reflected in pre-invasive disease. *Br J Cancer*. 2011 Jan 4;104(1):120-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6606021. Epub 2010 Dec 7. PubMed PMID: 21139586; PubMed Central PMCID: PMC3039794

CLARKE, R. B.; HOWELL, A.; POTTEN, C. S.; ANDERSON, E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. **Cancer Res**. 1997 Nov 15;57(22):4987-91. PubMed PMID: 9371488.

CLEATOR, S.; HELLER, W.; COOMBES, R. C. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. **Lancet Oncol.** 2007 Mar;8(3):235-44. Review. PubMed PMID: 17329194.

CONNOLLY, J. L. Changes and problematic areas in interpretation of the AJCC Cancer Staging Manual, 6th Edition, for breast cancer. **Arch Pathol Lab Med.** 2006 Mar;130(3):287-91. PubMed PMID: 16519555.

COOK, D. L.; WEAVER, D. L. Comparison of DNA content, S-phase fraction, and survival between medullary and ductal carcinoma of the breast. **Am J Clin Pathol.** 1995 Jul;104(1):17-22. PubMed PMID: 7611175.

CORRÊA, P.B. et al. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. **Revista Ciências Médicas e Biológicas** v. 9, p. 3-7, 2010

CREIGHTON, C. J.; CHANG, J. C.; ROSEN, J. M. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. **J Mammary Gland Biol Neoplasia.** 2010 Jun;15(2):253-60. doi: 10.1007/s10911-010-9173-1. Epub 2010 Mar 31. Review. PubMed PMID: 20354771.

CUTLER, S. J. et al. Further observations on prognostic factors in cancer of the female breast. **Cancer.** 1969 Oct;24(4):653-67. PubMed PMID: 4309690

DABBS, D. J. **Breast Pathology.** 1 ed. New York: Elsevier Saunders, 2012. 800 p.
DABBS, D. J.; CHIVUKULA, M.; CARTER, G.; BHARGAVA, R. Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. **Mod Pathol.** 2006 Nov;19(11):1506-11. Epub 2006 Aug 25. PubMed PMID: 16941011.

DALTON, L. W. et al. Histologic grading of breast cancer: linkage of patient outcome with level of pathologist agreement. **Mod Pathol.** 2000 Jul;13(7):730-5. PubMed PMID: 10912931.

DAVE, B.; MITTAL, V.; TAN, N. M.; CHANG, J. C. Epithelial-mesenchymal transition, cancer stem cells and treatment resistance. **Breast Cancer Res.** 2012 Jan 19;14(1):202. PubMed PMID: 22264257; PubMed Central PMCID: PMC3496111.

DAWOOD, S. et al. Defining breast cancer prognosis based on molecular phenotypes: results from a large cohort study. **Breast Cancer Res Treat.** 2011 Feb;126(1):185-92. doi: 10.1007/s10549-010-1113-7. Epub 2010 Aug 14. PubMed PMID: 20711652; PubMed Central PMCID: PMC3026074.

DE BROT, M. et al. [Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome]. **Rev Assoc Med Bras**. 2009 Sep-Oct;55(5):529-34. Portuguese. PubMed PMID: 19918651

DE POTTER, C. R. et al. The expression of the neu oncogene product in breast lesions and in normal fetal and adult human tissues. **Histopathology**. 1989 Oct;15(4):351-62.

DEFAZIO, A. et al. Expression of c-erbB receptors, heregulin and oestrogen receptor in human breast cell lines. **Int J Cancer**. 2000 Aug 15;87(4):487-98. PubMed PMID: 10918187.

DEL CASAR, J. M. et al. Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis. **Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol**. 2008 Dec;141(2):147-52. doi: 10.1016/j.ejogrb.2008.07.021. Epub 2008 Sep 2. PubMed PMID: 18768247

DENG, G. et al. Loss of heterozygosity in normal tissue adjacent to breast carcinomas. **Science**. 1996 Dec 20;274(5295):2057-9. PubMed PMID: 8953032.

DENT, R. et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res**. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34. PubMed PMID: 17671126.

DERVAN, P. A.; MAGEE, H.M.; BUCKLEY, C.; CARNEY, D. N. Proliferating cell nuclear antigen counts in formalin-fixed paraffin-embedded tissue correlate with Ki-67 in fresh tissue. **Am J Clin Pathol**. 1992 May;97(5 Suppl 1):S21-8. PubMed PMID: 1349455

DESMEDT, C. et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. **Clin Cancer Res**. 2008 Aug 15;14(16):5158-65. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-07-4756. PubMed PMID: 18698033.

DIAZ, L. K.; SNEIGE, N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to increasing testing accuracy. **Adv Anat Pathol**. 2005 Jan;12(1):10-9. Review. PubMed PMID: 15614160.

DICK, J. E. Breast cancer stem cells revealed. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Apr 1;100(7):3547-9. Epub 2003 Mar 25. PubMed PMID: 12657737; PubMed Central PMCID: PMC152954.

DICK, J. E. Normal and leukemic human stem cells assayed in SCID mice. **SEMIN IMMUNOL.** 1996 Aug;8(4):197-206. Review. PubMed PMID: 8883142.

DICKSON, R. B.; LIPPMAN, M. E. Growth factors in breast cancer. **Endocr Rev.** 1995 Oct;16(5):559-89. Review. PubMed PMID: 8529572.

DIERMEIER, S. et al. Epidermal growth factor receptor coexpression modulates susceptibility to Herceptin in HER2/neu overexpressing breast cancer cells via specific erbB-receptor interaction and activation. **Exp Cell Res.** 2005 Apr 1;304(2):604-19. Epub 2005 Jan 21. PubMed PMID: 15748904.

DONTU, G. Breast cancer stem cell markers - the rocky road to clinical applications. **Breast Cancer Res.** 2008;10(5):110. doi: 10.1186/bcr2130. Epub 2008 Sep 15. PubMed PMID: 18828879; PubMed Central PMCID: PMC2614502.

DUNNWARD, L. K.; ROSSING, M. A.; LI, C. I. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Res.** 2007;9(1):R6. PubMed PMID: 17239243; PubMed Central PMCID: PMC1851385.

DYKINS, R. et al. Long-term survival in breast cancer related to overexpression of the c-erbB-2 oncoprotein: an immunohistochemical study using monoclonal antibody NCL-CB11. **J Pathol.** 1991 Feb;163(2):105-10. PubMed PMID: 1673154

EIFEL, P. et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. **J Natl Cancer Inst.** 2001 Jul 4;93(13):979-89. Review. PubMed PMID: 11438563.

ELLEGE, R. M. et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. **Clin Cancer Res.** 1998 Jan;4(1):7-12. PubMed PMID: 9516946.

ELSTON, C.W., ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology.** n.19, v.5, p. 403-10. Nov. 1991.

FADARE, O.; WANG, S. A.; HILEETO, D. The expression of cytokeratin 5/6 in invasive lobular carcinoma of the breast: evidence of a basal-like subset? **Hum**

Pathol. 2008 Mar;39(3):331-6. doi: 10.1016/j.humpath.2007.07.014. PubMed PMID: 18261623.

FAN, C et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **N Engl J Med.** 2006 Aug 10;355(6):560-9. PubMed PMID: 16899776.

FISHER, B. et al. DNA flow cytometric analysis of primary operable breast cancer. Relation of ploidy and S-phase fraction to outcome of patients in NSABP B-04. **Cancer.** 1991 Oct 1;68(7):1465-75. PubMed PMID: 1893345.

FISHER, B. et al. Solving the dilemma of the immunohistochemical and other methods used for scoring estrogen receptor and progesterone receptor in patients with invasive breast carcinoma. **Cancer.** 2005 Jan 1;103(1):164-73. PubMed PMID: 15565575.

FITZGIBBONS, P. L. et al. Epidermal growth factor binding by breast tumor biopsies and relationship to estrogen receptor and progesterone receptor levels. **Cancer Res.** 1984 Aug;44(8):3448-53. PubMed PMID: 6331648.

FITZGIBBONS, P. L. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med.** 2000 Jul;124(7):966-78. Review. PubMed PMID: 10888772.

FOEKENS, J. A. et al. Prognostic value of receptors for insulin-like growth factor 1, somatostatin, and epidermal growth factor in human breast cancer. **Cancer Res.** 1989 Dec 15;49(24 Pt 1):7002-9. PubMed PMID: 2555057.

FOULKES, W. D. et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **J Natl Cancer Inst.** 2003 Oct 1;95(19):1482-5. PubMed PMID: 14519755.

FRIERSON JR. H. F. Grade and flow cytometric analysis of ploidy for infiltrating ductal carcinomas. **Hum Pathol.** 1993 Jan;24(1):24-9. PubMed PMID: 8380276.

FULFORD, L. G. et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. **Breast Cancer Res.** 2007;9(1):R4. PubMed PMID: 17217540; PubMed Central PMCID: PMC1851397.

FULFORD, L. G. et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. **Histopathology**. 2006 Jul;49(1):22-34. PubMed PMID: 16842243.

GAEDCKE, J. et al. Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. **Mod Pathol**. 2007 Aug;20(8):864-70. Epub 2007 Jun 1. PubMed PMID: 17541441.

GASPARINI, G. et al. Value of epidermal growth factor receptor status compared with growth fraction and other factors for prognosis in early breast cancer. **Br J Cancer**. 1992 Nov;66(5):970-6. PubMed PMID: 1419645; PubMed Central PMCID: PMC1978004.

GEYER, C. E. et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Dec 28;355(26):2733-43. Erratum in: **N Engl J Med**. 2007 Apr 5;356(14):1487. PubMed PMID: 17192538

GEYER, C. et al. Molecular classification of estrogen receptor-positive/luminal breast cancers. **Adv Anat Pathol**. 2012 Jan;19(1):39-53. doi: 10.1097/PAP.0b013e31823fafa0. Review. PubMed PMID: 22156833.

GINESTIER, C. et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell Stem Cell**. 2007 Nov;1(5):555-67. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014. PubMed PMID: 18371393; PubMed Central PMCID: PMC2423808.

GOBBI, H.; ROCHA, R.; NUNES, C.. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, Rio de Janeiro, v. 44, n. 2, Apr. 2008.

GOLDHIRSCH, A. et al. Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011 Aug;22(8):1736-47. doi: 10.1093/annonc/mdr304. Epub 2011 Jun 27. PubMed PMID: 21709140; PubMed Central PMCID: PMC3144634.

GOWN, A. M. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. **Mod Pathol**. 2008 May;21 Suppl 2:S8-S15. doi: 10.1038/modpathol.2008.34. Review. PubMed PMID: 18437174.

GUIU, S. et al. Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPAKT 2012 Working Group Statement. **Ann Oncol**. 2012 Dec;23(12):2997-3006. doi: 10.1093/annonc/mds586. PubMed PMID: 23166150.

GUKAS, I. D. et al. Clinicopathological features and molecular markers of breast cancer in Jos, Nigeria. **West Afr J Med**. 2005 Jul-Sep;24(3):209-13. PubMed PMID: 16276696.

GULLICK, W. J. et al. c-erbB-2 protein overexpression in breast cancer is a risk factor in patients with involved and uninvolved lymph nodes. **Br J Cancer**. 1991 Mar;63(3):434-8. PubMed PMID: 1672253; PubMed Central PMCID: PMC1971853

GUPTA, S. K. et al. The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). **Cancer**. 1997 Nov 1;80(9):1740-5. PubMed PMID: 9351542.

GUSTERSON, B. A. et al. Prognostic importance of c-erbB-2 expression in breast cancer. International (Ludwig) Breast Cancer Study Group. **J Clin Oncol**. 1992 Jul;10(7):1049-56. PubMed PMID: 1351538.

GUSTERSON, B. A.; ROSS, D.T.; HEATH, V.J.; STEIN, T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. **Breast Cancer Res**. 2005;7(4):143-8. Epub 2005 May 5. Review. PubMed PMID: 15987465; PubMed Central PMCID: PMC1175069

HAMMOND, M. E. et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Arch Pathol Lab Med**. 2010 Jul;134(7):e48-72. doi: 10.1043/1543-2165-134.7.e48. Review. PubMed PMID: 20586616.

HARARI, D.; YARDEN, Y. Molecular mechanisms underlying ErbB2/HER2 action in breast cancer. **Oncogene**. 2000 Dec 11;19(53):6102-14. Review. PubMed PMID: 11156523.

HARRIS, A. L. Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. **J Steroid Biochem**. 1989;34(1-6):123-31. PubMed PMID: 2576295.

HARVEY, J. M.; CLARK, G. M.; OSBORNE, C. K.; ALLRED, D. C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **J Clin Oncol**. 1999 May;17(5):1474-81. PubMed PMID: 10334533.

HENRY, N. L.; HAYES, D. F. Uses and abuses of tumor markers in the diagnosis, monitoring, and treatment of primary and metastatic breast cancer. **Oncologist**. 2006 Jun;11(6):541-52. Review. PubMed PMID: 16794234.

HERSCHKOWITZ, J. I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol**. 2007;8(5):R76. PubMed PMID: 17493263; PubMed Central PMCID: PMC1929138.

HOCH, R. V.; THOMPSON, D. A.; BAKER, R. J.; WEIGEL, R. J. GATA-3 is expressed in association with estrogen receptor in breast cancer. **Int J Cancer**. 1999 Apr 20;84(2):122-8. PubMed PMID: 10096242.

HOFFER, T. R.; MYLES, J. L. Procop GW. HER2/neu amplification in breast cancer: stratification by tumor type and grade. **Am J Clin Pathol**. 2002 Jun;117(6):916-21. PubMed PMID: 12047143.

HONETH, G. et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. **Breast Cancer Res**. 2008;10(3):R53. doi: 10.1186/bcr2108. Epub 2008 Jun 17. PubMed PMID: 18559090; PubMed Central PMCID: PMC2481503.

HOSEY, A. M. et al. Molecular basis for estrogen receptor alpha deficiency in BRCA1-linked breast cancer. **J Natl Cancer Inst**. 2007 Nov 21;99(22):1683-94. Epub 2007 Nov 13. PubMed PMID: 18000219.

HSIAO, Y. H. Breast cancer heterogeneity: mechanisms, proofs, and implications. **J Cancer**. 2010 Jun 1;1:6-13. PubMed PMID: 20842218; PubMed Central PMCID: PMC2931354.

HUANG, E. et al. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. **Lancet**. 2003 May 10;361(9369):1590-6. PubMed PMID: 12747878.

IKPATT, O. F. et al. Breast cancer in Nigeria and Finland: epidemiological, clinical and histological comparison. **Anticancer Res**. 2002 Sep-Oct;22(5):3005-12. PubMed PMID: 12530033

IRIGOYEN, M. A. et al. Molecular subtypes of breast cancer: prognostic implications and clinical and immunohistochemical characteristics. **An Sist Sanit Navar.** 2011 May-Aug;34(2):219-33. Spanish. PubMed PMID: 21904404.

IRVIN JR., W. J.; CAREY, L. A. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer.** 2008 Dec;44(18):2799-805. doi: 10.1016/j.ejca.2008.09.034. Epub 2008 Nov 12. Review. PubMed PMID: 19008097.

IWASE, H. et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. **Breast Cancer.** 2010 Apr;17(2):118-24. doi: 10.1007/s12282-009-0113-0. Epub 2009 May 23. PubMed PMID: 19466512.

JACQUEMIER, J. et al. European Working Group for Breast Screening Pathology; Breast Cancer Linkage Consortium. Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. **J Pathol.** 2005 Nov;207(3):260-8. PubMed PMID: 16167361.

JANNINK, I.; VAN DIEST, P. J.; BAAK, J. P. Comparison of the prognostic value of four methods to assess mitotic activity in 186 invasive breast cancer patients: classical and random mitotic activity assessments with correction for volume percentage of epithelium. **Hum Pathol.** 1995 Oct;26(10):1086-92. PubMed PMID: 7557941

JANSEN, M. P. et al. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. **J Clin Oncol.** 2005 Feb 1;23(4):732-40. PubMed PMID: 15681518.

JANSEN, M. P. et al. Molecular classification of tamoxifen-resistant breast carcinomas by gene expression profiling. **J Clin Oncol.** 2005 Feb 1;23(4):732-40. PubMed PMID: 15681518.

JONES, C. et al. Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. **Clin Cancer Res.** 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):5988-97. PubMed PMID: 15447982

KALLURI, R., NEILSON, E. G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. **J CLIN INVEST.** 2003 Dec;112(12):1776-84. Review. PubMed PMID: 14679171; PubMed Central PMCID: PMC297008.

KAUFMANN, M.; PUSZTAI, L. Biedenkopf Expert Panel Members. Use of standard markers and incorporation of molecular markers into breast cancer therapy: Consensus recommendations from an International Expert Panel. **Cancer**. 2011 Apr 15;117(8):1575-82. doi: 10.1002/cncr.25660. Epub 2010 Nov 29. Review. PubMed PMID: 21472705.

KESHGEGIAN, A. A. CNAAN, A. erbB-2 oncoprotein expression in breast carcinoma. Poor prognosis associated with high degree of cytoplasmic positivity using CB-11 antibody. **Am J Clin Pathol**. 1997 Oct;108(4):456-63. PubMed PMID: 9322600.

