

IMUNOEXPRESSÃO DA VIA DE SINALIZAÇÃO NOTCH NO CARCINOMA INVASOR DA MAMA E SUA ASSOCIAÇÃO PROGNÓSTICA

HELOISA OLIVEIRA MAGALHÃES BELCHIOR

**Tese apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional (DINTER) em
Oncologia da Fundação Antônio Prudente em
Parceria com Escola Cearense de Oncologia,
para obtenção do título de Doutor em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Victor Piana de Andrade

Co-Orientador: Dr. Marcos Venício Alves Lima

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Belchior, Heloisa Oliveira Magalhães

Imunoexpressão da via de sinalização Notch no carcinoma invasor da mama e sua associação prognóstica / Heloisa Oliveira Magalhães

Belchior – São Paulo; 2017.

137p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia-ECO. Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:Oncologia.

Orientador: Victor Piana de Andrade

Descritores: 1. Neoplasias da mama/Breast Neoplasms 2. Receptores Notch/Receptors, Notch. 3. Proteínas reguladoras de apoptose/Apoptosis Regulatory Proteins 4. Proteínas proto-oncogênicas/Proto-Oncogene 5. Imuno-Histoquímica/ Immunohistochemistry

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, Maria de Fátima de Oliveira e José Vilter Santos
Magalhães, pelo exemplo.*

Ao meu marido, Delano Botelho Belchior, pelo apoio.

À minha pequena, porém infinita, Beatrice Magalhães Belchior.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelos momentos em que houve apenas um par de pegadas
na areia.

AGRADECIMENTOS

Ao Doutor Victor Piana de Andrade, pela orientação e contribuição científica primorosa, com apoio fundamental diante de dificuldades.

Ao Professor Doutor Marcos Venício Alves Lima, coorientador, pelos diálogos, ensinamentos, compreensão e motivação ao longo desta caminhada, edificando o meu amadurecimento científico.

Ao Professor Doutor Ronaldo Ribeiro (*in memoriam*) pelas motivantes aulas, pelas discussões calorosas e entusiastas.

À Doutora Maria do Perpétuo Socorro Saldanha da Cunha, patologista, pelo apoio e revisão de todos os casos incluídos do Instituto do Câncer do Ceará.

À Doutora Monique Batista da Costa Lemos, patologista, pelo esforço fundamental na leitura dos resultados no A.C. Camargo Cancer Center.

Ao Professor Doutor Paulo Goberlânio, pelo profundo conhecimento bioestatístico, compartilhado durante a elaboração dos resultados.

À equipe do Laboratório de Biologia Molecular do Hospital Haroldo Juaçaba, especialmente à Professora Doutora Isabelle Joyce de Lima Silva e à Professora Doutora Deysi Viana Tenazoa Wong.

Ao Laboratório de Patologia do Hospital Haroldo Juaçaba, em especial aos funcionários Ítalo e Nilson, pelo apoio no processo de seleção dos blocos da amostra.

A Carlos Ferreira do Nascimento, do A.C. Camargo Cancer Center, pela excelência técnica na confecção dos blocos de *tissue microarray*.

A José Ivanildo Neves, do Laboratório de Patologia do A.C. Camargo Cancer Center, pela contribuição nas reações de imuno-histoquímica.

A Marina França de Resende, do Laboratório de Patologia Investigativa do A.C. Camargo Cancer Center, pela confecção de lâminas com os receptores Notch.

A Maryane Caroline, pela fundamental assistência para submissão do projeto ao CEP do A.C. Camargo Cancer Center.

Aos alunos de iniciação científica: Amanda Ricarte, Anderson Jorge, Camila Sampaio, pelo auxílio na revisão de prontuários e manejo de material histológico.

À Escola Cearense de Oncologia, especialmente ao Professor Doutor Manfredo Luiz Lins e Silva, superintendente executivo, à Luciana Silva da Costa, coordenadora acadêmica, e Priscila Bernardo, secretária executiva, pelo apoio em todo o processo.

Ao Professor Doutor Marcelo Gurgel, pelas aulas e auxílio na apresentação da defesa.

À Universidade Unichristus, pelo financiamento primordial na execução do projeto.

À FUNCAP, pelo financiamento ao programa de pós-graduação interinstitucional.

Ao A.C. Camargo Cancer Center, pelo pioneirismo científico e contribuição na formação de novos centros de pesquisa.

Ao Instituto do Câncer do Ceará, pela iniciativa de formar novos doutores e mestres em nossa região, onde o acesso à pós-graduação é restrito.

Aos meus amados pais, Vilter e Fátima, pelos esforços na minha formação, pelos lindos exemplos, e por todo amor.

Ao meu esposo, maior companheiro, Delano, que também abraçou o desafio, compreendendo a ausência e fortalecendo a família.

Às minhas irmãs, motivo de grande alegria e verdadeira amizade em minha vida.

RESUMO

Belchior HOM. **Imunoexpressão da via de sinalização Notch no carcinoma invasor da mama e sua associação prognóstica.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia]

A principal teoria para a carcinogênese e heterogeneidade celular do câncer de mama baseia-se na atividade de células-tronco tumorais, estando a via de sinalização Notch implicada no controle desta população celular. Estudos recentes associam a ativação anômala desta via com a recidiva tumoral e resistência ao tratamento do câncer de mama. O objetivo do presente estudo é avaliar a imunoexpressão dos receptores Notch e proteínas de genes alvo em câncer de mama de estágio inicial, verificando-se a existência de associação desta via com a recidiva tumoral. Trata-se de um estudo caso-controle em carcinomas mamários invasivos de estágios pT1pN0 ou pT2pN0 realizado em dois hospitais de referência em oncologia, nos estados Ceará e São Paulo, cujos diagnósticos tenham ocorrido entre 2001 e 2010. O grupo caso é formado por pacientes acometidas por recidiva tumoral, e o grupo controle, por pacientes sem recidiva. Os receptores Notch 1, 2, 3, 4, e Notch 1 ativado, e as proteínas Bcl-2, ciclina D1, p21 e survivina foram analisados, utilizando-se a técnica de microarranjo tecidual (*tissue microarray*), em conjunto com variáveis clínicas e histológicas clássicas utilizadas para o câncer de mama, além da classificação molecular baseada em imuno-histoquímica. Utilizou-se os testes qui-quadrado e exato de Fisher e, na análise multivariada, regressão logística segundo modelo de Cox, sendo adotado um nível de significância de 5%. Foram estudadas 170 pacientes, sendo 57 pacientes com recidiva e 113 do grupo controle. Na análise univariada, observou-se que pacientes com recidiva apresentaram maior percentual de células tumorais expressando survivina ($p=0,006$) e também

maior intensidade da imunomarcção desta proteína ($p=0,021$). O maior percentual de expresso de Notch 2 esteve inversamente associado à recidiva ($p=0,012$). Na análise multivariada, a intensidade de marção da survivina (OR 1,850; $p=0,023$) e o maior percentual de expresso de survivina (OR 2,290; $p=0,016$) foram fatores independentemente associados à maior taxa de recidiva, enquanto a localizao nuclear da marção de Notch 1 foi um fator protetor (OR 0,631; $p=0,038$). Em concluso, esta análise demonstrou que maior expresso de survivina apresenta-se como fator independente de pior prognóstico no cncer de mama de estágio inicial, enquanto a expresso estritamente nuclear de Notch 1 esteve associada a um melhor prognóstico.