KIM, M. J. et al. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. **Hum Pathol**. 2006 Sep;37(9):1217-26. Epub 2006 Jul 18. PubMed PMID: 16938528

KINNE, D.W. *et al*. Estrogen receptor protein in breast cancer as a predictor of recurrence. **Cancer**. n.47, v.10, p. 2364-7. May. 1981.

KLIJN, J. G.; BERNS, P. M. SCHMITZ, P. I. Foekens JA. The clinical significance of epidermal growth factor receptor (EGF-R) in human breast cancer: a review on 5232 patients. **Endocr Rev**. 1992 Feb;13(1):3-17. Review. PubMed PMID: 1313356.

KLINTENBERG, C. et al. Proliferative index, cytosol estrogen receptor and axillary node status as prognostic predictors in human mammary carcinoma. **Breast Cancer Res Treat**. 1986;7 Suppl:S99-106. PubMed PMID: 3742067.

KOENDERS, P. G. et al. Epidermal growth factor receptor-negative tumors are predominantly confined to the subgroup of estradiol receptor-positive human primary breast cancers. **Cancer Res**. 1991 Sep 1;51(17):4544-8. PubMed PMID: 1873798

KONECNY, G. et al. Quantitative association between HER-2/neu and steroid hormone receptors in hormone receptor-positive primary breast cancer. **J Natl Cancer Inst**. 2003 Jan 15;95(2):142-53. PubMed PMID: 12529347.

KONONEN J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**. 1998 Jul;4(7):844-7. PubMed PMID: 9662379.

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**. 2002 Nov;82(11):1525-33. PubMed PMID: 12429812.

KOSCIELNY, S. et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. **Br J Cancer**. 1984 Jun;49(6):709-15. PubMed PMID: 6733019; PubMed Central PMCID: PMC1976833.

KOSCIELNY, S. et al. Impact of tumour size on axillary involvement and distant dissemination in breast cancer. **Br J Cancer**. 2009 Sep 15;101(6):902-7. doi: 10.1038/sj.bjc.6605221. Epub 2009 Aug 18. PubMed PMID: 19690546; PubMed Central PMCID: PMC2743352.

KREIKE, B. et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Res**. 2007;9(5):R65. PubMed PMID: 17910759; PubMed Central PMCID: PMC2242660

KRISHNAMURTHY, S. SNEIGE, N. Molecular and biologic markers of premalignant lesions of human breast. **Adv Anat Pathol**. 2002 May;9(3):185-97. Review. PubMed PMID: 11981114.

KUSIŃSKA, R.; POTEMSKI, P.; JESIONEK-KUPNICKA, D.; KORDEK, R. Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma--relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2. **Pol J Pathol**. 2005;56(3):107-10. PubMed PMID: 16334976.

KUUKASJARVI, T, et al. Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. **J Clin Oncol**. n.2, v.15, p. 862: Feb.1997.

LAAKSO, M. et al. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4185-91. PubMed PMID: 16857790.

LAAKSO, M.; LOMAN, N.; BORG, A.; ISOLA, J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. **Mod Pathol**. 2005 Oct;18(10):1321-8. PubMed PMID: 15990899.

LAKHANI, S. R. et al. Cancer Linkage Consortium. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. **Clin Cancer Res**. 2005 Jul 15;11(14):5175-80. PubMed PMID: 16033833.

LAKHANI, S. R. et al. Genetic alterations in 'normal' luminal and myoepithelial cells of the breast. **J Pathol**. 1999 Dec;189(4):496-503. PubMed PMID: 10629549.

LAKHANI, S. R.; ASHWORTH, A. Microarray and histopathological analysis of tumours: the future and the past? **Nat Rev Cancer**. 2001 Nov;1(2):151-7. Review. PubMed PMID: 11905806.

LAL,P.; TAN, L.K.; CHEN, B. Correlation of HER-2 status with estrogen and progesterone receptors and histologic features in 3,655 invasive breast carcinomas. **Am J Clin Pathol**. 2005 Apr;123(4):541-6. PubMed PMID: 15743737.

LARSON, P. S. et al. Loss of heterozygosity or allele imbalance in histologically normal breast epithelium is distinct from loss of heterozygosity or allele imbalance in co-existing carcinomas. *Am J Pathol*. 2002 Jul;161(1):283-90. PubMed PMID: 12107113; PubMed Central PMCID: PMC1850696.

LAVASANI, M. A.; MOINFAR, F. Molecular classification of breast carcinomas with particular emphasis on "basal-like" carcinoma: a critical review. **J Biophotonics**. 2012 Apr;5(4):345-66. doi: 10.1002/jbio.201100097. Epub 2012 Jan 9. Review. PubMed PMID: 22232077.

LEHMANN, B. D. et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest**. 2011 Jul;121(7):2750-67. doi: 10.1172/JCI45014. PubMed PMID: 21633166; PubMed Central PMCID: PMC3127435

LEIBL, S.; MOINFAR, F. Metaplastic breast carcinomas are negative for Her-2 but frequently express EGFR (Her-1): potential relevance to adjuvant treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors? **J Clin Pathol**. 2005 Jul;58(7):700-4. PubMed PMID: 15976335; PubMed Central PMCID: PMC1770725.

LEONG, A. S.; LEONG, T. Y. Standardization in immunohistology. **Methods Mol Biol**. 2011;724:37-68. doi: 10.1007/978-1-61779-055-3_3. PubMed PMID: 21370005.

LERMA, E. et al. Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas). **Mod Pathol**. 2007 Nov;20(11):1200-7. Epub 2007 Sep 21. PubMed PMID: 17885672

LIU, R. et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. **N Engl J Med**. 2007 Jan 18;356(3):217-26. PubMed PMID: 17229949.

LIU, S.; DONTU, G. WICHA, M. S. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. **Breast Cancer Res.** 2005;7(3):86-95. Epub 2005 Mar 30. Review. PubMed PMID: 15987436; PubMed Central PMCID: PMC1143566

LIVASY, C. A. et al. Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol.* 2007 Feb;38(2):197-204. PubMed PMID: 17234468.

LIVASY, C. A. et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol.** 2006 Feb;19(2):264-71. PubMed PMID: 16341146.

LU, S. et al. Claudin expression in high-grade invasive ductal carcinoma of the breast: correlation with the molecular subtype. **Mod Pathol.** 2013 Apr;26(4):485-95. doi: 10.1038/modpathol.2012.187. Epub 2012 Dec 7. PubMed PMID: 23222490.

MACKAY, A. et al. Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement. **J Natl Cancer Inst.** 2011 Apr 20;103(8):662-73. doi: 10.1093/jnci/djr071. Epub 2011 Mar 18. PubMed PMID: 21421860; PubMed Central PMCID: PMC3079850.

MALZAHN, K. et al. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. **Virchows Arch.** 1998 Aug;433(2):119-29. PubMed PMID: 9737789.

MARCATO, P. et al. Aldehyde dehydrogenase activity of breast cancer stem cells is primarily due to isoform ALDH1A3 and its expression is predictive of metastasis. **Stem Cells.** 2011 Jan;29(1):32-45. doi: 10.1002/stem.563. PubMed PMID: 21280157

MARTIN, K. J. et al. Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer. **Cancer Res.** 2000 Apr 15;60(8):2232-8. PubMed PMID: 10786689.

MASSION, P. P. et al. Significance of p63 amplification and overexpression in lung cancer development and prognosis. **Cancer Res.** 2003 Nov 1;63(21):7113-21. PubMed PMID: 14612504

MATOS, I.; DUFLOTH, R.; Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. **Virchows Arch.** 2005 Oct;447(4):688-94. Epub 2005 Oct 19. PubMed PMID: 16012853.

MENKE, C.H. **Rotinas em Mastologia.** 2 ed. Brasil: Artmed, 2007.270p.

MILANEZI, F.; CARVALHO, S.; SCHMITT, F. C. EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy. **Expert Rev Mol Diagn.** 2008 Jul;8(4):417-34. doi: 10.1586/14737159.8.4.417. Review. PubMed PMID: 18598224.

MILLIKAN, R. C. et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(1):123-39. Epub 2007 Jun 20. Erratum in: **Breast Cancer Res Treat.** 2008 May;109(1):141. Dressler, Lynn G [added]. PubMed PMID: 17578664; PubMed Central PMCID: PMC2443103.

MILLS, S.E. **Histology for Pathologists.** 3 ed. New York: Lippincott Williams's e Wilkins, 2007. 1272 p.

MOINFAR, F. Is 'basal-like' carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. **Pathobiology.** 2008;75(2):119-31. doi: 10.1159/000123850. Epub 2008 Jun 10. Review. PubMed PMID: 185449

MONTAGNA, E. et al. Breast cancer subtypes and outcome after local and regional relapse. **Ann Oncol.** 2012 Feb;23(2):324-31. doi: 10.1093/annonc/mdr129. Epub 2011 Apr 27. PubMed PMID: 21525402.

MORAN, R. E. et al. Correlation of cell-cycle kinetics, hormone receptors, histopathology, and nodal status in human breast cancer. **Cancer.** 1984 Oct 15;54(8):1586-90. PubMed PMID: 6478400.

MORIYA, T. et al. Molecular morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. **Med Mol Morphol.** 2010 Jun;43(2):67-73. doi: 10.1007/s00795-010-0504-5. Epub 2010 Aug 4. Review. PubMed PMID: 20683691.

MORIYA, T. et al. The role of immunohistochemistry in the differential diagnosis of breast lesions. **Pathology.** 2009 Jan;41(1):68-76. doi: 10.1080/00313020802563544. PubMed PMID: 19089742

MORRIS, G. J. et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. **Cancer.** 2007 Aug 15;110(4):876-84. PubMed PMID: 17620276.

MOTOYAMA, A. B.; HYNES, N. E.; LANE, H. A. The efficacy of ErbB receptor-targeted anticancer therapeutics is influenced by the availability of epidermal growth

factor-related peptides. **Cancer Res.** 2002 Jun 1;62(11):3151-8. PubMed PMID: 12036928.

MUNJAL, K. et al. Immunohistochemical analysis of ER, PR, Her2 and CK5/6 in infiltrative breast carcinomas in Indian patients. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2009;10(5):773-8. PubMed PMID: 20104967

NADJI, M. Quantitative immunohistochemistry of estrogen receptor in breast cancer: "much ado about nothing!". **Appl Immunohistochem Mol Morphol.** 2008 Mar;16(2):105-7. doi: 10.1097/PAI.0b013e3181607323. Review. PubMed PMID: 18227735.

NADJI, M.; GOMEZ-FERNANDEZ, C.; GANJEI-AZAR, P. MORALES, A. R. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. **Am J Clin Pathol.** 2005 Jan;123(1):21-7. PubMed PMID: 15762276.

NAKAJIMA, H. et al. Prognosis of Japanese breast cancer based on hormone receptor and HER2 expression determined by immunohistochemical staining. **World J Surg.** 2008 Nov;32(11):2477-82. doi: 10.1007/s00268-008-9712-8. PubMed PMID: 18758851.

NEWBY, J. C. JOHNSTON, S. R. SMITH, I. E. Dowsett M. Expression of epidermal growth factor receptor and c-erbB2 during the development of tamoxifen resistance in human breast cancer. **Clin Cancer Res.** 1997 Sep;3(9):1643-51. PubMed PMID: 9815855.

NGUYEN, P. L. et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. **J Clin Oncol.** 2008 May 10;26(14):2373-8. doi: 10.1200/JCO.2007.14.4287. Epub 2008 Apr 14. Erratum in: *J Clin Oncol.* 2008 Jun;26(18):3110. PubMed PMID: 18413639.

NICHOLSON, S. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFr) status associated with failure of primary endocrine therapy in elderly postmenopausal patients with breast cancer. **Br J Cancer.** 1988 Dec;58(6):810-4. PubMed PMID: 3224082; PubMed Central PMCID: PMC2246869.

NICHOLSON, S. et al. Epidermal growth factor receptor (EGFr); results of a 6 year follow-up study in operable breast cancer with emphasis on the node negative subgroup. **Br J Cancer.** 1991 Jan;63(1):146-50. PubMed PMID: 1846551; PubMed Central PMCID: PMC1971641.

NIELSEN, T. O. et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. **Clin Cancer Res**. 2010 Nov 1;16(21):5222-32. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-1282. Epub 2010 Sep 13. PubMed PMID: 20837693; PubMed Central PMCID: PMC2970720.

NIELSEN, T. O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin Cancer Res**. 2004 Aug 15;10(16):5367-74. PubMed PMID: 15328174.

NOFECH-MOZES, S. et al. Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**. 2012 May;20(3):214-63. doi: 10.1097/PAI.0b013e318234aa12. Review. PubMed PMID: 22505008.

NOWAK, A. K. et al. Systematic review of taxane-containing versus non-taxane-containing regimens for adjuvant and neoadjuvant treatment of early breast cancer. **Lancet Oncol**. 2004 Jun;5(6):372-80. Review. PubMed PMID: 15172358.

O'HARE, M. J. et al. Characterization in vitro of luminal and myoepithelial cells isolated from the human mammary gland by cell sorting. **Differentiation**. 1991 Apr;46(3):209-21. PubMed PMID: 1833254.

OLOPADE, O. I.; GRUSHKO, T. Gene-expression profiles in hereditary breast cancer. **N Engl J Med**. 2001 Jun 28;344(26):2028-9. Erratum in: N Engl J Med 2001 Aug 23;345(8):628. PubMed PMID: 11430337.

OTTERBACH, F. et al. Cytokeratin 5/6 immunohistochemistry assists the differential diagnosis of atypical proliferations of the breast. **Histopathology**. 2000 Sep;37(3):232-40. PubMed PMID: 10971699.

PAGE, D. L. The epidemiology of tumor markers in breast cancer management: prognostic markers. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**. 1994 Mar;3(2):101-4. Review. PubMed PMID: 8049630.

PARADISO, A. et al. Heterogeneity of intratumour proliferative activity in primary breast cancer: biological and clinical aspects. **Eur J Cancer**. 1995 Jun;31A(6):911-6. PubMed PMID: 7646920.

PAREDES, J.; LOPES, N.; MILANEZI, F.; SCHMITT, F. C. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in

situ. **Virchows Arch.** 2007 Jan;450(1):73-80. Epub 2006 Nov 23. PubMed PMID: 17123107.

PARK, B. J. et al. Frequent alteration of p63 expression in human primary bladder carcinomas. **Cancer Res.** 2000 Jul 1;60(13):3370-4. PubMed PMID: 10910040.

PARK, Y. H. et al. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. **Ann Oncol.** 2011 Jul;22(7):1554-60. doi: 10.1093/annonc/mdq617. Epub 2011 Jan 17. PubMed PMID: 21242587.

PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol.** 2009 Mar 10;27(8):1160-7. doi: 10.1200/JCO.2008.18.1370. Epub 2009 Feb 9. PubMed PMID: 19204204;

PARSA, R.; YANG, A. MCKEON, F.; GREEN, H. Association of p63 with proliferative potential in normal and neoplastic human keratinocytes. **J Invest Dermatol.** 1999 Dec;113(6):1099-105. PubMed PMID: 10594758

PATERSON, M. C. et al. Correlation between c-erbB-2 amplification and risk of recurrent disease in node-negative breast cancer. **Cancer Res.** 1991 Jan 15;51(2):556-67. PubMed PMID: 1670762.

PAYNE, S. J.; BOWEN, R. L.; JONES, J. L. Wells CA. Predictive markers in breast cancer--the present. **Histopathology.** 2008 Jan;52(1):82-90. doi: 10.1111/j.1365-2559.2007.02897.x. Review. PubMed PMID: 18171419.

PÉCHOUX, C. et al. Human mammary luminal epithelial cells contain progenitors to myoepithelial cells. **Dev Biol.** 1999 Feb 1;206(1):88-99. PubMed PMID: 9918697

PEKONEN, F.; PARTANEN, S.; MÄKINEN, T.; RUTANEN, E. M. Receptors for epidermal growth factor and insulin-like growth factor I and their relation to steroid receptors in human breast cancer. **Cancer Res.** 1988 Mar 1;48(5):1343-7. PubMed PMID: 2963690.

PEREZ, E. A. et al. HER2 testing by local, central, and reference laboratories in specimens from the North Central Cancer Treatment Group N9831 intergroup adjuvant trial. **J Clin Oncol.** 2006 Jul 1;24(19):3032-8. PubMed PMID: 16809727.

PEREZ, E. A. et al. HER2 testing in patients with breast cancer: poor correlation between weak positivity by immunohistochemistry and gene amplification by

fluorescence in situ hybridization. *Mayo Clin Proc.* 2002 Feb;77(2):148-54. PubMed PMID: 11838648.

PEROU, C. M. et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Aug 3;96(16):9212-7.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602.

PEROU, C. M. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. ***Oncologist.*** 2010;15 Suppl 5:39-48. doi: 10.1634/theoncologist.2010-S5-39. PubMed PMID: 21138954

PIETRAS, R. J. et al. HER-2 tyrosine kinase pathway targets estrogen receptor and promotes hormone-independent growth in human breast cancer cells. ***Oncogene.*** 1995 Jun 15;10(12):2435-46. PubMed PMID: 7784095

PINDER, S. E. et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. ***Br J Cancer.*** 1995 Jan;71(1):146-9. PubMed PMID: 7819031; PubMed Central PMCID: PMC2033442.

PINTO, A. E. et al. C-erbB-2 oncoprotein overexpression identifies a subgroup of estrogen receptor positive (ER+) breast cancer patients with poor prognosis. *Ann Oncol.* 2001 Apr;12(4):525-33. PubMed PMID: 11398888.

POTEMSKI, P. et al. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. ***Oncology.*** 2005;69(6):478-85. Epub 2006 Jan 12. PubMed PMID: 16410686.

PRAT, A. et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. ***Breast Cancer Res.*** 2010;12(5):R68. doi: 10.1186/bcr2635. Epub 2010 Sep 2. PubMed PMID: 20813035; PubMed Central PMCID: PMC3096954.

PRESS, M. F.; HUNG, G.; GODOLPHIN, W.; SLAMON, D. J. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. ***Cancer Res.*** 1994 May 15;54(10):2771-7. PubMed PMID: 7909495.

PUSZTAI, L. et al. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. **Oncologist**. 2006 Sep;11(8):868-77. Review. PubMed PMID: 16951390.

PUTTI, T. C. et al. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. **Mod Pathol**. 2005 Jan;18(1):26-35. PubMed PMID: 15332092.

RABER, M. N. et al. Ploidy, proliferative activity and estrogen receptor content in human breast cancer. **Cytometry**. 1982 Jul;3(1):36-41. PubMed PMID: 7117052.

RAICA, M. et al. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change? **Rom J Morphol Embryol**. 2009;50(1):5-13. Review. PubMed PMID: 19221640.

RAKHA, E. A. et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. **J Clin Oncol**. 2007a Oct 20;25(30):4772-8. Epub 2007 Sep 17. PubMed PMID: 17876012

RAKHA, E. A. et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res**. 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607. Epub 2010 Jul 30. Review. PubMed PMID: 20804570; PubMed Central PMCID: PMC2949637

RAKHA, E. A. et al. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. **Histopathology**. 2007b Mar;50(4):434-8. PubMed PMID: 17448018.

RAKHA, E. A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol**. 2006 Mar;208(4):495-506.

RAKHA, E. A. et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2302-10. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-08-2132. Epub 2009 Mar 24. PubMed PMID: 19318481.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S. ELLIS, I. O. Impact of basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy. **Pathobiology**. 2008a;75(2):95-103. doi: 10.1159/000123847. Epub 2008 Jun 10. Review. PubMed PMID: 18544964.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2010 Apr;120(2):293-308. doi: 10.1007/s10549-010-0746-x. Epub 2010 Jan 28. Review. PubMed PMID: 20107892.

REIS-FILHO, J. S. et al. Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and cytokeratin 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. **Virchows Arch.** 2003 Aug;443(2):122-32. Epub 2003 Jul 16. PubMed PMID: 12884041

REIS-FILHO, J. S. et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. **Histopathology.** 2006 Jul;49(1):10-21. PubMed PMID: 16842242

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.** 2005;7(6):R1028-35. Epub 2005 Oct 25. PubMed PMID: 16280056; PubMed Central PMCID: PMC1410747.

REIS-FILHO, J. S. et al. Naked nuclei revisited: p63 Immunoexpression. **Diagn Cytopathol.** 2002 Sep;27(3):135-8. PubMed PMID: 12203858.

REIS-FILHO, J. S. PUSZTAI, L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet.** 2011 Nov 19;378(9805):1812-23. doi: 10.1016/S0140-6736(11)61539-0. Review. PubMed PMID: 22098854.

RESETKOVA, E. et al. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. **Breast Cancer Res Treat.** 2010 Aug;123(1):97-108. doi: 10.1007/s10549-009-0619-3. Epub 2009 Nov 13. PubMed PMID: 19911270.

RIBEIRO-SILVA, A.; ZAMBELLI RAMALHO, L. N.; BRITTO, G. S.; ZUCOLOTO, S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. **Arch Pathol Lab Med.** 2003 Mar;127(3):336-40. PubMed PMID: 12653579.

RILKE, F. et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in breast cancer and its relationship to other prognostic factors. **Int J Cancer.** 1991 Aug 19;49(1):44-9. PubMed PMID: 1678734.

RO, J. ET AL. Amplified and overexpressed epidermal growth factor receptor gene in uncultured primary human breast carcinoma. **Cancer Res.** 1988 Jan 1;48(1):161-4. PubMed PMID: 3334990.

ROCHE, P. C. et al. Concordance between local and central laboratory HER2 testing in the breast intergroup trial N9831. **J Natl Cancer Inst.** 2002 Jun 5;94(11):855-7. PubMed PMID: 12048274.

ROSEN, P.P. **Rosen's Breast Pathology**. 3 ed. New York: Lippincott Williams's e Wilkins, 2009. 1116 p.

ROUZIER, R. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res.** 2005 Aug 15;11(16):5678-85. PubMed PMID: 16115903

SAINSBURY, J. R. et al. Epidermal growth factor receptor status of histological subtypes of breast cancer. *Br J Cancer.* 1988 Oct;58(4):458-60. PubMed PMID: 3207600; PubMed Central PMCID: PMC2246782.

SAINSBURY, J. R. et al. Presence of epidermal growth factor receptor as an indicator of poor prognosis in patients with breast cancer. **J Clin Pathol.** 1985 Nov;38(11):1225-8. PubMed PMID: 2999195; PubMed Central PMCID: PMC499417.

SALLES, M. A. et al, Contribution of immunohistochemistry to the assessment of prognostic and predictive factors of breast cancer and to the diagnosis of mammary lesions. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** vol.45 no.3 Rio de Janeiro June 2009

SANNINO, P., SHOUSHA. S. Demonstration of oestrogen receptors in paraffin wax sections of breast carcinoma using the monoclonal antibody 1D5 and microwave oven processing. **J. Clin Pathol.** n.47, p. 90-92, 1994.

SASSEN, A. et al. Cytogenetic analysis of HER1/EGFR, HER2, HER3 and HER4 in 278 breast cancer patients. **Breast Cancer Res.** 2008;10(1):R2. doi: 10.1186/bcr1843. Epub 2008 Jan 8. PubMed PMID: 18182100; PubMed Central PMCID: PMC2374953.

SCHMITT, F. C.; ANDRADE, L. M.; DE LUCCA, L. A. Detection of estrogen receptor in formalin-fixed and paraffin-embedded breast carcinoma: correlation with histological patterns. **Rev Paul Med.** 1992 Jul-Aug;110(4):158-62. PubMed PMID: 1341005.

SCHMITT, F. C.; FIGUEIREDO, P.; LACERDA, M. Expression of c-erb B-2 protein and DNA ploidy in breast carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med.* 1995 Sep;119(9):815-20. PubMed PMID: 7668939.

SEAL, M. D.; CHIA, S. K. What is the difference between triple-negative and basal breast cancers? **Cancer J.** 2010 Jan-Feb;16(1):12-6. doi: 10.1097/PPO.0b013e3181cf04be. Review. PubMed PMID: 20164685.

SHAABAN, A. M. et al. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. **Am J Surg Pathol.** 2003 Dec;27(12):1502-12. PubMed PMID: 14657709.

SHAO, M. M. et al. Keratin expression in breast cancers. **Virchows Arch.** 2012 Sep;461(3):313-22. doi: 10.1007/s00428-012-1289-9. Epub 2012 Aug 1. PubMed PMID: 22851038.

SHIN, B. K. et al. Breast carcinomas expressing basal markers have poor clinical outcome regardless of estrogen receptor status. **Oncol Rep.** 2008 Mar;19(3):617-25. PubMed PMID: 18288392.

SINGLETARY, S. E. et al. Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **Surg Clin North Am.** 2003 Aug;83(4):803-19. Review. PubMed PMID: 12875597.

SJÖGREN, S. et al. Prognostic and predictive value of c-erbB-2 overexpression in primary breast cancer, alone and in combination with other prognostic markers. **J Clin Oncol.** 1998 Feb;16(2):462-9. PubMed PMID: 9469329

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science.** 1987 Jan 9;235(4785):177-82. PubMed PMID: 3798106.

SØRLIE, T. et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics.** 2006 May 26;7:127. PubMed PMID: 16729877; PubMed Central PMCID: PMC1489944

SØRLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2001 Sep 11;98(19):10869-74. PubMed PMID: 11553815; PubMed Central PMCID: PMC58566.

SØRLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Jul 8;100(14):8418-23.

Epub 2003 Jun 26. PubMed PMID: 12829800; PubMed Central PMCID: PMC166244.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Sep 2;100(18):10393-8. Epub 2003 Aug 13. PubMed PMID: 12917485; PubMed Central PMCID: PMC193572.

SOTIRIOU, C.; PUSZTAI, L. Gene-expression signatures in breast cancer. **N Engl J Med.** 2009 Feb 19;360(8):790-800. doi: 10.1056/NEJMra0801289. Review. PubMed PMID: 19228622.

SOUSA, B. et al. P-cadherin, vimentin and CK14 for identification of basal-like phenotype in breast carcinomas: an immunohistochemical study. **Histol Histopathol.** 2010 Aug;25(8):963-74. PubMed PMID: 20552547

SPENCER, K. S. et al. ErbB2 is necessary for induction of carcinoma cell invasion by ErbB family receptor tyrosine kinases. **J Cell Biol.** 2000 Jan 24;148(2):385-97. PubMed PMID: 10648571; PubMed Central PMCID: PMC2174273.

SPITALE, A. et al. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. **Ann Oncol.** 2009 Apr;20(4):628-35.

SPYRATOS, F. et al. Epidermal growth factor receptors and prognosis in primary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 1990 Dec;17(2):83-9. PubMed PMID: 2096996.

STEAD, L. A. et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. **Breast Cancer Res.** 2009;11(2):R18.

STERN, D. F. ErbBs in mammary development. **Exp Cell Res.** 2003 Mar 10;284(1):89-98. Review. PubMed PMID: 12648468.

STIERER, M. et al. A prospective analysis of immunohistochemically determined hormone receptors and nuclear features as predictors of early recurrence in primary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 1995;36(1):11-21. PubMed PMID: 7579502

SU, Y. et al. Distinct distribution and prognostic significance of molecular subtypes of breast cancer in Chinese women: a population-based cohort study. **BMC Cancer**. 2011 Jul 12;11:292.

TAN, P. H. et al. Cytokeratins in papillary lesions of the breast: is there a role in distinguishing intraductal papilloma from papillary ductal carcinoma in situ? **Am J Surg Pathol**. 2005 May;29(5):625-32. PubMed PMID: 15832086.

THIKE, A. A. et al. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. **Mod Pathol**. 2010 Jan;23(1):123-33. doi: 10.1038/modpathol.2009.145. Epub 2009 Oct 23. PubMed PMID: 19855377.

TISCHKOWITZ, M. et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. **BMC Cancer**. 2007 Jul 24;7:134. PubMed PMID: 17650314; PubMed Central PMCID: PMC1948892.

TOT, T. The cytokeratin profile of medullary carcinoma of the breast. **Histopathology**. 2000 Aug;37(2):175-81. PubMed PMID: 10931242.

TSUJIMOTO, M. et al. One-step nucleic acid amplification for intraoperative detection of lymph node metastasis in breast cancer patients. **Clin Cancer Res**. 2007 Aug 15;13(16):4807-16. PubMed PMID: 17699859

TSUTSUI, S. et al. Prognostic and predictive value of epidermal growth factor receptor in recurrent breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2002 Nov;8(11):3454-60. PubMed PMID: 12429634.

TSUTSUI, S. et al. Prognostic value of the combination of epidermal growth factor receptor and c-erbB-2 in breast cancer. **Surgery**. 2003 Feb;133(2):219-21. PubMed PMID: 12605184.

TURNER, N. C.; REIS-FILHO, J. S. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. **Oncogene**. 2006 Sep. 25;25(43):5846-53. Review. PubMed PMID: 16998499.

TURNER, N. et al. Targeting triple negative breast cancer: Is p53 the answer? **Cancer Treat Rev**. 2013 Jan 12.

UEHARA, J. et al. Effects of tamoxifen on the breast in the luteal phase of the menstrual cycle. **Int J Gynaecol Obstet.** 1998 Jul;62(1):77-82. PubMed PMID: 9722130.

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.* 2002 Dec;161(6):1991-6. Erratum in: **Am J Pathol.** 2003 Jul;163(1):377.

VAN DE VIJVER, M. J. et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N Engl J Med.** 2002 Dec 19;347(25):1999-2009. PubMed PMID: 12490681.

VAN DIERENDONCK, J. H.; KEIJZER, R.; VAN DE VELDE, C. J.; CORNELISSE, C. J. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: comparison with growth fraction in human breast cancer cells. **Cancer Res.** 1989 Jun 1;49(11):2999-3006. PubMed PMID: 2720660.

VAN DIEST, P. J. et al. Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. **Hum Pathol.** 1992 Jun;23(6):603-7. PubMed PMID: 1592381.

VAN 'T VEER, L. J. et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature.** 2002 Jan 31;415(6871):530-6. PubMed PMID: 11823860.

VIEIRA, D. S.; DUFLOTH, R. M. SCHMITT, F. C.; ZEFERINO, L. C. Breast cancer: new concepts in classification. **Rev Bras Ginecol Obstet.** 2008 Jan;30(1):42-7. Review. Portuguese. PubMed PMID: 19142542.

WANG, W. B. et al. Combination of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) and canstatin gene suppression therapy on breast tumor xenograft growth in mice. **Breast Cancer Res Treat.** 2008 Jul;110(2):283-95. Epub 2007 Sep 26. PubMed PMID: 17899369.

WANG, Y. et al. Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet.** 2005 Feb 19-25;365(9460):671-9. PubMed PMID: 15721472.

WEBSTER, L. R. et al. Poor-prognosis estrogen receptor-positive breast cancer identified by histopathologic subclassification. **Clin Cancer Res.** 2008 Oct 15;14(20):6625-33.

WEIGELT, B. et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **Lancet Oncol.** 2010 Apr;11(4):339-49.

WEIGELT, B. et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. **J Pathol.** 2008 Oct;216(2):141-50. doi: 10.1002/path.2407. PubMed PMID: 18720457.

WEIGELT, B.; GEYER, F. C. REIS-FILHO, J. S. Histological types of breast cancer: how special are they? **Mol Oncol.** 2010 Jun;4(3):192-208. PubMed PMID: 20452298.

WESTFALL, M. D.; PIETENPOL, J. A. p63: Molecular complexity in development and cancer. **Carcinogenesis.** 2004 Jun;25(6):857-64. Epub 2004 Mar 19. Review. PubMed PMID: 15033906.

WETZELS, R. H. et al. Basal cell-specific and hyper proliferation-related keratins in human breast cancer. **Am J Pathol.** 1991 Mar;138(3):751-63. PubMed PMID: 1705754; PubMed Central PMCID: PMC1886287.

WIECHMANN, L. et al. Presenting features of breast cancer differ by molecular subtype. **Ann Surg Oncol.** 2009 Oct;16(10):2705-10.

WOLFF, A. C. et al. Pathologist's guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Arch Pathol Lab Med.** 2007;131(1):18-43. PubMed PMID: 19548375.

YAMAUCHI, H.; STEARNS, V.; HAYES, D. F. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. **J Clin Oncol.** 2001 Apr 15;19(8):2334-56. Review. PubMed PMID: 11304787.

YANAGAWA, M. et al. Luminal A and luminal B (HER2 negative) subtypes of breast cancer consist of a mixture of tumors with different genotype. **BMC Res Notes.** 2012 Jul 25;5:376..

YANG A. p63 is essential for regenerative proliferation in limb, craniofacial and epithelial development. **Nature.** 1999 Apr 22;398(6729):714-8. PubMed PMID: 10227294

YANG, G. P. et al. Combining SSH and cDNA microarrays for rapid identification of differentially expressed genes. **Nucleic Acids Res.** 1999 Mar 15;27(6):1517-23. PubMed PMID: 10037815; PubMed Central PMCID: PMC148347.

YANG, X. R. et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. **J Natl Cancer Inst.** 2011 Feb 2;103(3):250-63. PubMed Central PMCID: PMC3107570

YANG, X. R. et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Mar;16(3):439-43. PubMed PMID: 17372238.

YARDEN, R. I.; WILSON, M. A.; CHRYSOGELOS, S. A. Estrogen suppression of EGFR expression in breast cancer cells: a possible mechanism to modulate growth. **J Cell Biochem Suppl.** 2001;Suppl 36:232-46. PubMed PMID: 11455588

YOSHIMOTO, M.; SAKAMOTO, G.; OHASHI, Y. Time dependency of the influence of prognostic factors on relapse in breast cancer. **Cancer.** 1993 Nov 15;72(10):2993-3001. PubMed PMID: 8221567.

YU, K. D.; SHEN, Z.; SHAO, Z. M. The immunohistochemically "ER-negative, PR-negative, HER2-negative, CK5/6-negative, and HER1-negative" subgroup is not a surrogate for the normal-like subtype in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2009 Dec;118(3):661-3.

ZAHA, D. C.; Lazăr, E.; Lăzureanu, C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. **Rom J Morphol Embryol.** 2010;51(1):85-9. PubMed PMID: 20191125.