SUMMARY

Belchior HOM. **[Immunoexpression of the notch signaling pathway in invasive breast carcinoma and its prognostic value]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional (DINTER) em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em Parceria com Escola Cearense de Oncologia]

Carcinogenesis and cell heterogeneity in breast cancer is believed to depend on the activity of cancer stem cells, the control of which involves the notch signaling pathway. Recent studies have associated anomalous notch signaling pathway activation with breast cancer recurrence and resistance to treatment. The purpose of this case-control study was to evaluate the immunoexpression of notch receptors and their target gene proteins in early-stage (pT1pN0 or pT2pN0) invasive breast cancer in order to identify possible associations between notch signaling pathway and tumor recurrence. The study was conducted at two Brazilian referral oncology services (Ceará and São Paulo), covering 170 patients diagnosed between 2001 and 2010. The case group (n=57) and control group (n=113) consisted of patients with and without tumor recurrence, respectively. Immunohistochemical TMA analyses were conducted to detect the receptors Notch 1, Notch 2, Notch 3, Notch 4 and activated Notch 1, and the proteins Bcl-2, cyclin D1, p21 and survivin. In addition, molecular classification was done based on immunohistochemistry, and classic clinical and histological breast cancer variables were collected. The findings were submitted to the chi-square test and Fisher's exact test, followed by multivariate analysis with logistic regression using the Cox model. The level of statistical significance was set at 5% ($p < 0.05$). In the univariate analysis, patients with recurrence presented a higher percentage of tumor cells expressing survivin ($p = 0.006$) and stronger immunostaining for this protein ($p = 0.021$). A higher percentage of Notch 2 expression was inversely associated with recurrence ($p = 0.012$). In

the multivariate analysis, stronger immunostaining for survivin (OR 1.850; $p=0.023$) and greater percentage of survivin expression (OR 2.290; $p=0.016$) were independently associated with higher rates of recurrence, whereas the nuclear localization of Notch1 was a protective factor (OR 0.631; $p=0.038$). In conclusion, the immunoexpression of survivin was stronger and Notch 2 expression was weaker in recurring breast tumors. The nuclear localization of Notch 1 was associated with better prognosis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A via de sinalização Notch canônica e os inibidores farmacológicos relevantes em desenvolvimento no câncer.....	16
Figura 2	Demarcação de lâminas e blocos doadores para confecção de <i>Tissue Microarray</i> (TMA).....	36
Figura 3	<i>Tissue microarrayer</i> (Beecher Instruments Micro Array Technology, NJ, EUA).....	38
Figura 4	Bloco de <i>tissue microarray</i> (TMA) construído com duplicata técnica de 1mm de diâmetro, contendo ### de amostras de câncer de mama de pacientes tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center....	39
Figura 5	Imunoexpressão de survivina em carcinoma invasor da mama...	64
Figura 6	Tempo livre de doença conforme o percentual de imunoexpressão de survivina em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center	64
Figura 7	Tempo livre de doença conforme a intensidade da imunomarcção da survivina em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center.....	67
Figura 8	Imunoexpressão de Ciclina D1 em câncer de mama.....	70
Figura 9	Imunoexpressão de Bcl2 em câncer de mama.....	70

Figura 10	Imunoexpressão de p21 em câncer de mama.....	73
Figura 11	Imunoexpressão de receptor Notch 1 em câncer de mama.....	76
Figura 12	Tempo livre de doença conforme a localização celular da imunoexpressão do receptor Notch 1 em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center....	78
Figura 13	Imunoexpressão de receptor Notch 1 ativado em câncer de mama.....	80
Figura 14	Imunoexpressão de receptor Notch 2 em câncer de mama.....	80
Figura 15	Tempo livre de doença conforme o percentual de imunoexpressão de Notch 2 em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center.....	82
Figura 16	Imunoexpressão de receptor Notch 3 em câncer de mama.....	82
Figura 17	Imunoexpressão de receptor Notch 4 em câncer de mama.....	84

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Relação de anticorpos e respectivos clones utilizados, titulação, fabricante e país de origem.....	41
Quadro 2	Sistema de graduação histológica combinada de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (Sistema de Nottingham).....	43
Quadro 3	Subtipos moleculares de câncer de mama classificados por imuno-histoquímica.....	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização da amostra de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva tratadas no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	55
Tabela 2	Tratamento cirúrgico de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticadas no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	56
Tabela 3	Perfil terapêutico sistêmico de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticadas no Hospital Haroldo Juaçaba no período e A.C.Camargo Cancer Center de 2001 a 2010.....	57
Tabela 4	Perfil terapêutico de radioterapia e hormonioterapia de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	59
Tabela 5	Classificação de acordo com o perfil imuno-histoquímico, em correlação à classificação molecular, de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	60
Tabela 6	Imunoexpressão de Survivina em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	62

Tabela 7	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para survivina como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center entre 2001 e 2010.....	63
Tabela 8	Imunoexpressão de Ciclina D1 e Bcl2 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	63
Tabela 9	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para p21 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center entre 2001 e 2010.....	65
Tabela 10	Imunoexpressão de p21 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	66
Tabela 11	Imunoexpressão do receptor Notch 1 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	66
Tabela 12	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 1 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	68

Tabela 13	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 1 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	69
Tabela 14	Imunoexpressão do receptor Notch 1 ativado em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	69
Tabela 15	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 1 ativado como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	71
Tabela 16	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 1 ativado como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	72
Tabela 17	Imunoexpressão do receptor Notch 2 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	72
Tabela 18	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 2 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	74

Tabela 19	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 2 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	75
Tabela 20	Imunoexpressão do receptor Notch 3 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	75
Tabela 21	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 3 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	77
Tabela 22	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 3 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	79
Tabela 23	Imunoexpressão do receptor Notch 4 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	81
Tabela 24	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 4 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	83

Tabela 25	Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 4 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	83
Tabela 26	Modelo de regressão de sobrevida de Cox de pacientes diagnosticados e tratados por carcinoma mamário invasivo no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.....	85

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

a.C.	antes de Cristo
ADAM	Metaloprotease
ALDH	Aldeído desidrogenase
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
Bcl2	Linfoma de células B - 2
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CBF1	Fator ligante ao centrômero -1
CDI	Carcinoma ductal infiltrante
CGA	Campo de grande aumento
Ciclina D1	Quinase reguladora do ciclo celular D1
CISH	Hibridização <i>in situ</i> cromogênica
CKI	Quinase dependente de ciclina
c-myc	Proteína protooncogênica Myc
CONEP	Conselho Nacional de Ética em Pesquisa
CSL	CBF1/Su(H)/Lag-1
CTT	Células-tronco tumorais
DLL	Ligantes tipo Delta (<i>Delta ligands like</i>)
EBCTCG	<i>Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group</i>
ECO	Escola Cearense de Oncologia
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidermal
FAP	Fundação Antônio Prudente
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por imunofluorescência
GLOBOCAN	<i>Global Cancer Statistics Project</i>
HER 2 ou ERBB 2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico
HHJ	Hospital Haroldo Juaçaba
HR	<i>Hazard ratio</i>
IC	Intervalo de confiança
ICC	Instituto do Câncer do Ceará
INCA	Instituto Nacional do Câncer

KDa	Kilodalton
Ki67	Antígeno Ki67
LLA-T	Leucemia linfoblástica aguda de células T
MDA-MB231	Linhagem celular de carcinoma mamário humano RE negativo
mRNA	RNA mensageiro
NF-KB	Fator transcricional nuclear eucariótico Kappa B
NRR	Região regulatória negativa
OR	Razão de possibilidades (<i>odds ratio</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAM 50	Análise de predição de microarranjo de 50 genes
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PCR	<i>Protein Chain Reaction</i>
PEST	Resíduo de Prolina/Ácido Glutâmico/Serina/Treonina),
qT-PCR	PCR quantitativo
RBPJ	<i>Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J</i>
RE OU ER	Receptor de estrógeno
REα	Receptor de estrógeno alfa
REβ	Receptor de estrógeno beta
RP OU PR	Receptor de progesterona
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction</i>
SAME	Serviço de Auxílio Médico Estatístico
SISH	Hibridização <i>in situ</i> por prata
SOE	Sem outras especificações
SPSS	<i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TMA	Microarranjo tecidual (<i>Tissue Microarray</i>)

LISTA DE SÍMBOLOS

® Marca registrada

H₂O₂ Água oxigenada

NaN₃ Azoneto de sódio

TM *Trademark*

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	O Câncer de Mama	1
1.2	Principais Biomarcadores do Câncer de Mama.....	3
1.3	Classificação Molecular do Câncer de Mama.....	6
1.4	A Carcinogênese e as Células-Tronco Tumorais	9
1.5	A Via de Sinalização Notch	13
1.6	Proteínas de Genes Alvo.....	21
2	JUSTIFICATIVA.....	28
3	OBJETIVOS	30
3.1	Objetivo Geral.....	30
3.2	Objetivos Específicos	30
4	PACIENTES E MÉTODOS.....	31
4.1	Natureza do Estudo	31
4.2	Amostra	31
4.3	Crterios de Elegibilidade	32
4.3.1	Crterios de Incluso	32
4.3.2	Crterios de Exclusão.....	32
4.4	Grupos Caso e Controle	33
4.5	Coleta de Dados	33
4.6	Variáveis Estudadas	34
4.6.1	Variáveis Dependentes	34
4.6.2	Variáveis Independentes	34
4.7	Avaliação Histológica do Material.....	35
4.8	Preparo dos Blocos de TMA (<i>Tissue Microarray</i>).....	37
4.9	Preparo das Lâminas para Imuno-histoquímica	39
4.10	Grau Histológico	42

4.11	Biomarcadores	43
4.11.1	Receptores hormonais	43
4.11.2	<i>Status</i> HER2.....	44
4.11.3	Índice proliferativo Ki67	45
4.11.4	Análise das proteínas de genes alvo	46
4.11.5	Receptores Notch	47
4.12	Classificação Molecular	47
4.13	Análise Estatística	49
4.14	Considerações Éticas	50
5	RESULTADOS.....	51
5.1	Amostra	51
5.2	Perfil Clínico-Patológico.....	52
5.3	Evolução e Seguimento.....	53
5.4	Perfil Terapêutico	54
5.5	Perfil Imuno-histoquímico	60
5.6	Receptores Notch	61
5.7	Análise das Proteínas de Genes Alvo	76
5.8	Análise Multivariada	84
6	DISCUSSÃO	86
7	CONCLUSÃO	107
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	108

APÊNDICE

Apêndice Ficha de coleta de dados gerais do paciente

1 INTRODUÇÃO

1.1 O CÂNCER DE MAMA

Desde seu primeiro relato, em um papiro datado de 1600 a.C. (BREASTED 1991), o câncer de mama persiste como grave problema de saúde pública, representando o segundo câncer mais comum no mundo e, de longe, o mais freqüente entre as mulheres, com cerca de 1,67 milhões de novos casos de câncer diagnosticados em 2012 (25% de todos os cânceres), excetuando-se os tumores de pele não-melanoma. É o câncer de maior incidência nas mulheres universalmente, com um número de casos um pouco maior em países menos desenvolvidos. As taxas de incidência variam quase quatro vezes em todas as regiões do mundo, com taxas de 27 a cada 100.000 habitantes, na África Central e Ásia Oriental, a 92, na América do Norte (FERLAY et al. 2015). Estima-se que uma em cada oito mulheres desenvolva câncer de mama ao longo da vida, de acordo com dados norte-americanos, com duplicação da incidência a cada 10 anos de vida, até a menopausa (HOWLADER et al. 2016).

Em relação à sua letalidade, o câncer de mama é considerado um câncer de relativo bom prognóstico, se diagnosticado e tratado precocemente. No entanto, persiste como a quinta causa de morte por câncer globalmente (522.000 mortes em 2012), e número um entre mulheres. Destacando-se em relação a outras regiões, em países

desenvolvidos o câncer de mama é a segunda causa de morte câncer, após câncer de pulmão (FERLAY et al. 2015).

No Brasil, as estimativas apontam que 57.960 novos casos de carcinoma mamário tenham sido diagnosticados em 2016, representando a principal neoplasia incidente entre brasileiras, excetuando-se os tumores de pele não-melanoma, e também a principal causa de morte por câncer entre elas (Ministério da Saúde 2016).

A sobrevida global do câncer de mama é aproximadamente de 89,7% em 5 anos, tendo apresentado aumento em países desenvolvidos (HOWLADER et al. 2016). Quando se trata de tumores localizados na mama, T1 ou T2, sem metástase axilar, a sobrevida após cinco anos é de 98,4% (HOWLADER et al. 2016). Há ainda uma diferença na incidência e mortalidade do câncer de mama considerado raças e etnias. Mulheres afrodescendentes apresentam maior incidência de câncer de mama em idade jovem, abaixo de 35 anos, e ainda maior mortalidade (YEE e POTTER 2009).

Especialistas atribuem a redução da mortalidade do câncer de mama, ocorrida principalmente em centros desenvolvidos, ao avanço das terapias, e também ao rastreamento mamográfico, cujo benefício em mulheres acima de 50 anos é amplamente aceito (TABAR et al. 1985; FLETCHER et al. 1993; HOWLADER et al. 2016).

O subtipo histológico mais comum do câncer de mama é o adenocarcinoma, classificado como carcinoma ductal invasivo sem outras

especificações (SOE), compreendendo cerca de 90% das neoplasias invasivas da mama, seguido pelo lobular e demais subtipos (HODA 2014).

Apesar da nomenclatura histológica simplificada, o carcinoma mamário é uma doença amplamente heterogênea, compreendido hoje como uma coleção de diferentes entidades patológicas que acometem o mesmo sítio anatômico, de distintos fatores de risco, manifestações clínicas, características histológicas e prognósticas (REIS-FILHO e PUSZTAI 2011; WEIGELT et al. 2011).

1.2 PRINCIPAIS BIOMARCADORES DO CÂNCER DE MAMA

Os biomarcadores atualmente representam um papel indispensável no manejo de pacientes com câncer de mama, especialmente na decisão do tipo de terapia sistêmica a ser administrada. Dentre os principais biomarcadores para o câncer de mama, receptores hormonais de estrógeno (RE) ou progesterona (RP) são considerados dos mais importantes (ORVIETO e VIALE 2002). Presente em aproximadamente 75% dos casos de carcinoma mamário, o RE é também o principal fator preditivo de resposta para hormonioterapia (Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group-EBCTCG 2011). A investigação de receptores de estrógeno e progesterona através de técnicas validadas de imuno-histoquímica é hoje fundamental para indicação de terapia sistêmica endócrina.

Há duas formas de receptor de estrógeno, RE α e RE β . Atualmente, apenas a forma RE α tem papel clínico prognóstico e preditivo validado,

sendo os atuais métodos de detecção específicos para RE α . As diferentes isoformas de RP não são distinguíveis pelos atuais métodos imuno-histoquímicos utilizados na rotina clínica (DUFFY et al. 2017).

No câncer de mama em estágio inicial, uma metanálise de dados de 20 estudos clínicos randomizados demonstrou que o tratamento de pacientes com RE positivo durante 5 anos com tamoxifeno reduziu significativamente as chances de recorrência tumoral em 15 anos em 39%, e as chances de mortalidade por câncer de mama em 30% (EBCTCG 2011). Em contraste aos achados na doença RE positiva, o tratamento de pacientes RE negativos com tamoxifeno não apresentou efeitos na recidiva ou mortalidade pelo câncer de mama. Apesar de, nesta metanálise, o RP não ter demonstrado valor preditivo independente ao tamoxifeno, altos níveis de RP, no entanto, foram relatados como independentemente correlacionados com um aumento na probabilidade de resposta ao tamoxifeno, tempo mais longo entre início de tratamento e recidiva, e maior sobrevida global em pacientes com câncer de mama metastático (RAVDIN et al. 1992; ELLEDGE et al. 2000). Atualmente, os inibidores da aromatase são a terapia hormonal de eleição em pacientes pós-menopausa e em pacientes de alto risco, seja em sequência ao tamoxifeno ou substituindo-o (National Comprehensive Cancer Network-NCCN 2017).