ZHANG, M. et al. The differences in CXCR4 protein expression are significant for the five molecular subtypes of breast cancer. **Ultrastruct Pathol.** 2012 Dec;36(6):381-6. doi: 10.3109/01913123.2012.728687. PubMed PMID: 23216236.



[Edit Account](#) | [Instructions & Forms](#) | [Log Out](#) | [Get Help Now](#)

SCHOLARONE[™]
Manuscripts

[Main Menu](#) → [Author Dashboard](#) → Submission Confirmation

You are logged in as Cláudia Macêdo

Submission Confirmation

Thank you for submitting your manuscript to CLINICS.

Manuscript ID: CLINICS-2013-0465

Title: Clinicopathological characteristics and survival in patients with invasive breast carcinoma

Macêdo, Cláudia
Nascimento, Ivana
Authors: Rego, Marco
Barbosa, Helenemarie
Silvany Neto, Annibal

Date Submitted: 17-Jun-2013

 [Print](#)  [Return to Dashboard](#)

ScholarOne Manuscripts[™] v4.12 (patent #7,257,767 and #7,263,655). © ScholarOne, Inc., 2013. All Rights Reserved.
ScholarOne Manuscripts is a trademark of ScholarOne, Inc. ScholarOne is a registered trademark of ScholarOne, Inc.

 [Follow ScholarOne on Twitter](#)

[Terms and Conditions of Use](#) - [ScholarOne Privacy Policy](#) - [Get Help Now](#)

Características clínico-patológicas e sobrevida em pacientes com carcinoma infiltrante da mama

Título Abreviado: Carcinoma infiltrante da mama

Cláudia Leal Macêdo, Ivana Lúcia Oliveira Nascimento, Marco Antônio Vasconcelos Rêgo, Helenemarie Schaer Barbosa, Annibal Muniz Silvany Neto

Correspondência:

Cláudia Leal Macêdo

Rua Sócrates Guanaes Gomes, 107 apto 1301

Cidade Jardim

40296-720Salvador, Bahia

Telefone: 77-8825-1292

Email: claudiamacedo14@hotmail.com

Declaração de participação dos autores: Todos os autores participaram ativamente na execução do estudo e se responsabilizam publicamente pelo manuscrito.

Cláudia Leal Macêdo: responsável pela elaboração do projeto de estudo e redação do manuscrito final, pela coleta de dados, aplicação da metodologia e interpretação dos dados;

Ivana Lúcia Oliveira Nascimento: responsável pela revisão crítica e supervisão do trabalho;

Marco Antônio Vasconcelos Rêgo: responsável pela aplicação da metodologia, análise estatística e interpretação dos dados;

Helenemarie Schaer Barbosa: responsável pela revisão crítica e supervisão geral do trabalho;

Annibal Muniz Silvany Neto: responsável pela análise estatística e interpretação de dados.

RESUMO

Objetivo: Descrever os fatores clínico-patológicos e avaliar a sobrevida de pacientes com carcinoma infiltrante da mama, mastectomizadas no ano de 2002, com seguimento clínico de aproximadamente dez anos. **Métodos:** Estudo descritivo de 171 pacientes com análise de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier e análise multivariada de regressão de Cox. **Resultados:** A média de idade das pacientes foi de 55 anos, 62% eram menopausadas e 21,6% apresentaram metástase à distância até o final do seguimento. A maioria dos tumores foi classificado como ductal infiltrante (89,5%), de tamanho tumoral $pT2$ e grau histológico II, representando cada um 54,4%, e em 57,3% dos casos observou-se metástases axilares. A maioria das pacientes (23,4%) estava no estágio IIA e o tratamento mais utilizado foi radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia combinados (30,4%). O subtipo luminal A foi identificado em 112 (65,5%) tumores; o luminal B em 14 (8,2%); o HER2 + em 6 (3,5%) e o triplo-negativo em 39 (22,8%). A taxa de sobrevida foi de 80,1%. Na análise multivariada, as variáveis independentes que permaneceram associadas à sobrevida foram *status* menopausal, comprometimento das margens cirúrgicas, metástase à distância e os subtipos luminal A, luminal B e HER2 +. As metástases à distância apresentaram o maior risco de morte (HR=12,34 IC=90% 6,34-24,04). **Conclusão:** A média de idade foi menor comparada aos países desenvolvidos. As taxas de sobrevida foram semelhantes às desses países e superiores às das regiões brasileiras. Ressalta-se a importância dos prontuários médicos no levantamento de dados epidemiológicos e de fatores prognósticos no carcinoma infiltrante da mama.

Palavras-chave: Câncer de mama; sobrevida; patologia; prognóstico

INTRODUÇÃO

O câncer de mama em mulheres é a neoplasia de mais alta incidência e mortalidade tanto nos países desenvolvidos quanto naqueles em desenvolvimento. No Brasil o câncer de mama vem se transformando em um grave problema de saúde pública devido às altas taxas de incidência e mortalidade podendo esta última estar relacionada ao diagnóstico tardio e à terapêutica inadequada. Na Bahia, apesar das taxas de incidência intermediárias, o carcinoma infiltrante da mama continua sendo a neoplasia mais incidente em mulheres. Apesar deste quadro preocupante, observa-se um aumento na sobrevida nos países ocidentais (1,2).

No Brasil há poucos estudos de sobrevida em pacientes com carcinoma mamário e na Bahia eles são inexistentes. Nestes estudos de sobrevida no Brasil, observam-se variações nas taxas de 61% a 87,7% nas regiões Sul, Sudeste e Nordeste, o que pode ser explicado por variações metodológicas, bem como a fatores inerentes à população estudada (3-8).

O conhecimento dos mecanismos da heterogeneidade e da biologia tumoral pode auxiliar na determinação do prognóstico das neoplasias da mama. Assim, alguns fatores prognósticos clínicos e morfológicos já reconhecidos têm sido utilizados para prever o perfil evolutivo destas pacientes (9,10). Mais recentemente, a classificação destas neoplasias em subtipos por meio da expressão gênica e imunoistoquímica vêm sendo empregada para melhorar o entendimento desta diversidade tumoral e de sua correlação com a evolução da doença (11-14).

Os fatores clínicos e histopatológicos já reconhecidos na literatura em diferentes populações compreendem dentre outros, a idade, *status* menopausal, *status* axilar e metastático, bem como tamanho tumoral, grau histológico e a expressão de marcadores imunoistoquímicos (9,15,16). Todos estes interferem no estadiamento clínico e patológico e por sua vez mostram relação com a evolução da doença, observando-se que a sobrevida é inversamente proporcional ao tamanho tumoral e ao comprometimento axilar (16).

Apesar de já terem sido publicados alguns estudos sobre a relação entre estes fatores e o prognóstico na população brasileira, outros fatores tais como a expressão dos marcadores imunoistoquímicos utilizados na classificação dos subtipos ainda necessitam de validação (4-7). O estudo dos fatores prognósticos clínicos e histopatológicos é praticamente inexistente na população da Bahia, principalmente na correlação com a sobrevida e fatores do carcinoma

mamário associado a esta (17). Assim, o objetivo deste trabalho é descrever os fatores clínico-patológicos e avaliar a evolução e a sobrevida de pacientes com carcinoma infiltrante da mama, mastectomizadas no ano de 2002, tratadas em um hospital de referência em Oncologia na cidade de Salvador, Bahia e acompanhadas por um período de dez anos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Tipo de investigação e população do estudo

Trata-se de um estudo analítico de sobrevida. A população de estudo foi constituída por todas as 312 pacientes com diagnóstico histopatológico de carcinoma infiltrante da mama no ano de 2002 e submetidas à mastectomia simples. Estes dados foram obtidos no Hospital Aristides Maltez (HAM), referência para o tratamento de câncer no estado da Bahia. Desta população, foram excluídos 141 prontuários (28 não acessíveis devido a problemas técnicos, 110 devido à ausência de blocos parafinados com tumor no arquivo e três por serem de pacientes do sexo masculino). Nos cento e treze prontuários excluídos, todas as variáveis clínicas e patológicas foram categorizadas e demonstravam similaridade com a população amostrada. A população efetivamente estudada foi constituída por 171 pacientes do sexo feminino.

Coleta de dados e variáveis estudadas

Os dados foram coletados a partir dos prontuários médicos de todas as pacientes submetidas à mastectomia simples e retirada dos linfonodos axilares cujo diagnóstico histopatológico foi feito entre primeiro de janeiro de 2002 e 31 de dezembro de 2002. Para a coleta de dados foi elaborada uma ficha padronizada. Foram analisadas as variáveis clínicas e patológicas, incluindo os subtipos do carcinoma infiltrante da mama.

Foram analisadas as seguintes variáveis clínicas: data do diagnóstico, idade ao diagnóstico (em anos) categorizada em ≤ 40 anos e ≥ 40 anos. A variável paridade, história familiar, *status* menopausal, recidiva e metástases à distância foram categorizadas em: sem informação, sim, não. Devido à escassez de informações em parte dos prontuários, o estadiamento clínico foi avaliado em 136 prontuários, sendo categorizados em estádios I, IIA, IIB, IIIA, IIIB e IV, segundo a União Internacional contra o Câncer (UICC) (18).

As variáveis patológicas foram caracterizadas como tamanho tumoral, grau histológico, tipo histológico, *status* axilar e comprometimento das margens cirúrgicas. O tamanho tumoral foi determinado pelo estadiamento *p*TMN, considerando apenas o tamanho tumoral (T) (18). Para determinação da variável grau histológico foi utilizado o sistema de graduação microscópica de Bloom-Richardson modificado nos casos de carcinoma ductal infiltrante (SOE) (19), sendo considerados os graus I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (pouco diferenciado) (19). Para a classificação histológica dos tumores foram empregadas as recomendações do Colégio Americano de Patologistas (20). O *status* axilar foi categorizado como: sem informação, positivo, negativo. As margens cirúrgicas comprometidas foram consideradas como aquelas com medida inferior à 1,0 mm e foram categorizadas em sem informação, sim, não. Na variável tratamento consideraram-se todos aqueles feitos nesta população até o período final do acompanhamento, sendo categorizado como: sem informação, hormonioterapia, quimioterapia, radioterapia e tratamentos combinados.

A caracterização dos subtipos foi determinada pelos dados oriundos dos laudos imunoistoquímicos. O subtipo luminal A foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 -; o subtipo luminal B foi considerado como: RE + e/ou RP+ e HER2 +; o subtipo HER 2 + como RE - e/ou RP- e HER2 + e os subtipos triplo-negativo, aqueles que eram RE - e/ou RP- , HER2 - (13).

Análise de dados

A partir dos dados obtidos da ficha específica foi criado um banco de dados no programa EPI-INFO versão 6.03. As variáveis qualitativas foram descritas através de suas frequências simples e frequências relativas. As variáveis quantitativas foram descritas por meio de medidas de tendência central e de dispersão.

O tempo de sobrevida foi medido em meses e foi definido como o período entre a data do diagnóstico histopatológico da doença e a data do óbito. Para a análise de sobrevida foram considerados como falha os óbitos ocorridos até o final do seguimento (18 de setembro de 2011) e, como censura as mulheres que permaneceram vivas até a data final do seguimento. Na análise de sobrevida foi utilizado o método de Kaplan-Meier, sendo calculadas as probabilidades e as curvas de sobrevida com estratificação, agrupando-se as pacientes de acordo com as variáveis clínicas e patológicas selecionadas para este estudo (21).

Na análise univariada comparou-se cada uma das variáveis com a sobrevida das pacientes, sendo incluídas: idade, *status* menopausal, metástase à distância, recidiva, estadiamento clínico, tamanho tumoral, grau e tipos histológicos, *status* axilar, comprometimento das margens cirúrgicas e tratamentos. O Teste de Breslow foi empregado para a comparação das funções de sobrevida para cada variável, sendo considerado estatisticamente significativo quando o seu valor foi menor ou igual a 0,05 (21). Na análise multivariada foi empregado o modelo de regressão de Cox sendo incluídas todas as variáveis clínicas e patológicas no modelo, sendo retiradas e recolocadas posteriormente, segundo o nível de significância estatística de 0,05. As variáveis que permaneceram no modelo final foram as que se mostraram estatisticamente significantes, depois de controladas pelas demais no modelo de Cox. Foram computados os *hazard ratios* (HR) e correspondentes intervalos de confiança de 90% (IC=90%). Para verificar a proporcionalidade dos modelos de Cox foi realizado a análise de resíduo para caracterizar o ajuste do modelo. Todas as análises foram realizadas com o programa estatístico SPSS 10.0.

Este projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital Aristides Maltez –CEP/ LIGA CONTRA O CÂNCER DO HOSPITAL ARISTIDES MALTEZ, sob o protocolo de número 262/10.

RESULTADOS

A média de idade ao diagnóstico foi de 55 anos (mediana de 53 anos), com uma variação de 25 a 96 anos. A frequência das pacientes jovens (≤ 40 anos) foi de 14%. No momento do diagnóstico, 106 pacientes (62%) eram clinicamente menopausadas. Observou-se história familiar positiva em 14,6% das pacientes. Na avaliação de metástases à distância, 37 (21,6%) tiveram esse desfecho e 12 pacientes (7%) apresentaram recidiva tumoral. O estadiamento clínico no momento do diagnóstico foi determinado em 136 pacientes: 23 (15,3%) pacientes estavam no estágio I; 40 (23,4%) pacientes estavam no estágio IIA; 31 (18,1%) pacientes no estágio IIB; no estágio IIIA e IIIB foram observadas 20 (11,7%) pacientes cada um. Apenas duas pacientes (1,2%) estavam no estágio IV. O grau histológico II foi o mais frequente (54,4%), seguido do grau III, (38,6%) e do grau I (7,0%). Quanto ao tamanho, os tumores mais frequentes foram classificados como pT2 (54,4%), seguidos pelos tumores pT3 (23,4%) e dos pT1 (22,2%). O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma ductal infiltrante (sem outra especificação) (SOE) (89,5%). Observou-se *status* axilar positivo em 98 (57,3%) pacientes, enquanto que 67 (39,2%) tiveram axila negativa. Identificou-se que em 18 (10,5%)

amostras tumorais, as margens estavam comprometidas pela neoplasia. Em relação aos subtipos, o luminal A foi identificado em 112 (65,5%) tumores; o luminal B em 14 (8,2%); o subtipo HER2 + em 6 (3,5%) e o triplo-negativo em 39 (22,8%) tumores. As pacientes foram submetidas aos seguintes tratamentos: hormonioterapia (5,3%); a radioterapia (2,9%) e quando combinados, radioterapia e hormonioterapia representaram 22,2%, a radioterapia e a quimioterapia, 24,6% e a radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia em 30,4% (Tabela 1). O seguimento clínico foi realizado em toda a população com uma média de tempo de 114,93 meses, mediana de 108,2 meses e amplitude 1 a 115,2 meses. Até o término do seguimento, 137 (80,1%) pacientes estavam vivas e 34 (19,9%) foram a óbito. Entre as pacientes que estão vivas, oito (5,8%) apresentaram recidiva tumoral e 16 (11,7%) apresentaram metástases à distância. Nas pacientes que foram a óbito, quatro (11,8%) apresentaram recidiva e 21 (61,8%) apresentaram metástases à distância. A sobrevida global obtida pela estimativa de Kaplan-Meier foi de 80,1% ao final do período do estudo. As variáveis clínicas e patológicas utilizadas na análise univariada estão representadas na Tabela 2. As variáveis clínicas e patológicas, o tamanho tumoral, o *status* axilar, comprometimento das margens cirúrgicas e a metástase à distância estavam associadas significativamente à sobrevida. Na análise de Kaplan-Meier, observou-se que pacientes com tumores com tamanho *pT1* (92,1%) apresentaram melhor sobrevida em relação àquelas com tumores *pT2* e *pT3* (81,7% e 65,0%, respectivamente) (Figura 1). A sobrevida estratificada pelo *status* axilar demonstrou que as pacientes com axila negativa apresentaram melhor sobrevida (89,6%) do que aquelas com metástase axilar (74,5%) (Figura 2). Em relação às margens cirúrgicas, observou-se que a melhor taxa de sobrevida foi entre as pacientes com tumores que não apresentavam comprometimento (82,1%), do que entre aquelas com margens comprometidas (Figura 3). Entre as pacientes que não apresentaram metástase à distância durante o período de seguimento, observou-se melhor taxa de sobrevida (80,1%) do que aquelas que apresentaram esse desfecho (43,2%) (Figura 4). Observaram-se taxas variadas de sobrevida em relação às demais variáveis clínicas e patológicas, porém sem significância estatística. Na regressão de Cox as variáveis independentes que permaneceram associadas à sobrevida foram o status menopausal, comprometimento das margens cirúrgicas, metástase à distância e os subtipos tumoral luminal A, luminal B e o HER2 +. O maior risco de morte foi observado em pacientes com metástases à distância (HR=12,34 IC=90% 6,34-24,04). Dentre os subtipos, o HER2 + apresentou o maior risco de morte (HR= 3,36 IC=90% 1,74-6,52) (Tabela 3). Para verificar a suposição de proporcionalidade dos riscos foi utilizada a análise de resíduos que demonstrou um bom ajuste do modelo.

DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea com características morfológicas e evolutivas variadas. Em um percentual significativo de pacientes os padrões morfológicos não mostram correlação com as características biológicas intrínsecas dos tumores. As características biológicas se manifestam pelo desenvolvimento tumoral representado pelo tamanho do tumor, o grau histológico, o *status* axilar e a capacidade metastática (9). Estes aspectos histopatológicos são diferentes entre grupos de tumores, o que pode refletir a heterogeneidade gênica tumoral. Esta heterogeneidade entre os tumores pode ser explicada pelo tipo de célula de origem e seu perfil molecular e que poderá se traduzir em aspectos clínico-patológicos diversos (10).

O objetivo deste presente trabalho foi descrever os fatores clínico-patológicos e avaliar a sobrevida em um grupo de pacientes com carcinoma infiltrante da mama. Dentre os achados clínicos, a média de idade de 55 anos foi semelhante à observada em estudos realizados nas regiões do Sul, Nordeste, Sudeste e Norte do Brasil (3-8) e inferior àquela dos países desenvolvidos em que a média é de 65 anos (1). Por sua vez, nesta população a frequência de pacientes jovens (≤ 40 anos) foi de 14%, ligeiramente mais elevada em relação a outro estudo realizado na Paraíba, que foi de 11,9 % (5). Salienta-se ainda neste grupo de pacientes jovens, a sobrevida foi menor, como também observado na população em estudo, que foi de 75%. Porém, o impacto da idade permanece como controverso na literatura nacional e estrangeira (4,5,22).

A maioria das pacientes (62%) deste estudo eram menopausadas. Já foi descrita associação entre mulheres na pós-menopausa com níveis elevados de estrogênio e maior risco de câncer de mama (23). Como em outras séries, observou-se na população estudada, maior frequência de tumores que eram receptores hormonais positivos (15,24). A maioria das pacientes estudadas (85,4%) não apresentava história familiar para câncer de mama, o que corrobora a incidência maior de câncer esporádico observado na literatura (25).

Nesta população, a maioria das pacientes (78,4%) não apresentou metástases à distância até o final do seguimento, observando-se, que as pacientes no estágio IV com metástases, demonstravam baixa taxa de sobrevida (50%), resultado semelhante ao encontrado no estudo realizado na Paraíba, com 52% (5). Observou-se, também, neste estudo,

baixa taxa de recidiva tumoral, achado semelhante ao observado em uma população, oriunda do mesmo hospital com axila-negativa (17).

A maioria das pacientes no presente estudo estava no estágio clínico IIA e IIB (23,4% e 18,1%) e uma menor porcentagem no estágio IV (1,2%), o que também foi observado nas regiões Sul e Nordeste do Brasil (3-5). Este dado reflete a redução do percentual de casos avançados observados no Brasil na última década, e que podem estar relacionados à detecção mais precoce, valorizando assim as políticas de prevenção, tais como as campanhas de diagnóstico precoce e a facilidade de acesso aos exames de rastreamento (26).

Em relação as características patológicas, os tumores $pT2$, de grau II e tipo histológico ductal infiltrante foram os mais frequentes na população estudada, caracterizando assim carcinomas moderadamente diferenciados e de tamanho intermediário. Estes achados se relacionam com as taxas de sobrevida intermediária, observadas neste estudo (81,7%). Observou-se ainda uma alta frequência de metástases axilares representando mais da metade dos casos (57,3%), sendo mais elevada do que a observada nas populações do Rio Grande do Sul, Minas Gerais e Rio de Janeiro que demonstraram percentuais em torno de 51% (3,6,7). O comprometimento axilar é considerado um fator prognóstico isolado importante no câncer de mama e que interfere também na sobrevida, o que pode ser observado neste estudo onde as pacientes com metástases axilares demonstraram menor taxa de sobrevida (74,5%) em relação as que não apresentavam (16).

Os subtipos moleculares do carcinoma mamário podem se correlacionar com as diversas características biológicas tumorais, representando uma tentativa de explicar a heterogeneidade tumoral. Neste estudo, a distribuição da frequência dos subtipos tumoral luminal A, luminal B e do HER2 + são semelhantes aos observados na literatura, sendo o luminal A o mais frequente (12-14). O subtipo triplo-negativo demonstrou frequência mais elevada (22,8%) quando comparada com trabalhos estrangeiros e nacionais, que referiam cerca de 10% a 16% (12-14). Este achado pode estar relacionado a características peculiares da população estudada, onde pacientes com ascendência africana demonstram maior frequência do subtipo triplo-negativo (27).

A frequência dos fatores morfológicos e prognósticos demonstrados neste trabalho é semelhante a encontrada em estudos com populações de mulheres em outros estados

brasileiros (3,5,7). Os estudos de caracterização do perfil clínico-patológico da população na Bahia são escassos na literatura (17), salientando-se assim a importância deste conhecimento para implantação mais individualizada de políticas de prevenção e de diagnóstico.

A taxa de sobrevida geral após dez anos na população do estudo foi de 80,1%. Quando comparada às observadas em estudos brasileiros observou-se que a taxa de sobrevida na Bahia foi discretamente superior à encontrada no estudo no Rio Grande do Sul, com taxa de 78,7% (3). Esta taxa de sobrevida foi superior também à observada em outros estudos realizados em Santa Catarina, Paraíba, Rio de Janeiro, Paraíba e Pará, com 76,2%, 79,1%, 75% e 61% todos com tempo de seguimento de cinco anos, inferior ao do presente estudo (4,5,7,8).

Em casuísticas estrangeiras, a taxa de sobrevida registrada neste estudo é semelhante à encontrada em países desenvolvidos, como os Estados Unidos, Suécia, Japão, Finlândia e Austrália que mostraram taxas em torno de 80% (28). Contudo, o tempo de seguimento do presente estudo foi de dez anos, superior aos destes trabalhos estrangeiros que foi de quatro anos. Assim, devem-se levar em consideração, nestas comparações entre estes estudos de sobrevida, as diferenças metodológicas, os diferentes tipos de populações estudadas, bem como o período de acompanhamento.

O estadiamento clínico e o tipo de tratamento empregado são algumas das variáveis relacionadas ao risco de morte por câncer de mama e que podem influenciar as diferenças nas taxas de sobrevida. Na população estudada a maioria das pacientes se encontravam no estágio clínico IIA, onde depois do estágio I, é aquele com maior taxa de sobrevida (85%). Além disto, os esquemas combinados de tratamento foram os mais utilizados neste estudo e são aqueles associados a uma melhor taxa de sobrevida (82%). Outro dado que pode estar relacionado à maior sobrevida deste estudo é que todas as pacientes são oriundas de um hospital de referência de câncer e podem ter um acesso mais fácil aos métodos diagnósticos, bem como ao estadiamento e tratamento.

Salienta-se ainda que os estudos de sobrevida na população nordestina com câncer de mama são praticamente inexistentes, observando-se apenas aquele do estado da Paraíba (5). Assim, no presente estudo identificou-se o tamanho tumoral, *status* axilar, comprometimento das margens cirúrgicas e metástases à distância como os fatores significantes que influenciaram nas taxas de sobrevida neste grupo de pacientes na Bahia.

Os estudos de sobrevida realizados em regiões brasileiras demonstraram também que o tamanho tumoral e metástases axilares e à distância eram fatores que influenciaram diretamente as taxas de sobrevida (4-8). Em outros estudos observaram-se que tumores de 5,0 cm ou mais com metástases axilares demonstravam redução da taxa de sobrevida quando comparados aos tumores *pT1* (29,30). Ressalta-se que estes fatores são determinantes no estadiamento clínico e patológico e fazem parte do TNM preconizado pela União Internacional contra o Câncer (UICC) (18). Salienta-se ainda, a importância da padronização destas variáveis que devem constar nos laudos histopatológicos dos tumores mamários.

Na análise multivariada além do comprometimento das margens cirúrgicas e da metástase à distância, o status menopausal e os subtipos luminal A, luminal B e o HER2 + permaneceram como as variáveis independentes associadas ao óbito nesta população. As margens cirúrgicas comprometidas representam um fator histopatológico associado com a recidiva loco-regional (31). Desta forma a análise criteriosa das margens cirúrgicas na população estudada, pode auxiliar na determinação das pacientes com maior risco de recidiva.

As metástases à distância estavam presentes em 61,8% das pacientes que foram a óbito, demonstrando a importância destas manifestações na sobrevida, observando-se também um maior risco de morte do que aquelas que não apresentaram metástases. Este dado pode refletir a menor taxa de sobrevida observada no estágio IV (50%) nesta população do estudo, onde a presença de metástase à distância é definidora deste estadiamento. Ressalta-se assim novamente a importância do estadiamento TNM na determinação do prognóstico (18).

O subtipo HER2 + apresentou maior risco de morte, que poderia estar associado com a relação deste subtipo e também do triplo-negativo com fatores de pior prognóstico, tais como tumores de maior dimensão, grau histológico III, metástases axilares e recidiva tumoral (32,33). Uma maior frequência de metástases à distância e recidiva tumoral já foi observada nesta população do estudo nos subtipos HER2 + e no triplo negativo (dado não publicado).

Dentre as características encontradas nesta população com carcinoma infiltrante da mama, destacaram-se alguns achados como média de idade menor que aquela dos países desenvolvidos e semelhantes à de algumas regiões brasileiras; taxas de sobrevida semelhantes às desses países e superior à das regiões brasileiras e uma frequência mais elevada do subtipo triplo-negativo em comparação com as casuísticas estrangeiras e nacionais. Os demais achados epidemiológicos foram semelhantes àqueles de trabalhos nacionais e internacionais.

Este presente estudo demonstra ainda a importância dos prontuários médicos no levantamento de dados secundários como os referentes ao TNM e de dados epidemiológicos como idade, menopausa e outros fatores que podem influenciar no prognóstico das pacientes com carcinoma infiltrante da mama. Além disto, o conhecimento de fatores relacionados à sobrevida no câncer de mama pode servir para a caracterização prognóstica das pacientes, bem como auxiliar na determinação de condutas terapêuticas mais individualizadas, possibilitando uma abordagem técnica mais realista.

REFERÊNCIAS

- 1- Jemal A, Bray F, Center MM, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA CancerJ Clin.* 2011;61(2):69-90.
- 2- Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Coordenação Geral de Ações Estratégicas, Coordenação de Prevenção e Vigilância. Rio de Janeiro: Inca; 2011.118 p.
- 3- de Moraes AB, Zanini RR, Turchiello MS, Riboldi J, de Medeiros LR. [Survival study of breast cancer patients treated at the hospital of the Federal University in Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2006;22(10):2219-28.
- 4- Schneider IJ, d'Orsi E. [Five-year survival and prognostic factors in women with breast cancer in Santa Catarina State, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2009;25(6):1285-96.
- 5- Basílio RLS. Sobrevida de mulheres portadoras de câncer de mama e fatores associados [Dissertação de Mestrado]. Campina Grande, Paraíba: Universidade Estadual da Paraíba; 2011.
- 6- Guerra MR, Mendonça GA, Bustamante-Teixeira MT, Cintra JR, Carvalho LM, Magalhães LM. [Five-year survival and prognostic factors in a cohort of breast cancer patients treated in Juiz de Fora, Minas Gerais State, Brazil]. *Cad Saude Publica.* 2009;25(11):2455-66.

- 7- Mendonça GA, Silva AM, Caula WM.[Tumor characteristics and five-year survival in breast cancer patients at the National Cancer Institute, Rio de Janeiro, Brazil]. *Cad Saude Publica*. 2004;20(5):1232-9.
- 8- Pereira WMM. Mortalidade e sobrevida por câncer de mama no Estado do Pará [Dissertação de Mestrado].Rio de Janeiro: Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz; 2001.
- 9- Page DL. The epidemiology of tumor markers in breast cancer management: prognostic markers.*Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1994;3(2):101-4.
- 10- Bertucci F, Birnbaum D. Reasons for breast cancer heterogeneity. *J Biol*. 2008;7(2):6.
- 11- Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterized series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses.*Int J Cancer*. 2005;116(3):340-50.
- 12- Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma.*Clin Cancer Res*. 2004;10(16):5367-74.
- 13- Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.*JAMA*. 2006;295(21):2492-502.
- 14- Dutra MC, Rezende MA, de Andrade VP, Soares FA, Ribeiro MV, de Paula EC, et al. [Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very young and postmenopausal women].*Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(2):54-60.
- 15- Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology*. 2008;52(1):82-90.
- 16- *Abreu E, Koifman S*. [Prognostic factors in female breast cancer]. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2002;48(1):113-31. Available from: http://www.inca.gov.br/rbc/n_48/v01/pdf/revisao.pdf. Accessed February 10, 2013.

- 17- Ramos Filho AO, Castro TW, Rêgo MA, Alves FO, Almeida LC, Sousa MV, et al. [Predictive factors for recurrence in axillary node-negative breast carcinoma]. *Revista Brasileira de Cancerologia*. 2002;48(4):499-503.
- 18- Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A (eds). American Joint Committee on Cancer. AJCC cancer staging manual. 7th edition. New York: Springer; 2010.
- 19- Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol*. 1995;26(8):873-9.
- 20- Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000;124(7):966-78.
- 21- Kleinbaum DG, Klein M. *Survival Analysis. A self-learning text*. 2nd ed., New York: Springer; 2005.
- 22- Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. Early-onset breast cancer - histopathological and prognostic considerations. *Br J Cancer*. 1997;75(9):1318-23.
- 23- Key T, Appleby P, Barnes I, Reeves G; Endogenous Hormones and Breast Cancer Collaborative Group. Endogenous sex hormones and breast cancer in postmenopausal women: reanalysis of nine prospective studies. *J Natl Cancer Inst*. 2002;94(8):606-16.
- 24- Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol*. 2005;123(1):21-7.
- 25- Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet*. 2001;358(9291):1389-99.
- 26- Martins E, Freitas-Junior R, Curado MP, Freitas NM, Oliveira JC, Bandeira e Silva CM. [Temporal evolution of breast cancer stages in a population-based cancer registry in the Brazilian Central region]. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009;31(5): 219-23.

- 27- Corrêa PB, Toralles MB, Abe-Sandes K, Machado TM, Bonfim TF, Meyer L, et al. [Triple-negative breast cancer and its association with African descent]. *Revista Ciências Médicas e Biológicas* 2010;9(Supl. 1):3-7.
- 28- Coleman MP, Quaresma M, Berrino F, Lutz JM, De Angelis R, Capocaccia R, et al.; CONCORD Working Group. Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *Lancet Oncol.* 2008;9(8):730-56.
- 29- Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989;63(1):181-7.
- 30- Koscielny S, Arriagada R, Adolfsson J, Fornander T, Bergh J. Impact of tumour size on axillary involvement and distant dissemination in breast cancer. *Br J Cancer.* 2009;101(6):902-7.
- 31- Behm EC, Beckmann KR, Dahlstrom JE, Zhang Y, Cho C, Stuart-Harris R, et al. Surgical margins and risk of locoregional recurrence in invasive breast cancer: an analysis of 10-year data from the Breast Cancer Treatment Quality Assurance Project. *Breast.* 2013 Mar 22. pii: S0960-9776(13)00051-9. doi: 10.1016/j.breast.2013.02.018. [Epub ahead of print].
- 32- Zaha DC, Lazăr E, Lăzureanu C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. *Rom J Morphol Embryol.* 2010;51(1):85-9.
- 33- Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer.* 2007;109(9):1721-8.