O gene do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (*HER2*) encontra-se amplificado em cerca de 15 a 20% dos carcinomas mamários. A amplificação do gene *HER2*, e consequente superexpressão de sua proteína, é um importante marcador de agressividade, e fator preditivo de

resposta à terapia neoadjuvante, adjuvante ou na doença metastática (SLAMON et al. 1987; CHIA et al. 2008; EROGLU et al. 2014). A avaliação do HER2 através de imuno-histoquímica e/ou por técnicas de hibridização *in situ* (FISH, CISH ou SISH) é imprescindível desde o advento do trastuzumabe, terapia alvo desenvolvida para tumores mamários com superexpressão de HER2 (NCCN 2017).

A progressão tumoral é influenciada pela proliferação de células tumorais, que podem ser estimadas pela medida da expressão nuclear do antígeno Ki67, diretamente relacionada ao ciclo celular (SCOTT et al. 1991; McCORMICK et al. 1993). Usualmente, o Ki67 é estimado como uma porcentagem de células tumorais positivamente coradas por imuno-histoquímica. Comparado com outros marcadores de proliferação, a atividade proliferativa do Ki67 é de execução simples e econômica, o que o faz uma promissora ferramenta prognóstica.

Múltiplos estudos, incluindo análises retrospectivas de ensaios clínicos randomizados e metanálises, tem reportado a associação de altos índices de proliferação Ki67 com pior prognóstico em pacientes com câncer de mama (GOLDHIRSCH et al. 2007; DE AZAMBUJA et al. 2007; VIALE et al. 2008; JUNG et al. 2009; YERUSHALMI et al. 2010; PETRELLI et al. 2015).

Em um dos maiores estudos, PETRELLI et al. (2015) realizou uma revisão sistemática da literatura seguida por metanálise, identificando pior sobrevida global para pacientes com valores de Ki67 acima de 25%. A associação consistente entre elevado Ki67 e pior sobrevida global no câncer de mama foi evidenciada apesar dos precários relatos da técnica utilizada

entre os diferentes laboratórios envolvidos no estudo, utilização de diferentes métodos para medida do Ki67 e aplicação de diferentes valores de corte para identificar tumores com valores baixos ou altos de Ki67. Sua utilização para tomada de decisões terapêuticas tem sido desencorajada por tais divergências. No entanto, em contraste com a precária precisão dos valores intermediários de Ki67, um estudo multicêntrico do *International Ki67 Working Group* (LEUNG et al. 2016) concluiu que uma boa concordância interlaboratorial foi atingida utilizando amostras de tumores de mama por *core biopsy* com escores abaixo ou acima dos valores caracterizados como intermediários (inferior a 10% e superior a 20%).

Além do papel prognóstico, o Ki67 também tem sido investigado a respeito do seu potencial valor preditivo de resposta, principalmente no campo da terapia sistêmica neoadjuvante, tanto na quimioterapia, quanto na hormonioterapia neoadjuvante (DENKERT et al. 2015; LEUNG et al. 2016).

1.3 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

Há cerca de uma década, as decisões terapêuticas em relação ao câncer de mama eram baseadas somente em fatores prognósticos clássicos clínico-patológicos, como idade da paciente, tamanho do tumor, grau histológico, *status* linfonodal e os principais biomarcadores (receptores hormonais e *status* HER2). No entanto, considerando a ausência de uma análise preditiva mais precisa de resposta à quimioterapia destes

marcadores, observava-se um notório hipertratamento (*overtreatment*) das pacientes.

Ao longo das duas últimas décadas, estudos de expressão gênica baseados em microarranjos trouxeram à tona, na pesquisa clínica e na prática, o fato que o câncer de mama é na verdade uma doença amplamente heterogênea, comportando-se como um grupo de doenças distintas que apresentam características moleculares diferenciadas. PEROU et al. (2000) identificou inicialmente quatro subtipos intrínsecos de carcinomas mamários invasivos: basal, HER2, luminal e normal, cada um com padrões distintos de expressão gênica. Estudos subsequentes levaram a uma sub-estratificação dos carcinomas luminais entre grupos A e B, e demonstraram que este sistema de classificação é de importante significado prognóstico (HU et al. 2006; SORLIE et al. 2001 e 2003). Além disso, estudos adicionais de classificação, utilizando maiores bancos de dados, resultaram na identificação de outros subtipos como o grupo rico em interferon, *claudin-low*, e o subtipo molecular apócrino entre vários outros (HU et al. 2006; HERSCHKOWITZ et al. 2007; PARKER et al. 2009; PRAT et al. 2010; FARMER et al. 2005; DOANE et al. 2006; REIS-FILHO e PUSZTAI 2011; CURTIS et al. 2012).

As ferramentas de análise multigênica atualmente disponíveis para avaliação do câncer de mama inicial incluem: Oncotype DX Breast Recurrence Score Assay (Genomic Health, Inc., Redwood City, EUA), MammaPrint® (Agendia BV, Amsterdã, Holanda), Prosigna® (PAM50; NanoString Technologies Inc, Seattle, EUA), e EndoPredict® (Myriad

Genetics Inc, Salt Lake City, EUA). Importantes entidades internacionais como *American Society of Clinical Oncology*, *St. Gallen* e *National Comprehensive Cancer Network* têm aceitado a utilização cada vez mais ampla destas ferramentas na decisão quanto à quimioterapia adjuvante. Recentemente, a *American Joint Committee on Cancer* incluiu na oitava edição do estadiamento do câncer de mama, o Oncotype DX (GIULIANO et al. 2017).

O alto custo, a complexidade e disponibilidade restrita para avaliação do perfil de expressão gênica ainda limitam o seu uso na prática clínica. É frequente, em locais onde não há acesso aos testes genéticos, a utilização de parâmetros de imuno-histoquímica para identificar os diferentes subtipos moleculares de câncer de mama, devido às similaridades com os subtipos moleculares identificados pelo perfil de expressão gênica. Em 2011, os principais subtipos moleculares (luminal A, luminal B, HER2 e basal) foram incluídos no *St. Gallen International Expert Consensus*, e uma classificação baseada em fenótipo imuno-histoquímico foi sugerida na impossibilidade de acesso aos testes genéticos (GOLDHIRSCH et al. 2011).

Carcinomas mamários do tipo luminal são caracterizados pela expressão de genes associados ao RE (PEROU et al. 2000) e podem ser subestratificados em pelo menos dois grupos baseado nos níveis de expressão de genes relacionados com a proliferação, incluindo *MKI67*, o transcriptor do marcador de proliferação Ki67. De acordo com o consenso de *Saint Gallen* (GNANT et al. 2015), tumores luminais A apresentam imunoexpressão de RE, RP acima de 20% e Ki67 abaixo de 20%. O valor do

ponto de corte de ki67 entre 20 e 29% para diferenciação entre luminal A e B ainda não foi definido adequadamente na literatura.

Apesar da classificação molecular original, através do perfil de expressão gênica, apresentar uma ótima correlação do subtipo tumoral HER2 com a classificação através da imuno-histoquímica e hibridização *in situ* (ISH), na última versão da classificação, a concordância entre os dois subtipos foi mais limitada. Entre 31% e 50% de casos com positividade para HER2 definida pela imuno-histoquímica e/ou ISH são classificados como subtipos intrínsecos não HER2 (PARKER et al. 2009, PRAT et al. 2010; DE RONDE et al. 2010).

A maioria dos carcinomas mamários basais (80%) tem apresentado fenótipo imuno-histoquímico triplo-negativo, isto é, negativo para RE, RP e HER2, no entanto, cerca de 1% a 3% de tumores RE positivos tem apresentado perfil basal (PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001 e 2003).

1.4 A CARCINOGENESE E AS CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS

No câncer de mama, a existência de uma ampla heterogeneidade celular intratumoral é já bastante aceita, havendo duas teorias que justificam a heterogeneidade celular. A primeira, denominada evolução clonal, dominou o pensamento científico por várias décadas, e propõe que as células tumorais sejam frutos de células normais da mama que adquirem mutações, e cada uma delas poderia adquirir então a capacidade de formar um novo tumor. O segundo modelo estudado, a teoria das células-tronco

tumorais (CTT), propõe que, apesar das células tumorais apresentarem ampla heterogeneidade, apenas raras CTT teriam a habilidade de proliferar extensivamente e formar novos tumores, sendo atualmente a teoria mais aceita (KARKARALA e WICHA 2008).

As evidências que dão suporte à teoria das CTT são baseadas em estudos que demonstraram que células tumorais que expressavam os marcadores de células-tronco eram muito mais tumorigênicas quando comparadas a células que não expressavam os marcadores. Acredita-se que as CTT são derivadas de células-tronco normais da mama (WICHA et al. 2006).

A principal característica de uma célula-tronco normal é sua capacidade de autorrenovação e diferenciação, tanto *in vivo* quanto *in vitro* (KUPERWASSER et al. 2004), ou seja, divide-se de forma simétrica (originando duas novas células-tronco), e de forma assimétrica (originando uma célula-tronco e outra célula diferenciada proliferativa). Células-tronco normais usualmente se diferenciam em várias linhagens celulares, refletindo sua propriedade de célula multipotencial. Algumas células-tronco teciduais podem ainda ser pluripotenciais, com capacidade de se diferenciar em linhagens germinativas variadas, ou ainda totipotenciais, com habilidade de se diferenciar em tecido trofoblástico, sendo esta última característica presente nas células-tronco embrionárias (AL HAJJ et al. 2003; PHILLIPS et al. 2006; GINESTIER et al. 2007).

Estudos embriológicos da glândula mamária normal indicam que as células-tronco mamárias se desenvolvem em progenitores que se

diferenciam tanto em células epiteliais ductais, quanto em células mioepiteliais (STINGL et al. 1998; BOECKER et al. 2002; SHACKLETON et al. 2006). Células epiteliais ductais e alveolares tem capacidade de expressar receptores hormonais, podem secretar caseína e se proliferar. Em contraste, as células mioepiteliais sintetizam a membrana basal, não expressando receptores hormonais, e apresentam limitada proliferação. Uma importante característica *in vitro* apresentada pelas células-tronco mamárias é a propriedade de formar mamosferas (WICHA et al. 2006; CHRISTGEN et al. 2007; HO et al. 2007), agregados celulares em culturas em suspensão.

As células-tronco mamárias normais caracterizam-se pela imunoexpressão de CD44, e não expressão de CD24. Estes marcadores não são específicos e sua função celular não é bem esclarecida. Outro marcador utilizado para identificar células-tronco mamárias normais é a enzima ALDH (HESS et al. 2004; PEARCE et al. 2005; CHUTE et al. 2006). Através de um teste de detecção de aldefluor, 6% das células epiteliais das unidades ducto-lobulares demonstraram positividade para esta enzima. Apenas as células positivas para ALDH geraram mamosferas em culturas em suspensão (DONTU et al. 2003).

Estudos apontam que determinados tipos de câncer de mama apresentam uma população aumentada de células tumorais com fenótipo de célula-tronco (KONDO et al. 2007; LOBO et al. 2007). O carcinoma mamário inflamatório, por exemplo, é rico em células que expressam estes marcadores (BERTUCCI et al. 2004; XIAO et al. 2008). Outros estudos

apontam que carcinomas mamários que expressam a assinatura das células-tronco exibem uma menor sobrevida global (GLINSKY et al. 2005).

Um estudo utilizando biópsias de fragmentos de carcinomas mamários obtidas antes e após a quimioterapia neoadjuvante demonstrou que quimioterápicos convencionais não eliminaram a subpopulação de células que expressaram marcadores de células-tronco CD44+/CD24-, apresentando na verdade um aumento do número de células desta subpopulação. Tais evidências sugerem que uma pequena subpopulação de células de um carcinoma mamário com potencial tumorigênico apresenta resistência ao tratamento quimioterápico, e esta subpopulação de células apresenta características de células-tronco, validando a importância das CTT no tratamento do câncer de mama (LI et al. 2008).

Baseados nestas evidências, para obter terapias mais eficazes para o câncer de mama, é necessário ter como alvo as células-tronco tumorais, poupando-se células-tronco normais da medula óssea e intestinais, claramente. Estudar as vias de sinalização das CTT, e seus potenciais alvos terapêuticos, é, portanto, de maior importância para a evolução do tratamento do câncer de mama.

Várias vias de sinalização tem sido implicadas na atividade das células-tronco normais, como autorrenovação, manutenção de seu potencial de diferenciação e desenvolvimento, e proliferação. Todas estas vias de sinalização atuam através da ativação de uma proteína transmembrana ligante, cujo sinal, transportado através do citoplasma, age ativando fatores transcricionais que regulam a expressão gênica. As principais vias de

sinalização das células-tronco incluem: Hedgehog, Wnt e Notch (MOLOFSKY et al. 2004; POLITI et al. 2004; DONTU et al. 2004; ANDROUTSELLIS-THEOTOKIS et al. 2006). Estas vias parecem atuar de forma importante também nas CTT do câncer de mama, quando anormalmente ativadas. Uma das principais vias estudadas no câncer de mama, atuando como potencial alvo terapêutico, é a via de sinalização Notch (YAMAGUCHI et al. 2008).

1.5 A VIA DE SINALIZAÇÃO NOTCH

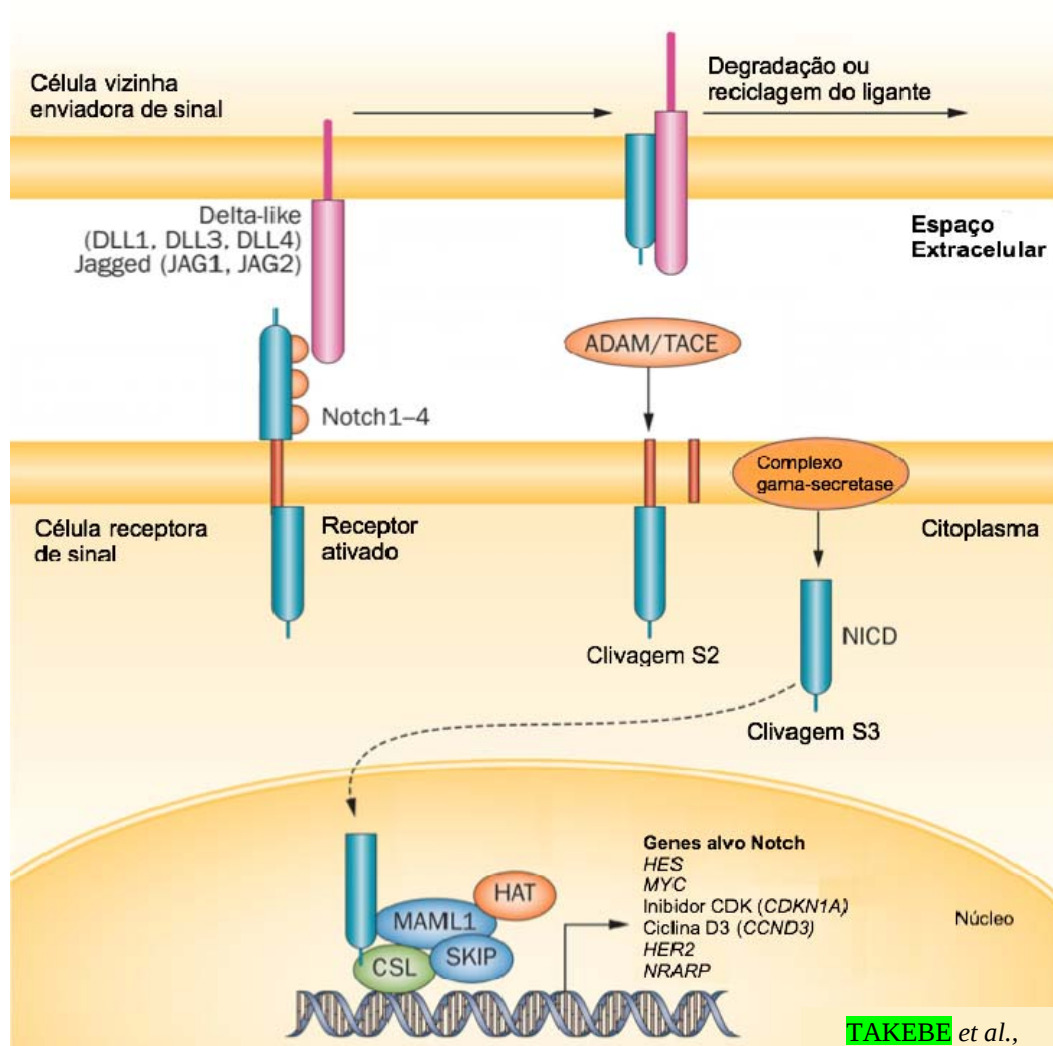
A via de sinalização Notch (neurogenic locus notch homologue protein) é um mediador de sinalização celular justácrino, conservado em inúmeros organismos multicelulares (HARRISON et al. 2010). Em 1919, a via Notch foi inicialmente descoberta e então nomeada de acordo com seu efeito fenotípico de perda parcial de asas em *Drosophila* (ARTAVANIS-TSAKONAS et al. 1999). Desde então, a função das proteínas Notch tem sido estudada em organismos diversos, de vermes a humanos. A via Notch atua na comunicação entre células adjacentes, envolvendo mecanismos regulatórios dos genes que controlam múltiplos processos de diferenciação celular durante a embriogênese e a vida adulta. Na embriogênese de mamíferos, a via Notch participa particularmente da neurogênese, angiogênese, do desenvolvimento da glândula mamária, do coração e do sistema linfático (ARTAVANIS-TSAKONAS et al. 1999). Seus mediadores atuam controlando a resposta celular a estímulos de desenvolvimento