Legendas das Figuras:

Figura 1: Curva de sobrevida em dez anos, estratificada pelo tamanho tumoral, de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

Figura 2: Curva de sobrevida em dez anos, estratificada pelo status axilar, de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

Figura 3: Curva de sobrevida em dez anos, estratificada pelo comprometimento das margens cirúrgicas, de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

Figura 4: Curva de sobrevida em dez anos, estratificada por metástase à distância, de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

Tabela 1: Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as características clínico-patológicas

<i>Características clínicas e patológicas</i>	<i>Número de casos (%)</i>
Idade	
≤ 40 anos	24 (14%)
> 40 anos	147 (86%)
Status menopausal	
Sem informação	10 (5,8%)
Sim	106 (62,0%)
Não	55 (32,2%)
Historia familiar	
Sem informação	02 (1,2%)
Sim	25 (14,6%)
Não	144 (84,2%)
Metástase à distância	
Sim	37 (21,6%)
Não	134 (78,4%)
Recidiva	
Sim	12 (7,0%)
Não	159 (93,0%)
Estadiamento clínico	
Sem informação	35 (20,5%)
I	23 (13,5%)
IIA	40 (23,4%)
IIB	31 (18,1%)
IIIA	20 (11,7%)
IIIB	20 (11,7%)
IV	(1,2%)
Grau histológico	
I	12 (7,0%)
II	93 (54,4%)
III	66 (38,6%)
Tamanho tumoral	
pT1	38 (22,2%)
pT2	93 (54,4%)
pT3	40 (23,4%)
Tipos histológicos mais frequentes	
Ductal infiltrante	153 (89,5%)
Especiais	18 (11,5%)
Status axilar	
Sem informação	6 (3,5%)
Negativo	67 (39,2%)
Positivo	98 (57,3%)
Comprometimento das margens cirúrgicas	
Sem informação	2 (1,2%)
Sim	18 (10,5%)
Não	151 (88,3%)
Subtipos	
Luminal A	112 (65,5%)

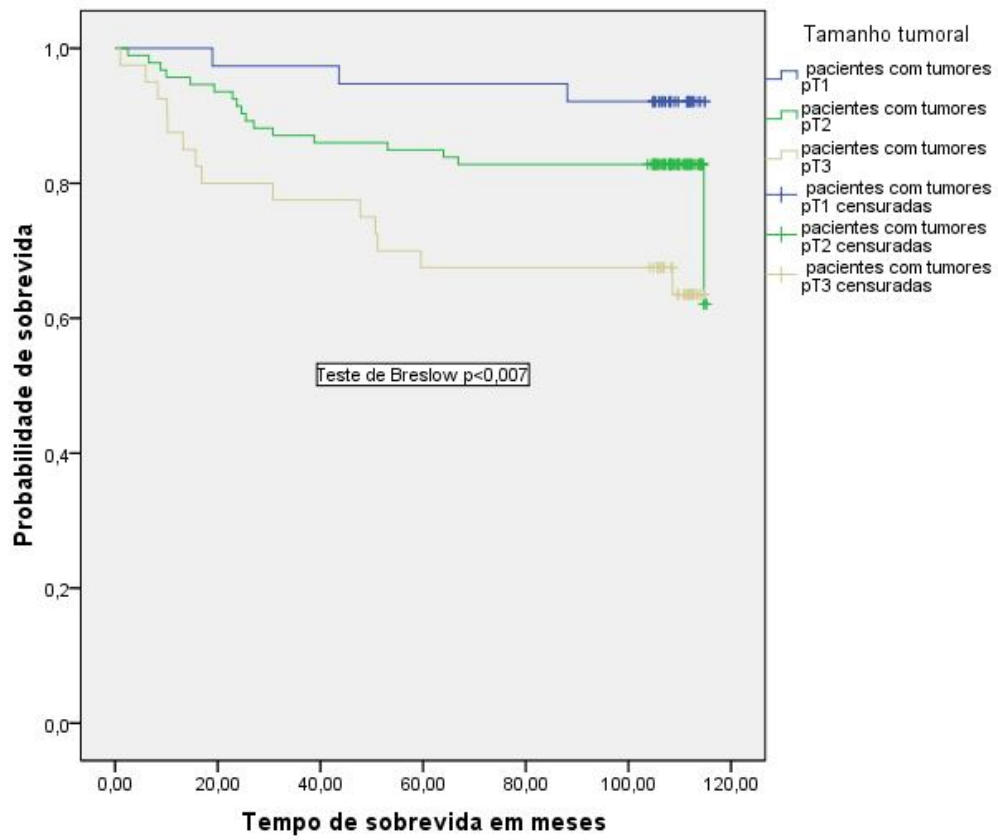
Luminal B	14 (8,2%)
HER2 +	6 (3,5%)
Triplo negativo	39 (22,8%)
<i>Tratamentos mais frequentes</i>	
Hormonioterapia	9 (5,3%)
Radioterapia	5 (2,9%)
Radioterapia + quimioterapia + hormonioterapia	52 (30,4%)
Radioterapia + quimioterapia	42 (24,6%)
Radioterapia + hormonioterapia	38 (22,2%)

Tabela 2: Distribuição das pacientes com carcinoma infiltrante da mama segundo as funções de sobrevida não ajustadas das pacientes e as variáveis do estudo

<i>Variáveis</i>	<i>Sobrevida em 10 anos (IC90%)</i>	<i>Teste Breslow (valor de p)</i>
<i>Idade</i>		
≤ 40 anos	93,1 (77,7- 108,3)	0,45
> 40 anos	99,8 (94,2-105,3)	
<i>Menopausa</i>		
Sim	96,8 (89,9-86,5)	0,18
Não	103,5 (95,3-111,7)	
<i>Metástase à distância</i>		
Sim	107,4 (102,9-111,9)	0,000*
Não	67,6 (53,5-81,8)	
<i>Recidiva</i>		
Sim	99,8 (94,5-105,2)	0,191
Não	83,3 (60,7-106,0)	
<i>Grau histológico</i>		
Grau I	107,3 (98,4-115,7)	
Grau II	101,8 (95,2-108,4)	0,191
Grau III	92,6 (83,0-102,2)	
<i>Tamanho Tumoral</i>		
pT1	109,8 (103,7-115,9)	
pT2	100,0 (93,1-106,9)	0,007*
pT3	85,2 (71,7-98,7)	
<i>Tipo histológico</i>		
Ductal infiltrante	98,3 (92,7-103,9)	
Especiais	102,6 (87,5-117,6)	0,451
<i>Status axilar</i>		
Positivo	94,73 (87,2-102,1)	
Negativo	105,7 (98,6-112,6)	0,026*
<i>Margens</i>		
Sim	77,7 (56,0-99,4)	
Não	101,1 (95,9-106,3)	0,008*

Tabela 3: Sobrevida de pacientes com carcinoma infiltrante da mama, Hazard Ratio e respectivos intervalos de confiança (90%) na análise multivariada de Cox

<i>Variáveis</i>	<i>HR</i>	<i>IC 90%</i>	<i>Valor de p</i>
Menopausa	2,27	1,049-4,907	0,08
Metástase à distância	12,34	6,342-24,043	0,000
Comprometimento das margens cirúrgicas	2,93	1,323-6,495	0,026
Subtipo luminal A	2,04	0,695-5,967	0,28
Subtipo luminal B	1,74	0,303-9,997	0,60
Subtipo HER2 +	3,36	1,739-6,524	0,003



.Figura 1. Curva de sobrevivida em dez anos estratificada pelo tamanho tumoral de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

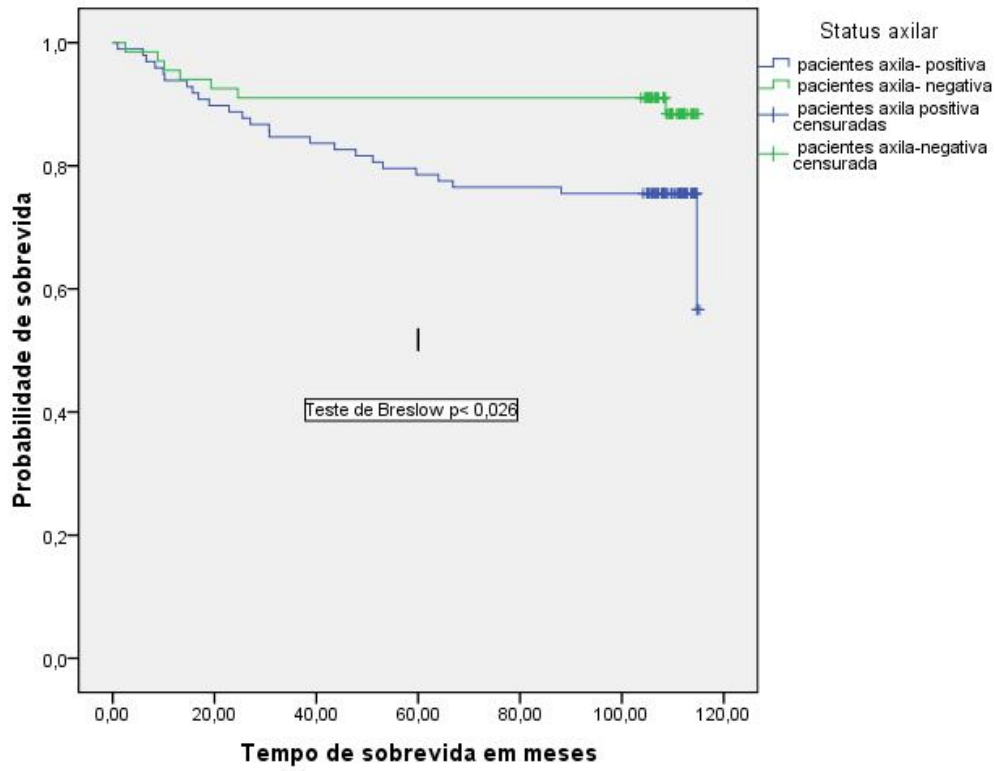


Figura 2. Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo status axilar de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

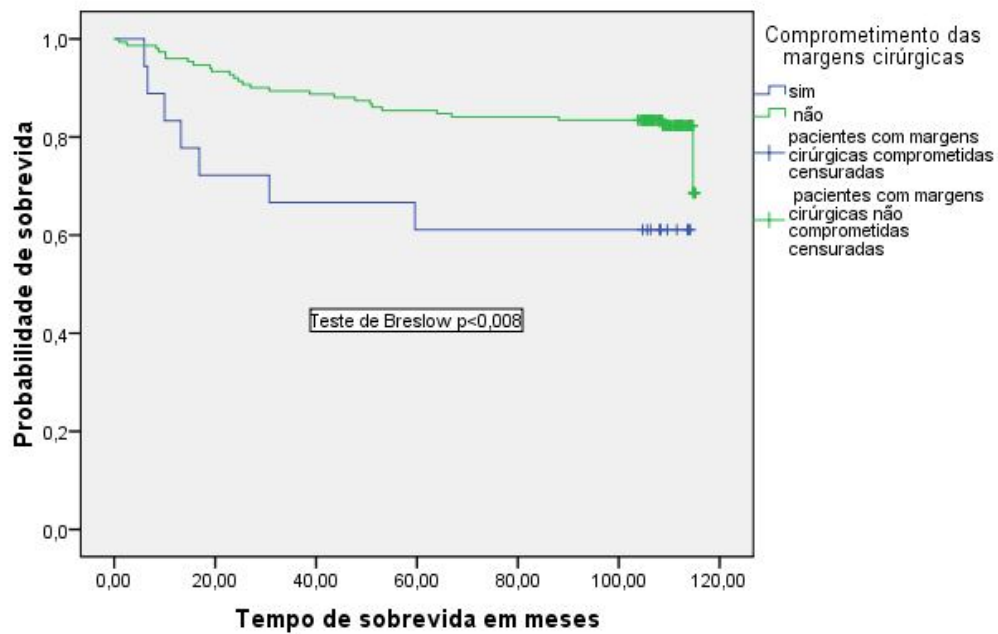


Figura 3. Curva de sobrevida em dez anos estratificada pelo comprometimento das margens cirúrgicas de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

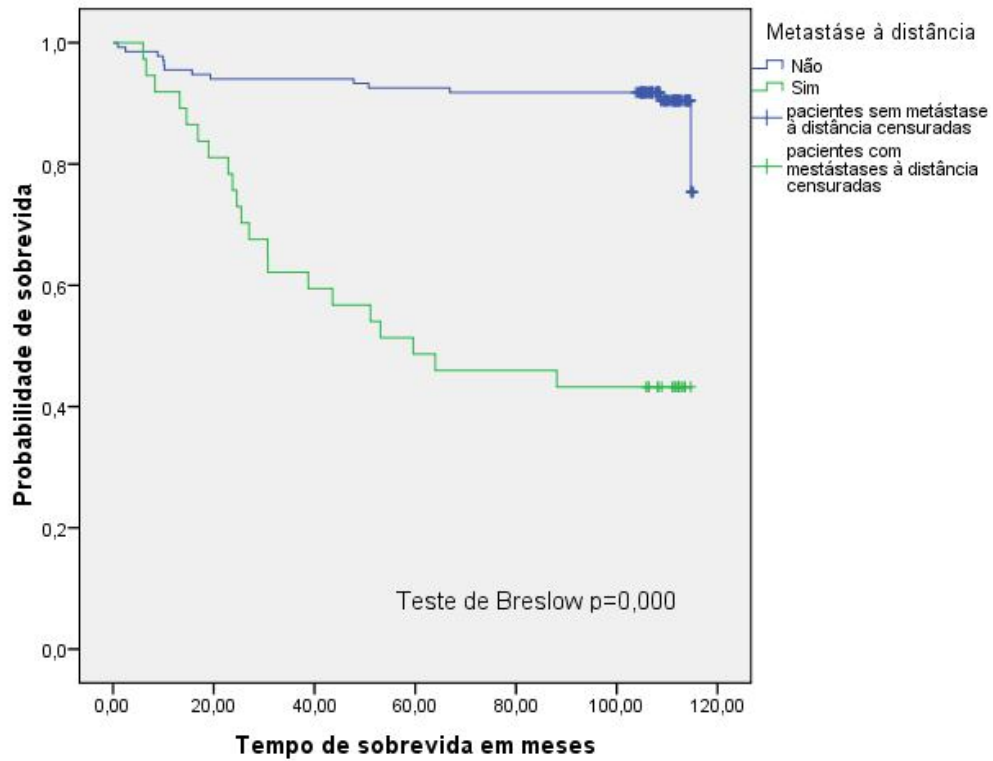


Figura 4. Curva de sobrevivida em dez anos estratificada pela metástase à distância de mulheres com carcinoma infiltrante da mama.

Comentários:

Verifica-se que no estado da Bahia os dados relacionados aos fatores prognósticos clínicos e histopatológicos do câncer de mama bem como da evolução e sobrevida dessas pacientes são praticamente inexistentes. Assim nesta população, caracterizou-se média de idade inferior e taxas de sobrevida semelhantes às dos países desenvolvidos e superiores a outras regiões brasileiras, além de fatores associados significativamente à sobrevida, tais como: metástases à distância, comprometimento da margens cirúrgicas, *status* menopausal e os subtipos moleculares luminal A, luminal B e HER2 +.

ATHAYDE HANSON
T R A D U T O R E S

DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins que o manuscrito “**Características clínico-patológicas do carcinoma infiltrante da mama com subtipos triplo-negativo e HER2 +**” de autoria de Cláudia Leal Macêdo, Ivana Lúcia Oliveira Nascimento, Marco Antônio Vasconcelos Rêgo e Helenemarie Schaer Barbosa se encontra em processo de tradução para a língua inglesa e formatação segundo as normas do periódico Acta Pathologica et Microbiologica Scandinavica (APMS).

Salvador, 19 de junho de 2013.


Célia Athayde

Clinicopathological characteristics of the triple-negative and HER2+ subtypes of invasive breast carcinoma

Running head: Subtypes of invasive breast carcinoma

Cláudia Leal Macêdo ¹, Ivana Lúcia Oliveira Nascimento ², Marco Antônio Vasconcelos Rêgo ³ and Helenemarie Schaer Barbosa ⁴

¹ Master's degree in Immunology. Doctoral student, Postgraduate Program in Immunology, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

² PhD in Immunology. Faculty, Postgraduate Program in Immunology, Health Sciences Institute, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

³ PhD in Public Health. Faculty, School of Medicine, Federal University of Bahia, Salvador, Bahia, Brazil.

⁴ PhD in Human Pathology. Pathologist at the *Aristides Maltez* Hospital, Salvador, Bahia, Brazil.

[This study was carried out at the](#) *Aristides Maltez* Hospital, Salvador, Bahia, Brazil.

Correspondence:

Cláudia Leal Macêdo

Rua Sócrates Guanaes Gomes, 107, Apto 1301, Cidade Jardim

40296-720 Salvador, Bahia, Brazil.

Telephone: 55 77 8825-1292; E-mail: claudiamacedo14@hotmail.com

Macêdo CL, Nascimento ILO, Rêgo MAV, Barbosa HS

Clinicopathological characteristics of the triple-negative and HER2+ subtypes of invasive breast carcinoma

Summary

This study analyzed the rate of occurrence of the different subtypes of invasive breast carcinoma in mastectomized patients. Additionally, the associations between the HER2+ and triple-negative subtypes and prognostic factors were evaluated. A descriptive study was conducted of the clinical and pathological variables of 171 patients. To classify the subtypes, data on hormone receptor expression were obtained from immunohistochemical reports, and HER2 immunohistochemistry was performed during the study. Prevalence ratios were used as a measure of the association between the HER2+ and triple-negative subtypes and the clinical and pathological variables. The luminal A subtype was found in 65.5% of tumors, luminal B in 8.2%, HER2+ in 3.5% and the triple-negative subtype in 22.8% of tumors. The HER2+ and triple-negative subtypes were more prevalent in patients with histological grade III tumors (PR=2.62; 95%CI: 1.56-4.40) and in *p*T3 tumors (PR=1.81; 95%CI: 1.10-2.97). The prognostic factors represented by tumor size and histological grade, as well as the immunohistochemical expression of hormone receptors and HER2 protein, consistently defined the immunophenotypic profile of the tumor. In addition, these prognostic factors were associated with the HER2+ and triple-negative subtypes, considered indicative of poor prognosis.

Key words: Breast cancer; immunohistochemistry; prognosis; measure of association.

Correspondence:

Cláudia Leal Macêdo

Rua Sócrates Guanaes Gomes, 107, Apt. 1301, Cidade Jardim

40296-720 Salvador, Bahia, Brazil.

Telephone: 55 77 8825-1292;

E-mail: claudiamacedo14@hotmail.com

Introduction

The varied clinical characteristics of breast carcinomas and the differences in disease progression may reflect the biological diversity of tumors. Molecular markers, singly or in combination, have been used in an attempt to interpret the association between biology and tumor behavior. Studies on cDNA microarrays provided further knowledge on the genomic profile of breast carcinomas. Other studies have been conducted to relate the morphological and immunophenotypic profile of tumors with prognostic and predictive features by characterizing subtypes based on molecular gene expression patterns (1-3). Later, as less complex methods became available, allowing better adaption for routine clinical laboratory use, immunohistochemical studies came to be used instead of tumor gene expression, and subtypes were then correlated with prognostic and predictive factors (3-8).