extrínsecos e intrínsecos, necessários para dar início a específicos programas de desenvolvimento celular, seja na mama ou em outros tecidos, com o potencial de afetar vias de diferenciação celular, proliferação, e apoptose. A mesma via, em situações diferentes, pode dar início a uma grande variedade de atividades celulares, sendo a proliferação celular resultante dependente de um complexo contexto (GUO et al. 2011).

A via Notch em mamíferos compreende quatro receptores transmembrana: Notch 1, Notch 2, Notch 3 e Notch 4, e cinco ligantes transmembrana: Delta-like1 (DLL1), Delta-like3 (DLL3) e Delta-like4 (DLL4), Jagged1 e Jagged2. Na via canônica de ativação, os ligantes expressos nas membranas de células sinalizadoras se conectam ao domínio extracelular do receptor Notch, em uma célula adjacente receptora de sinal. Esta é uma mediação justácrina, com necessidade de contato direto entre as células. A ligação ocasiona clivagens proteolíticas sequenciais do receptor, a primeira através das enzimas desintegrina A e metaloproteinase 10 ou 17 (*ADAM10/17*), seguida da clivagem pelo complexo de gama-secretases (*PSEN1*, *PSEN2*, *APH1*, nicastrina). Estas clivagens resultam na liberação do domínio intracelular do receptor, que se transloca para o núcleo, interagindo com as proteínas RBPJ (Recombination signal Binding Protein for immunoglobulin kappa J) ou *CBF-1/Su(H)/Lag-1* (CSL), para gerar um complexo ativador transcricional contendo coativadores da família Mastermind ou *Mastermind-like* (MAML). A formação deste complexo resulta na expressão de vários genes alvo, como a família *HES/HEY*, *MYC* e *p21*, que estão envolvidos no crescimento, diferenciação e sobrevivência celular

(ARTAVANIS-TSAKONAS et al. 1999; BRAY 2006; EFSTRATIADIS et al. 2007; HARRISON et al. 2010). O receptor Notch nuclear é então rapidamente fosforilado, ubiquitinado, e degradado, raramente se acumulando no núcleo (RIZZO et al. 2008). O mecanismo de ativação da via Notch encontra-se ilustrado na Figura 1.

Os alvos melhor caracterizados dos receptores Notch são repressores transcricionais das subfamílias *HES* (*HES* 1-7) e *HEY* (*HEY* 1, *HEY*2, *HEY*L, *HESL*/*HELT*, *DEC1*/*BHLHB2*, *DEC2*/*BHLHB3*) (ISO et al. 2003; SCWANBECK et al. 2008; ZANOTTI e CANALIS 2010). Tanto as proteínas Hes como Hey contém um domínio básico, que determina a especificidade da ligação do DNA, e um outro domínio que permite as proteínas formarem homo ou heterodímeros. Sua função biológica no câncer de mama permanece relativamente incerta. *HES1* é um gene supressor tumoral em células epiteliais e age como mediador dos efeitos proliferativos do 17 β -estradiol (E2) nas células tumorais do câncer de mama (STROM et al. 2000; MULLER et al. 2002). Em contrapartida, *HES6* é um novo gene regulado pelo estrógeno, e potencial oncogene hiperexpresso no câncer de mama com funções promotoras tumorais e proliferativas (HARTMAN et al. 2009).



Fonte: Adaptado de TAKEBE et al. (2015).

Figura 1 - A via de sinalização Notch canônica e os inibidores farmacológicos relevantes em desenvolvimento no câncer.

Outros genes alvo da via notch incluem proteínas e fatores envolvidos no controle do ciclo celular e processo de sobrevivência celular, como: *p21WAF1/Cip1* (um inibidor de quinase dependente de ciclina que atua tanto como sensor como realizador de múltiplos sinais antiproliferativos), *Deltex* (um regulador positivo da atividade Notch), *NF-KB* (um fator transcricional), *CCND1* (um sensor mitogênico e ativador alostérico da quinase dependente de ciclina CDK4/6) e *MYC* (um oncogene e regulador do ciclo celular)

(ARTAVANIS-TSAKONAS et al. 1999; MIELE e OSBORNE 1999; MIELE et al. 2006; EFSTRATIADIS et al. 2007; GUO et al. 2011). Recentemente, a survivina, membro da família de proteínas inibidoras da apoptose e indutor da proliferação celular, foi identificada como nova proteína de gene alvo para Notch. A estimulação da via Notch resultou na ativação direta da transcrição do gene *SURVIVINA* (GUO et al. 2011).

A função da via de sinalização Notch foi reconhecida décadas atrás, quando alterações em membros da via de sinalização Notch foram responsabilizadas por inúmeras doenças humanas. A identificação de uma translocação cromossômica recorrente t(7;9)(q34;q34.3) foi relacionada ao gene *NOTCH1*, identificada em uma pequena amostra de casos de leucemia linfoblástica aguda de células T (ELLISEN et al. 1991). Desde então, os mediadores Notch foram associados a inúmeras malignidades humanas, como: carcinomas de colo uterino, endometrial, colorretal, de cabeça e pescoço, pulmonar, renal, pancreático, leucemias e linfomas e também no câncer de mama, seja em lesões mamárias invasivas como *in situ* (DANG et al. 2000; LEETHANAKUL et al. 2000; RAE et al. 2000; SUZUKI et al. 2000; HENDRIX et al. 2002; KOPAN e ILAGAN 2009; MIELE et al. 2006).

A contribuição da sinalização Notch aberrante para o câncer de mama foi inicialmente identificada em glândulas mamárias de murinos. Nesta ocasião, o gene *INT3*, identificado posteriormente como Notch 4, foi evidenciado como local de inserção de vírus tumoral mamário de ratos (MMTV), com sua ativação levando ao desenvolvimento de tumores

mamários em glândulas de murinos (GALLAHAN et al. 1987; DIEVART et al. 1999; WEIJZEN et al. 2002).

Diferente das leucemias linfoblásticas agudas de células T (LLA-T), onde mais da metade dos pacientes apresenta uma mutação ativadora de Notch 1 (WENG et al. 2004), no câncer de mama, ainda não foi relatada uma alteração cromossômica envolvendo a via Notch. Na LLA-T, mutações ativadoras são comumente encontradas na região reguladora negativa da membrana do receptor Notch 1, e no domínio *PEST* (resíduo de Prolina/Ácido Glutâmico/Serina/Treonina), que regula a metabolização do domínio intracelular do receptor Notch 1 ativado. Analisando-se 48 amostras de carcinomas mamários invasivos, apenas uma mutação *nonsense* em *NOTCH2* foi identificada, produzindo um domínio *PEST* truncado, aumentando assim a sinalização Notch 2, (LEE et al. 2007).

A ausência de mutações identificadas leva ao questionamento crítico de como a via de sinalização Notch pode ser anormalmente ativada e patogênica no câncer de mama. Duas possíveis explicações têm sido propostas: (a) maior expressão de receptores Notch e/ou de seus ligantes e (b) perda do seu regulador negativo, *NUMB* (HAN et al. 2011).

Inúmeros estudos reportaram que a expressão de receptores Notch e seus ligantes foi maior em carcinomas mamários humanos, comparando-se ao parênquima mamário adjacente (PARR et al. 2004; ZANG et al. 2007; RIZZO et al. 2008; ZARDAWI et al. 2010; MA et al. 2011). Evidências sugerem também a ativação da via de sinalização Notch em lesões pré-

invasivas da mama, incluindo hiperplasia ductal atípica e carcinoma ductal *in situ* (FARNIE et al. 2007; MITTAL et al. 2009; ZARDAWI et al. 2010).

A via de sinalização Notch aberrante pode atuar tanto como supressora tumoral, quanto como oncogênica, dependendo do contexto celular de expressão de receptores e ligantes (PREVIS et al. 2015). Em particular, elevada expressão de *NOTCH1* e *NOTCH3* têm sido associada a tumores com receptores hormonais negativos. *NOTCH4*, de forma similar a *NOTCH1* e *NOTCH3*, também funciona como oncogene, mas em câncer de mama com receptor hormonal positivo (TOUPLIKIOTI et al. 2012). REEDIJK et al. (2005) observou elevada coexpressão de *JAG1* e *NOTCH1* em carcinomas mamários invasivos, associando-a a pior sobrevida global. Já a elevada expressão de *NOTCH2* tem sido associada a melhor sobrevida (PARR et al. 2004), o que pode ser consequência de maior apoptose demonstrada *in vitro* (O'NEILL et al. 2007).

Há indícios apontando que a via de sinalização aberrante Notch contribui para a resistência de células mamárias tumorais a diversos tratamentos, através da regulação da apoptose (LEONG et al. 2006). A resistência a modalidades terapêuticas foi observada desde quimioterápicos como doxorrubicina e docetaxel (ZANG et al. 2010; GU et al. 2016; WANG et al. 2017), à terapia alvo anti-HER2 (OSIPO et al. 2008), à radioterapia (PHILLIPS et al. 2006), e à hormonioterapia (RIZZO et al. 2008; SIMÕES et al. 2015; ACAR et al. 2016).

O papel terapêutico da via de sinalização Notch tem sido extensamente investigado, especialmente em tumores triplo-negativos, tendo em vista a

ausência de terapias alvo nestes tumores e a característica presença de células com aspectos similares a células-tronco tumorais (MARUTHANILA et al. 2017).

Em estudo pré-clínico, um inibidor de gama-secretase (PF-03084014) ressensibilizou células tumorais mamárias ao docetaxel (ZHANG et al. 2013). Já em estudo fase I, este mesmo inibidor da gama-secretase, PF-03084014, demonstrou-se seguro e bem tolerado em pacientes com tumores sólidos avançados (MESSERSMITH et al. 2015). Em outro estudo fase I, a utilização de inibidores da gama-secretase em combinação com docetaxel evidenciou-se promissora no tratamento de pacientes com câncer de mama metastático triplo-negativo (LOCATELLI et al. 2017).

Os anticorpos monoclonais anti-Notch 1 parecem retardar a recorrência do tumor e aumentar o efeito antitumoral da quimioterapia (QIU et al. 2013). A inibição da via Notch através de anticorpo Notch 1 anti-NRR (região regulatória negativa) também tem sido investigada (WU et al. 2010). SIMÕES et al. (2015) demonstrou o benefício *in vitro* da associação terapêutica antiestrogênica a um anticorpo anti-Notch 4.

Estudos pré-clínicos sugerem potencial uso de Mesilato de imatinibe (Gleevec), ao inibidor da via Notch e c-Myc, em câncer de mama (CALLAHAN et al. 2017). Além disso, substâncias naturais, como a genisteína, um isoflavonóide encontrado na soja, o sulforafano, produto encontrado no brócolis, o resveratrol e a curcumina estão sendo estudadas, com aparente efeito antagonista da via Notch (LIU et al. 2016). Já YUAN et

al. (2015) relatou que os inibidores de Notch podem bloquear a progressão inicial do carcinoma ductal *in situ*.

1.6 PROTEÍNAS DE GENES ALVO

Acredita-se que o *status* de expressão de proteínas que regulam a apoptose modula a resistência das células tumorais à morte celular programada, e as superexpressões destas proteínas conduzem à resistência à quimioterapia e a características biológicas de células tumorais associadas à malignidade.

Neste contexto, a survivina, o menor membro da família de proteínas inibidoras da apoptose, é uma das moléculas mais estudadas. A survivina, também chamada de BIRC5 (baculoviral inhibitor of apoptosis repeat-containing 5), é uma proteína intracelular de 16,5 kDa, expressa na fase G2/M do ciclo celular, e está envolvida na inibição da apoptose, no controle da divisão celular e na promoção da angiogênese (AMBROSINI et al. 1997; REED et al. 2000; RYAN et al. 2006). Sua função anti-apoptótica está relacionada à sua capacidade de inibir a via de caspases, direta ou indiretamente (ATHANASSIADOU et al. 2011).

O primeiro relato de survivina foi atribuído a AMBROSINI et al. (1997), que descreveu a survivina como uma proteína exclusivamente citoplasmática, mais expressa em células tumorais, sendo detectada raramente em tecidos adultos normais (NASSAR et al. 2008; ADAMKOV et al. 2010). Foi demonstrada a superexpressão de survivina em vários tipos de

câncer, incluindo carcinomas de ovário (SUI et al. 2002), pulmão (MONZO et al. 1999), cólon (SARELA et al. 2000), bexiga (SWANA et al. 1999), endométrio (TAKAI et al. 2002) e próstata (KRAJEWSKA et al. 2003; ALTIERI et al. 2008).

Vários estudos anteriores avaliaram o papel prognóstico da survivina no câncer da mama. No entanto, o resultado é ambíguo, pois estudos publicados relataram que sua expressão é prognosticamente irrelevante (O'DRISCOLL et al. 2003), associada a melhora do desfecho (KENNEDY et al. 2003) ou desfecho adverso (TANAKA et al. 2000; SPAN et al. 2004) em pacientes com câncer de mama. A discrepância entre os achados pode resultar de um tamanho de amostra relativamente pequeno ou diferentes métodos de detecção.

LEE et al. (2008) demonstrou que a ativação da via de sinalização Notch em células de câncer de mama negativas para receptor de estrógeno resultou na regulação transcricional positiva direta da survivina. Esta resposta está associada com aumento da expressão de survivina na mitose, aumento da proliferação celular e aumento na divisão celular. Inversamente, a inibição de Notch com um inibidor de peptidil gama-secretase suprimiu os níveis de survivina, induziu apoptose, aboliu a formação de colônias em ágar e inibiu o crescimento de tumor localizado e metastático em ratos, sem toxicidade de órgão ou sistêmica. Em contraste, as células de câncer da mama RE positivas, ou demais tipos de células normais, foram insensíveis à estimulação de Notch (LEE et al. 2008).