A classification of tumor subtypes, initially based on estrogen receptor (ER) expression, progesterone receptor (PR) expression and on expression of the HER2 protein, served to characterize subtypes as follows: the luminal A subtype refers to tumors that are ER+/PR+/HER2-, while the luminal B subtype refers to those that are ER+/PR+/HER2+, the HER2+ subtype corresponds to tumors that are ER-/PR-/HER2+ and the triple-negative subtype as tumors that are negative for all three markers (9-11). With the addition of cytokeratin 5/6 expression and epidermal growth factor receptor (EGFR) analysis, the triple-negative tumors came to be designated a basal-like subtype of invasive breast carcinoma when positive for these markers. Another subtype referred to as the “normal breast” was characterized as being negative for all five tumor markers evaluated (3,6,12).

This classification aims to reflect the gene expression and immunohistochemical profile, and the association between these tumor markers. Therefore, tumors that are ER-negative may be HER2-positive or negative, thus characterizing the HER2+ and triple-negative subtypes, respectively. Negativity for the hormone receptor and HER2 protein overexpression may be associated with factors of poor prognosis such as a high histological grade, tumor recurrence and a short survival time (13). Tumors of the luminal A subtype are the most common and may be considered to have the best prognosis, whereas those of the luminal B subtype may be associated with factors indicative of poor prognosis (5,7,8). Despite the higher frequencies of the luminal subtypes, the relevance of this classification lies in its ability to identify the HER2+ and triple-negative subtypes considered to have the poorest prognosis (3,4,10,11,14).

The frequency of the subtypes of invasive breast carcinoma and their correlations with clinical and pathological factors has been determined in studies conducted abroad (1,3,4,15). However, in Brazil, and principally in Bahia, few studies have been conducted on the immunohistochemical characterization of tumor subtypes and their association with clinical and histopathological factors (12,16,17). The primary objective of this study was to analyze the frequency of the different subtypes and characterize the association of the subtypes considered indicative of poorer prognosis (HER2+ and triple-negative) with prognostic and predictive factors in a population of patients at a cancer referral hospital in Bahia.

Material and Methods

This was a cross-sectional, analytical, observational study. The population consisted of all the 312 patients who had a histopathological diagnosis of invasive breast carcinoma in 2002 and were submitted to simple mastectomy. These data were obtained from the *Arisitides Maltez*

Hospital, a reference hospital for the treatment of cancer in the state of Bahia. Of this population, 141 charts were excluded: 28 could not be assessed at all due to technical difficulties, 110 had no paraffin-embedded tissue and in 3 cases the patients were male. The clinical and pathological variables of these 113 latter cases were evaluated and found to be similar to those of the final study sample, which consisted of 171 female patients.

Data were collected from the medical charts of all the patients submitted to simple mastectomy and axillary lymph node dissection whose histopathological diagnosis was made between January 1 and December 31, 2002. A standardized form was created for data collection. The clinical and pathological variables were analyzed, including the immunohistochemical scores, which were used for determining the subtypes of invasive breast carcinoma.

Clinical variables consisted of the date of diagnosis, age at diagnosis (in years, dichotomized into ≤ 40 years or > 40 years), parity (dichotomized into 0 or ≥ 1 , and family history of breast cancer, tumor recurrence and distant metastasis, classified as: missing, yes or no. Menopausal status was determined in accordance with the data available on the charts and classified as: premenopausal, menopausal or data missing. Due to the fact that data were missing from some of the charts, clinical staging was evaluated in 136 charts and classified as stages I, IIA, IIB, IIIA, IIIB or IV in accordance with the International Union Against Cancer (UICC) and the American Joint Committee on Cancer (AJCC) cancer staging manual (18).

The pathological variables consisted of tumor size, histological grade, histological type, axillary lymph node status and involvement of the surgical margins. Tumor size was determined in accordance with the pathological tumor-node-metastasis (*p*TNM) classification

of malignant tumors, based on which only tumor size (T) was taken into consideration (18). Tumor measurements were classified as *pT1*, *pT2* or *pT3*. None of the tumors were classified as *pT4*. The modified Scarf-Bloom-Richardson histologic grading system was used for the cases of invasive ductal carcinoma not otherwise specified (NOS) (19). In this system, grade I is indicative of a well-differentiated tumor, grade II a moderately differentiated tumor and grade III a poorly differentiated tumor. The recommendations of the College of American Pathologists were used to classify tumor histology (20). Axillary lymph node status was classified as: data missing, positive or negative. Surgical margins of less than 1.0 mm were considered positive, with cases being classified as data missing, positive or negative. For the variable *treatment*, all forms of treatment carried out in this population up to the end of the follow-up period were taken into consideration and classified as data missing, hormone therapy, chemotherapy, radiotherapy or a combination of different treatments.

With respect to the immunohistochemical markers, the scores of hormone receptor expression (ER and PR) were obtained from the immunohistochemical reports at the hospital's pathology laboratory, while immunohistochemistry was performed to test for the presence of the HER2 marker. The variables used represent hormone receptor and HER2 protein expression, which were classified as positive or negative.

Histopathology

Paraffin-embedded blocks containing tumor tissue were selected and sequential 4- μ m sections were cut in a conventional microtome. Two histological sections were made from each tumor block. The histological sections were mounted on silane-coated glass slides (3-aminopropyltriethoxysilane). One of the slides was stained with hematoxylin-eosin and a

histological review of the histological grade and type was performed by two trained pathologists. The other slide was used to evaluate HER2 protein expression.

Immunohistochemical study

The immunohistochemical method used to determine HER2 protein expression was the streptavidin-biotin-peroxidase method (44). Antigen recovery was performed in citrate buffer, pH 6.0. Following incubation with anti-c-ErbB-2 antibody (clone SP3, 1:100 dilution, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), immunodetection was achieved using the biotinylated secondary antibody (LSAB, K0690, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA) followed by the streptavidin-biotin-peroxidase complex (K0690, Dako). The diaminobenzidine (DAB) chromogen (Dako EnVision kit, K3466, Carpinteria, CA, USA) was used. Next, the slides were stained with Harris hematoxylin. Breast carcinoma tissue with strongly positive HER2 protein expression was used as a control.

Criteria for immunohistochemistry interpretation

In evaluating HER2 protein expression, the staining criteria defined by the American Society of Clinical Oncology and the College of American Pathologists were applied, with samples being scored as 0, 1+, 2+ or 3+. A score of 0 or 1+ corresponds to negative findings, a score of 2 reflects equivocal results and a score of 3+ reflects positive expression (21).

Immunohistochemical criteria for the classification of the subtypes

The subtypes were classified according to the following immunohistochemical markers: ER, PR and HER2. The classification used in the present study was based on the panel used by Nielsen et al. and Carey et al. (3,4). The *luminal A subtype* was defined as ER+ and/or PR+

and HER2-, the *luminal B subtype* as ER+ and/or PR+ and HER2+, the *HER2+ subtype* as ER- and/or PR- and HER2+, and the triple-negative subtype as ER- and/or PR- and HER2-.

Statistical analysis

A database was created using the Epi-Info software program, version 6.03. The qualitative variables were described using simple and relative frequencies, while the quantitative variables were expressed as measures of central tendency and dispersion. In this cross-sectional study, prevalence ratios were used as a measure of the association between the variables characterized as endpoints, represented by the subtypes that have the poorest prognosis (HER2+ and triple-negative) and the clinical and pathological variables, characterized as exposure factors or associated factors. The 95% confidence intervals were calculated and results were considered statistically significant when p-values were ≤ 0.05 .

Ethics

The protocol of the present study was approved by the internal review board of the Aristides Maltez Hospital under protocol number 262/10.

Results

Overall, 112 tumors (65.5%) were found to be of the luminal A subtype, 14 (8.2%) of the luminal B subtype, 6 (3.5%) of the HER2+ subtype and 39 (22.8%) of the triple-negative subtype. The majority of the patients (85.9%) were over 40 years of age, with this proportion being even higher (92.3%) in the subgroup of women with triple-negative tumors, in which 69.2% were menopausal. In the group of young patients, the HER2+ subtype was the most prevalent (33.3%). The HER2+ and the luminal B subgroups had more cases with distant

metastases (33.3% and 28.6%, respectively). Stage IIA tumors were the most common in the patients in this study (23.4%) and this was true for all the subtypes (Table 1).

With respect to the pathological characteristics, histological grade III was the most common grade in the triple-negative and HER2+ tumor subtypes (59.0 and 83.3%, respectively). Larger tumors (*p*T3) were mostly of the triple-negative subtype (41.0%). In the triple-negative tumors, the most common histological special type was metaplastic carcinoma, accounting for 7.6% of cases. Of the histological types, invasive ductal carcinoma was the most prevalent, with higher percentages being found in the HER2+ and luminal B subtypes (100% and 92.9%, respectively). The highest rate of axillary lymph node involvement was found in patients with HER2+ and luminal B subtype tumors (83.3% and 71.4%, respectively). Following mastectomy, the most common treatment given to the patients with triple-negative tumors consisted of a combination of radiotherapy and chemotherapy, accounting for 33.4% of all cases (Table 2).

The associations of the clinical and pathological characteristics with the triple-negative subtype and the two luminal/HER2+ subtypes grouped together are shown in Tables 3 and 4. Statistically significant associations were found between the triple-negative subtype, histological grade and tumor size. The triple-negative subtype was found more frequently in histological grade III tumors (PR = 2.29; 95%CI: 0.17 – 1.53) compared to those of histological grades I/II and also in cases of larger (*p*T3) tumors compared to *p*T1/*p*T2 tumors (PR = 2.28; 95%CI: 1.34 – 3.87). With respect to the remaining clinical and pathological characteristics, varying prevalence ratios were found in relation to the clinical characteristics; however, these findings were not statistically significant.

The associations between the clinical and pathological characteristics and tumor subtypes (comparing the poorest prognosis triple-negative/HER2+ subtypes with the two luminal subtypes) are shown in Tables 5 and 6. Note the statistically significant associations between the subtypes with poor prognosis, histological grade and tumor size. These subtypes of poor prognosis were more prevalent in tumors of histological grade III (PR = 2.62; 95%CI: 1.56 – 4.40) compared to those of histological grade I/II and also in the larger tumors (*p*T3) compared to *p*T1/*p*T2 tumors (PR = 1.81; 95%CI: 1.10 – 2.97). When the *p*T3 and *p*T2 tumors were grouped together, the subtypes of poorer prognosis were more prevalent in this group (PR = 2.29; 95%CI: 0.97 – 5.39). Varying prevalence ratios were found with respect to the clinical and pathological characteristics; however, none were statistically significant.

Discussion

In the molecular and immunohistochemical classification of the subtypes of breast carcinomas, the majority of studies have reported a high rate of the luminal A subtype, while the triple-negative subtype is less common. Nevertheless, the majority of studies on the clinical and pathological characterization of subtypes have focused on the triple-negative and HER2+ subtypes, considered to reflect poor prognosis. With respect to the luminal A subtype, the rate found in the present study is similar to that reported in the literature (1-6,15,22). Regarding the triple-negative subtype, a rate of 22.8% was found, which is higher than that reported from other studies conducted both in Brazil and in other countries, where rates ranged from 6 to 16% (4,17,23). However, in the Brazilian state of Minas Gerais, similar or even higher rates have been reported (12,16). Dutra et al. (12), found a higher rate of the triple-negative subtype in the younger patients and a lower rate in menopausal patients.

This high rate of the triple-negative subtype in the current study population may be due to ethnic factors. The population in this study consists of women from various regions of the state of Bahia, most of whom were of African descent. In a study conducted in breast cancer patients in Bahia, a higher rate of the triple-negative subtype was found in a group of patients of African descent compared to a group of white patients (24). The association between this subtype and being of African descent has also been reported in other regions of the world (25,26).

In the present population, the patients with the triple-negative subtype were over 40 years of age and most were menopausal. On the other hand, in the group of patients of 40 years of age or less, the HER2+ subtype was the most common. Studies in the literature have established associations between the triple-negative and HER2+ subtypes and younger, premenopausal patients (7,9,10,22). Nevertheless, it is interesting to note that in some of those studies on triple-negative tumors, the patients who were considered young were actually over 40 years of age, which would include the patients in this study population.

In another study conducted with Chinese patients, no association was found between the triple-negative subtype and being under 40 years of age (11). In that same study and in another involving Japanese patients, the triple-negative subtype was found to be more prevalent in the post-menopause, a finding that is in line with the results of the present study (14). In agreement with previous findings, there were more menopausal than premenopausal women in the group of patients with luminal subtypes (5-7,22,28).

Most of the patients in the study had no family history of breast cancer and this was the case for all the subtype groups, confirming the higher prevalence of sporadic tumors in the general

population (29). These findings emphasize the usefulness of reviewing clinical and epidemiological data, which may contribute towards achieving a more individualized identification of the study population, positively affecting prevention and screening policies and resulting in more appropriate therapeutic choices.

Of all the subtypes, a higher rate of distant metastases and tumor recurrence was found with the HER2+ subtype, a finding that has also been previously reported (7,13,30). The study conducted by Iwase et al. (30) was comparable to the present study with respect to sample size and the number of patients with the HER2+ subtype. Other studies, however, failed to find high rates of distant metastases or tumor recurrence with this subtype (4-6,10).

In relation to the luminal A and triple-negative subtypes, the rates of distant metastases and tumor recurrence were not expressive. Insofar as the luminal A subtype is concerned, these findings are in agreement with data in the literature (7,8); however, some studies have shown a higher frequency of these two endpoints with the triple-negative subtype (9,31-33). These findings may reflect characteristics inherent to the study population, with low rates of distant metastases and tumor recurrence. A low rate of tumor recurrence was also reported in a previous study conducted with a population of axillary node-negative breast cancer patients receiving care at this same hospital (27).

With respect to other factors associated with poor prognosis, this study showed that in the group of *pT3* tumors, the triple-negative subtype was the most common. In the histological grade III tumors, the triple-negative was the most frequent subtype together with the HER2+ subtype. The HER2+ subtype was more common in patients with positive axillary lymph

node status (83.3%). These findings are in agreement with the majority of reports in the literature (9-11,31,32,34).

In addition to the larger tumors and those with a higher histological grade, the percentage of patients with the triple-negative subtype who were axillary node-positive was high (59.1%). In the study conducted by Dent et al. (10) and in that by Albergaria et al. (35), the frequency of axillary lymph node metastasis in the triple-negative subtype was similar to that found in the present study, 54% and 51.4%, respectively. These findings are in agreement with studies showing that axillary lymph node status and tumor size are factors that determine prognosis in the triple-negative subtype (10,31,35).

Considering all the subtypes in this study, invasive ductal carcinomas were the most common histological type. Various studies on breast cancer subtypes have reported a range of rates for this histological type (4,8,14,37,38). In the present study, all the tumors of the HER2+ subtype were found to be of the invasive ductal type, a finding that is in agreement with Spitale et al. (8). In a study carried out with Brazilian women, Cintra et al. also described invasive ductal carcinomas as the most common histological type, with the invasive lobular type being the second most common (16).

However, in contrast to the findings of Cintra et al. (16), in the present study, metaplastic carcinomas and apocrine carcinomas were the most common of the special types, being more prevalent in the triple-negative and luminal B subtypes, respectively. This frequency of the metaplastic type in the group of tumors of the triple-negative subtype is similar to that reported in other studies in the literature (5,38,39). Nevertheless, a greater number of tumors with histological special types would be required to permit an adequate evaluation to be made

of their association with prognosis. Some gene expression studies have shown the luminal B subtype to be indicative of poorer prognosis compared to the luminal A subtype, since there is a high expression of proliferation genes associated with this subtype and Ki-67 expression is consequently high (5,7,8). Therefore, it would be interesting to include this marker in the immunohistochemical panel to evaluate the association between cell proliferation and disease progression.

The pathological factors evaluated may be related to the characteristics of each subtype. Therefore, studies of the association with prevalence ratios were performed between the clinical and pathological characteristics and the subtypes considered indicative of poor prognosis: the triple-negative and HER2+ subtypes. The triple-negative subtype, considered to have the poorest prognosis, was more prevalent in larger (*pT3*) tumors and in poorly differentiated tumors of histological grade III. These significant associations were similar to those found in various other studies in the literature (9,11,27,31,35,37). When the larger tumors (*pT2* and *pT3*) and histological grades II and III were grouped together, prevalence ratios of the triple-negative subtype were found to be high (PR = 1.94 and PR = 3.13, respectively); however, this finding was not statistically significant.

These measures of association appear to show that in this study population tumor size and histological grade constitute prognostic factors that may help determine subtypes indicative of poor prognosis. Tumor size is one of the most significant variables for evaluating prognosis in breast cancer and is directly associated with axillary metastases. In agreement with the findings of Dent et al. and Thike et al., this association with axillary metastases was not found in the present study (10,14). The standardized determination of tumor size, defined in accordance with the pathologic TNM staging system, was used in the present study and

appears to be one of the parameters for identifying the subtypes representative of poor prognosis. However, more recently, Park et al. suggested that this system might be insufficient for the purposes of classifying tumor biology and predicting clinical progression, particularly in the triple-negative subtype (40). Therefore, other specific tumor markers that may reflect biological behavior must be evaluated for this group.

A high histological grade was another factor associated with the triple-negative subtype in this study, significantly associating these tumors with poor prognosis. This finding is in agreement with studies showing that histological grade remains a strong prognostic factor and may reflect the clinical and morphological characteristics of tumors, being as important from a prognostic point of view as axillary lymph node metastasis (41,45).

In relation to clinical and pathological variables such as clinical staging, a positive family history of breast cancer and histological special types, the prevalence ratios found for the triple-negative subtype of tumors were considerable, albeit without statistical significance. A prevalence ratio of 1.26 was found for the triple-negative subtype in relation to a family history of breast cancer. Some studies have reported an association between the BRCA1 mutation and the triple-negative subtype (3,42). A study conducted in a population from the Brazilian state of Bahia reported the presence of one of the BRCA1 mutations (43). Therefore, in the tumor samples from this study population, the use of diagnostic methods to characterize BRCA1 mutations could complement the morphological and molecular characterization of these patients.

Other measures of association were tested in which the triple-negative and HER2+ subtypes were considered as being indicative of poor prognosis. A significant association was also

found between these two subtypes and histological grade III and tumor size $pT3$, which are histopathological factors associated with poor prognosis. In the present study, these subtypes were also associated with factors indicative of poor prognosis such as axillary metastases and higher clinical stages (III and IV), which may give further strength to this association. In addition, in the multivariate analysis performed in this population (data as yet unpublished), it was found that the risk of death was higher for the HER2+ subtypes compared to the luminal subtypes, a finding that has also been reported in the literature (7,8).

In this study population, some findings merit particular mention such as the higher frequency of triple-negative tumors compared to data reported from other studies conducted both in Brazil and abroad, as well as the lower rate of distant metastases and tumor recurrence. Furthermore, a significant association was found between the triple-negative and HER2+ subtypes and larger tumors and higher histological grades.

It should be emphasized that these factors continue to be considered determinants of prognosis. Furthermore, they are accessible and well established in routine histopathology. The combination of clinical/morphological factors and immunohistochemical markers, consisting of hormone receptor and HER2 protein expression, permits the immunophenotypic profile of tumors to be consistently defined. In addition, it is possible to establish the association of histopathological factors with the subtypes considered indicative of poor prognosis, i.e. the HER2+ and triple-negative subtypes.

References

1. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-52.
2. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:8418-23.
3. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004;10:5367-74.
4. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA* 2006;295:2492-502.
5. Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B, et al. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2007;16:439-43.
6. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res* 2008;14:1368-76.
7. Nguyen PL, Taghian AG, Katz MS, Niemierko A, Abi Raad RF, Boon WL, et al. Breast cancer subtype approximated by estrogen receptor, progesterone receptor, and HER-2 is associated with local and distant recurrence after breast-conserving therapy. *J Clin Oncol* 2008;26:2373-8.
8. Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features

- and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol* 2009;20:628-35.
9. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California Cancer Registry. *Cancer* 2007;109:1721-8.
 10. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res* 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
 11. Tischkowitz M, Brunet JS, Bégin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 2007;7:134.
 12. Dutra MC, Rezende MA, de Andrade VP, Soares FA, Ribeiro MV, de Paula EC, et al. [Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very young and postmenopausal women]. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009;31:54-60.
 13. Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol* 2006;37:1217-26.
 14. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol* 2010;23:123-33.
 15. Moriya T, Kanomata N, Kozuka Y, Hirakawa H, Kimijima I, Kimura M, et al. Molecular morphological approach to the pathological study of development and advancement of human breast cancer. *Med Mol Morphol* 2010;43:67-73.

16. Cintra JR, Teixeira MT, Diniz RW, Gonçalves Junior H, Florentino TM, Freitas GF, et al. Immunohistochemical profile and clinical-pathological variables in breast cancer. *Rev Assoc Med Bras* 2012;58:178-87.
17. De Brot M, Soares FA, Stiepcich MM, Cúrcio VS, Gobbi H. [Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome]. *Rev Assoc Med Bras* 2009;55:529-34.
18. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. American Joint Committee on Cancer: AJCC cancer staging manual. 7th edition. New York: Springer, 2010.
19. Robbins P, Pinder S, de Klerk N, Dawkins H, Harvey J, Sterrett G, et al. Histological grading of breast carcinomas: a study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 1995;26:873-9.
20. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000;124:966-78.
21. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al; American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists. 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* 2007;131:18-43.
22. Del Casar JM, Martín A, García C, Corte MD, Alvarez A, Junquera S, et al. Characterization of breast cancer subtypes by quantitative assessment of biological parameters: relationship with clinicopathological characteristics, biological features and prognosis. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol* 2008;141:147-52.
23. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship

- between subtype and short and long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med* 2010;7:e1000279.
24. Corrêa PB, Toralles MB, Abe-Sandes K, Machado TM, Bonfim TF, Meyer L, et al. [Triple-negative breast cancer and its association with African descent]. *Revista Ciências Médicas e Biológicas* 2010;9(Supl. 1):3-7.
 25. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer* 2007;110:876-84.
 26. Stead LA, Lash TL, Sobieraj JE, Chi DD, Westrup JL, Charlot M, et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast Cancer Res* 2009;11:R18.
 27. Ramos Filho AO, Castro TW, Rêgo MA, Alves FO, Almeida LC, Sousa MV, et al. [Predictive factors for recurrence in axillary node-negative breast carcinoma]. *Revista Brasileira de Cancerologia* 2002;48(4):499-503.
 28. Yang XR, Chang-Claude J, Goode EL, Couch FJ, Nevanlinna H, Milne RL, et al. Associations of breast cancer risk factors with tumor subtypes: a pooled analysis from the Breast Cancer Association Consortium studies. *J Natl Cancer Inst* 2011;103:250-63.
 29. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease. *Lancet* 2001;358:1389-99.
 30. Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ohta T, Kurosumi M, Miyamoto K, et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data

- from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer* 2010;17:118-24.
31. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007;109:25-32.
 32. Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2009;9 Suppl 2:S73-81.
 33. Desmedt C, Haibe-Kains B, Wirapati P, Buyse M, Larsimont D, Bontempi G, et al. Biological processes associated with breast cancer clinical outcome depend on the molecular subtypes. *Clin Cancer Res* 2008;14:5158-65.
 34. Zaha DC, Lazăr E, Lăzureanu C. Clinicopathologic features and five years survival analysis in molecular subtypes of breast cancer. *Rom J Morphol Embryol* 2010;51:85-9.
 35. Albergaria A, Ricardo S, Milanezi F, Carneiro V, Amendoeira I, Vieira D, et al. Nottingham Prognostic Index in triple-negative breast cancer: a reliable prognostic tool? *BMC Cancer* 2011;11:299.
 36. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006;49:22-34.
 37. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19:264-71.
 38. Webster LR, Lee SF, Ringland C, Morey AL, Hanby AM, Morgan G, et al. Poor-prognosis estrogen receptor-positive breast cancer identified by histopathologic subclassification. *Clin Cancer Res* 2008;14:6625-33.

39. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol* 2008;216:141-50.
40. Park YH, Lee SJ, Cho EY, Choi YL, Lee JE, Nam SJ, et al. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. *Ann Oncol* 2011;22:1554-60.
41. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology* 1991;19:403-10.
42. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003;95:1482-5.
43. Abe-Sandes C, Abe-Sandes K, Machado TMB, Toralles MBP, Nascimento LM, Romeo M, et al. Mutações nos genes BRCA em pacientes com câncer de mama e ovários hereditários da Bahia. Águas de Lindóia, SP: Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética, 2009.
44. Naish SJ, Boenisch T, Farmilo AJ, Stead RH (editors). *Handbook: immunochemical staining methods*. Carpinteria, CA: Dako Corp., 1989.
45. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, et al. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res* 2010;12:207.

Table 1: The clinical characteristics of the patients according to the subtypes of invasive carcinoma

Clinical characteristics	Subtypes			
	Luminal A n (%)	Luminal B n (%)	HER2+ n (%)	Triple-negative n (%)
	112 (65.5)	14 (8.2)	6 (3.5)	39 (22.8)
Age (years)				
≤ 40	17 (15.2)	2 (14.3)	2 (33.3)	3 (7.7)
> 40	95 (84.8)	12 (85.7)	4 (66.7)	36 (92.3)
Parity				
Data missing	3 (2.7)	3 (21.4)	0 (0.0)	1 (2.6)
≥ 1	88 (78.6)	10 (71.4)	6 (100)	33 (84.6)
0	21 (18.8)	1 (7.1)	0 (0.0)	5 (12.8)
Menopausal status				
Data missing	6 (5.4)	2 (14.3)	1 (16.7)	1 (2.6)
Menopausal	68 (60.7)	8 (57.1)	3 (50.0)	27 (69.2)
Premenopausal	38 (33.9)	4 (28.6)	2 (33.3)	11 (28.2)
Family history				
Data missing	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Yes	16 (14.3)	4 (28.6)	0 (0.0)	7 (17.9)
No	96 (85.7)	10 (71.4)	6 (100)	32 (82.1)
Distant metastasis				
Yes	24 (24.1)	4 (28.6)	2 (33.3)	7 (17.9)
No	88 (78.6)	10 (71.4)	4 (66.7)	32 (82.1)
Recurrence				

Yes	7 (6.3)	1 (7.1)	1 (16.7)	3 (7.7)
No	105 (93.8)	13 (92.9)	5 (83.3)	36 (92.3)
<i>Clinical staging</i>				
Data missing	23 (20.6)	2 (14.3)	1 (16.7)	9 (23.1)
I	17 (15.2)	4 (28.6)	1 (16.7)	1 (2.6)
IIA	27 (24.1)	3 (21.4)	2 (33.3)	8 (20.5)
IIB	25 (22.3)	1 (7.1)	0 (0.0)	5 (12.8)
IIIA	8 (7.1)	2 (14.3)	2 (33.3)	8 (20.5)
IIIB	12 (10.7)	2 (14.3)	0 (0.0)	6 (15.4)
IV	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (5.1)

Table 2: Pathological characteristics and treatment according to the subtypes of invasive breast carcinoma

Pathological characteristics	Subtypes			
	Luminal A	Luminal B	HER2+	Triple-negative
	n (%)	n (%)	n (%)	n (%)
	112 (65.5)	14 (8.2)	6 (3.5)	39 (22.8)
Grade				
I	12 (10.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
II	69 (61.6)	7 (50)	1 (16.7)	16 (41)
III	31 (27.7)	7 (50)	5 (83.3)	23 (59)
Size				
pT1	29 (25.9)	4 (28.6)	0 (0.0)	5 (12.8)
pT2	61 (54.5)	8 (57.1)	6 (100)	18 (46.2)
pT3	22 (19.6)	2 (14.3)	0 (0.0)	16 (41.0)
Histological type				
Invasive ductal (NOS) *	101 (90.2)	13 (92.9)	6 (100)	33 (84.6)
Invasive lobular	4 (3.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Metaplastic	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (7.6)
Papilliferous	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.6)
Mucinous	3 (2.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Apocrine	3 (2.7)	1 (7.1)	0 (0.0)	1 (2.6)
Adenoid cystic	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.6)
Axillary status				
Data missing	3 (2.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (7.6)
Positive	60 (53.6)	10 (71.4)	5 (83.3)	23 (59.1)

Negative	49 (43.8)	4 (28.6)	1 (16.7)	13 (33.3)
<i>Surgical margins</i>				
Data missing	2 (1.8)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)
Positive	12 (10.7)	2 (14.3)	0 (0.0)	4 (10.3)
Negative	98 (87.5)	12 (85.7)	6 (100)	35 (89.7)
<i>Most common treatment</i>				
Data missing	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (20.5)
Hormone therapy	8 (7.1)	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (2.6)
Chemotherapy	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (7.4)	2 (5.1)
Radiotherapy	2 (1.8)	2 (14.3)	0 (0.0)	1 (2.6)
Radio + chemo + hormone therapy	42 (37.5)	6 (42.9)	0 (0.0)	4 (10.3)
Radio + chemo	19 (17.0)	2 (14.3)	6 (100)	15 (33.4)
Radio + hormone	28 (25)	3 (21.4)	0 (0.0)	7 (17.9)
Chemo + hormone	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (7.6)

* NOS: Not otherwise specified

Table 3: Associations between the clinical characteristics and the subtypes of invasive breast cancer

Clinical Characteristics	Triple-negative	Luminal/ HER2+	PR (95%CI)	p-value
<i>Age (years)</i>				
≤ 40	3	21		
> 40	36	111	0.51 (0.17 – 1.53)	0.30
<i>Parity</i>				
0	6	28		
≥ 1	33	104	0.73 (0.33 – 1.61)	0.42
<i>Menopausal status</i>				
Menopausal	27	79		
Premenopausal	11	44	1.27 (0.68 – 2.37)	0.43
<i>Family history</i>				
Yes	7	18		
No	32	112	1.26 (0.63 – 2.53)	0.52
<i>Distant metastasis</i>				
Yes	7	30		
No	32	102	0.78 (0.37 – 1.61)	0.52
<i>Recurrence</i>				
Yes	3	9		
No	35	117	1.090 (0.39 – 3.02)	0.84
<i>Clinical staging</i>				
III + IV	19	52	1.87 (0.91 – 3.84)	0.07
I + II	9	54		

Table 4: Associations between pathological characteristics and the subtypes of invasive breast carcinoma

Pathological Characteristics	Triple- negative	Luminal/ HER2+	PR (95%CI)	p-value
<i>Grades</i>				
III	23	43		
I + II	16	89	2.29 (0.17 – 1.53)	0.005*
<i>Grades</i>				
III + II	38	120		
I	1	12	3.13 (0.47 – 20.97)	0.31
<i>Tumor Size</i>				
pT3	16	24		
pT1 + pT2	23	108	2.28 (1.34 – 3.87)	0.006*
<i>Tumor Size</i>				
pT3 + pT2	34	99		
pT1	5	33	1.94 (0.82 – 4.62)	0.16
<i>Histological Types</i>				
Invasive ductal (NOS) [‡]	33	120		
Special	6	12	0.65 (0.32 – 1.33)	0.26
<i>Histological Types</i>				
Special	6	12		
Invasive ductal (NOS)	33	120	1.55 (0.75 – 3.17)	0.26
<i>Axillary lymph node status</i>				
Positive	23	75		
Negative	13	54	1.21 (0.66 – 2.21)	0.53

*Involvement of surgical**margins*

Positive	4	14		
Negative	35	116	0.96 (0.39 – 2.39)	0.84

[‡] NOS: Not otherwise specified

Table 5: Associations between the clinical characteristics and the two subtypes of invasive breast cancer indicative of the poorest prognosis

Clinical Characteristics	Triple-negative + HER2+	Luminal subtypes	PR (95% CI)	p-value
<i>Age (years)</i>				
≤ 40	5	19		
> 40	40	107	0.77 (0.34 – 1.74)	0.68
<i>Parity</i>				
0	6	28		
≥ 1	39	98	0.62 (0.29 – 1.34)	0.20
<i>Menopausal status</i>				
Menopausal	30	76	1.20 (0.68 – 2.10)	0.53
Premenopausal	13	42		
<i>Family history</i>				
Yes	7	20		
No	38	106	0.98 (0.49 – 1.97)	0.96
<i>Distant metastasis</i>				
Yes	9	28	0.91 (0.48 – 1.71)	0.76
No	36	98		
<i>Recurrence</i>				
Yes	4	8	1.29 (0.56 – 3.00)	0.82
No	41	118		
<i>Clinical staging</i>				
III + IV	21	50		
I + II	12	51	1.55 (0.83 – 2.89)	0.16

Table 6: Associations of the pathological characteristics and the two invasive breast carcinoma subtypes indicative of the poorest prognosis

Pathological Characteristics	Triple- negative + HER2+	Luminal subtypes	PR (95% CI)	p-value
<i>Tumor grade</i>				
III	28	38		
I and II	17	88	2.62 (1.56 – 4.40)	0.0001*
<i>Tumor grade</i>				
III and II	44	114		
I	1	12	3.62 (0.54 – 24.20)	0.21
<i>Tumor size</i>				
pT3	16	24		
pT2 and pT1	29	102	1.81 (1.10 – 2.97)	0.04*
<i>Tumor size</i>				
pT3 and pT2	40	93		
pT1	5	33	2.29 (0.97 – 5.39)	0.04*
<i>Histological type</i>				
Invasive ductal (NOS) [‡]	39	114		
Special	6	12	0.76 (0.38 – 1.55)	0.47
<i>Histological type</i>				
Special	6	12		
Invasive ductal (NOS)	39	114	1.31 (0.64 – 2.65)	0.47
<i>Axillary status</i>				
Positive	28	70		

Negative	14	53	1.37 (0.78 – 2.40)	0.35
<i>Involvement of margins</i>				
Positive	4	14		
Negative	41	110	0.82 (0.33 – 2.02)	0.87

[‡] NOS: Not otherwise specified