A existência de formas nucleares ou citoplasmáticas distintas de survivina foi reconhecida e os investigadores questionaram se a diferente localização celular da survivina poderia refletir em variadas funções, contribuindo potencialmente para a disparidade dos resultados (AMBROSINI et al. 1997; FORTUGNO et al. 2002; LI et al. 2014). Desta forma, no citoplasma, a survivina interage com outras proteínas inibidoras da apoptose, incluindo a proteína inibidora da apoptose ligada ao X, para aumentar sua estabilidade e portanto sua função antiapoptótica ao inibir a morte celular dependente de caspases (ALTIERI et al. 2002; FORTUGNO et al. 2002). No núcleo, a survivina regula a divisão celular ao interagir com um complexo denominado proteínas passageiras cromossômicas (LENS et al. 2006).

Apesar da heterogeneidade dos resultados, a expressão de survivina está mais frequentemente associada a pior prognóstico no câncer de mama, progressão tumoral e resistência ao tratamento (LI e XING 2006; HINNIS et al. 2007; YAMASHITA et al. 2007; NASSAR et al. 2008; MORIAI et al. 2009; LI et al. 2014). Em uma tentativa de compreender melhor a relação entre a expressão de survivina e a sobrevida em pacientes com câncer de mama, LI et al. (2014) conduziu uma metanálise onde identificou uma associação entre a expressão de survivina e pior prognóstico em pacientes com câncer de mama, resultando em maior risco de recidiva e pior sobrevida global, apesar do desafio dos diferentes métodos utilizados para detecção da proteína. A expressão de survivina também esteve associada ao *status* linfonodal e estadiamento (LI et al. 2014).

Bcl2 também é uma proteína reguladora da apoptose, membro da família Bcl (BASU et al. 1998; BOUCHALOVA et al. 2014). Seu potencial tumorigênico foi demonstrado em modelos animais (MCDONNELL et al. 1991) e é baseado nos achados de hiperexpressão de Bcl2 em uma variedade de tumores e linfomas nos quais BCL2 age como um oncogene (MCDONNELL et al. 1992; PIETENPOL et al. 1994). No entanto, em muitos tumores de órgãos sólidos, incluindo câncer de mama, Bcl2 paradoxalmente parece exercer um efeito supressor tumoral, enquanto sua expressão está associada com características prognósticas favoráveis como baixo grau histológico, positividade de receptor de estrógeno e melhor prognóstico (CALLAGY et al. 2006). A proteína parece exercer funções celulares diferentes a depender da interação com outros membros da família Bcl. EOM et al. (2016) demonstrou que a expressão de Bcl2 está associada a melhor sobrevida livre de recorrência em tumores de mama classificados como luminal A.

A proteína ciclina D1, de aproximadamente 34KDa, é um conhecido regulador do ciclo celular que age através da ligação com quinase dependente de ciclina (CDK 4/6), inativando a proteína do retinoblastoma (Rb), levando à progressão do ciclo celular (KATO et al. 1993; CALDON et al. 2010). O gene *CCDN1*, que codifica a ciclina D1, está localizado no cromossomo 11q13, e encontra-se comumente amplificado em muitos tumores humanos, incluindo o câncer de mama. A amplificação do gene *CCND1* é encontrada em 15% dos tumores de mama em humanos, enquanto a superexpressão da proteína é identificada em até 50% dos

casos (ZHANG et al. 1994; ZUKERBERG et al. 1995).

A expressão aberrante de ciclina D1 encontra-se associada à carcinogênese mamaria através da regulação do ciclo celular. Dados de CASIMIRO et al. (2012) sugerem que a ciclina D1 contribui para a instabilidade cromossômica e a tumorigênese por regular diretamente um programa transcricional que controla a estabilidade cromossômica. Por outro lado, alguns estudos tem demonstrado que a ciclina D1 pode também atuar por meio da ligação direta a receptores de estrógeno, propagando o efeito em cadeia do estrógeno por uma via independente de CDK e Rb (ARNOLD et al. 2005) e, também, por meio de acetilases e desacetilases de histonas (FU et al. 2004).

Os efeitos biológicos da superexpressão de ciclina D1 no processo da tumorigênese são exibidos através das vias de sinalização Notch, Hedgehog e Wnt (FARNIE et al. 2007; VISBAL et al. 2010; WEND et al. 2010). Inúmeros estudos tem demonstrado que a alteração na regulação destas vias pode levar ao desenvolvimento de câncer de mama em ratos (VORECHOVSKY et al. 1999; SORIANO et al. 2000; HUELSKEN et al. 2000; KELLY et al. 2004) e em humanos (PASCA et al. 2003; KARHADKAR et al. 2004; LIU et al. 2005). Um estudo indicou que a deleção do gene *CCND1* levou a falência do desenvolvimento mamário em ratos (FANTL et al. 1995). WANG et al. (1994) demonstrou que a hiperexpressão do oncogene da Ciclina D1 pode induzir tumores mamários em ratos. Estes achados sugerem que a Ciclina D1 pode direta ou indiretamente iniciar a diferenciação das células glandulares mamárias. Outros estudos sugeriram

que a ciclina D1 pode inibir a diferenciação de adipócitos (CALDON et al. 2010). Além disso, há na literatura demonstrações de que a elevada expressão dos níveis de ciclina D1 está associada à instabilidade cromossômica, especificamente nos tumores de subtipo luminal B (CASIMIRO et al. 2012).

WANG et al. (2013) detectaram níveis insignificantes de expressão de ciclina D1 em papilomas, comparados aos altos níveis de expressão de ciclina D1 em carcinomas papilíferos, diferença estatisticamente significativa, demonstrando possível papel na oncogênese do câncer de mama (WANG et al. 2013). Analisando os diferentes perfis de classificação molecular, em um estudo publicado por RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY (2014), identificou-se expressão de ciclina D1 em 92% dos tumores luminais, enquanto, nos tumores triplo-negativos, não foi identificado nenhum caso de hiperexpressão de ciclina D1 (RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY 2014). A associação entre expressão de ciclina D1 e receptor de estrógeno também foi identificada em outros estudos (REIS-FILHO et al. 2006; LEE et al. 2007).

A proteína p21 é inibidora de quinase dependente de ciclina implicada nos mecanismos de controle do ciclo celular que permitem a reparação do DNA. Ela bloqueia a transição do G1 à fase de S e suprime a proliferação celular. Em tumores esporádicos de mama a expressão de p21 tem correlação inversa com a expressão p53 e o grau histológico do tumor. Parece estar relacionada à diferenciação celular em diversos modelos de tumores. Embora as mutações do gene *p21* sejam raras, a superexpressão da p21 é vista frequentemente nos carcinomas de mama (JONG et al. 1999;

HEIKKILA et al. 2000; BALASENTHIL et al. 2004).

A superexpressão de p21 geralmente vem associada à superexpressão da ciclina D1, o que sugere controle negativo de uma proteína em relação à outra, sendo a ciclina D1 regulador positivo do ciclo celular e a p21 regulador negativo. Por este mecanismo, os efeitos da superexpressão da ciclina D1 podem ser neutralizados, bloqueando a proliferação celular e permitindo que as células se diferenciem (JONG et al. 1999; HEIKKILA et al. 2000; BALASENTHIL et al. 2004; ROY e THOMPSON 2006).

A proteína p21 está expressa em torno de 60% dos tumores de mama e associa-se a tumores com receptores de estrogênio positivo, de baixo grau histológico, bem diferenciados e que geralmente respondem bem aos antiestrogênicos (REED et al. 1999). Porém o valor preditivo e prognóstico da expressão p21 não está totalmente claro, existindo discordâncias em diferentes estudos, e em relação a diferentes graus de expressões da proteína no tumor avaliado, necessitando ainda de novos dados para melhor compreensão desta proteína (LEBEAU et al. 2003).

2 JUSTIFICATIVA

Estudos sugerem que a via de sinalização Notch tem importante atuação na carcinogênese mamária, e na resposta aos diferentes tratamentos. Trata-se de uma via complexa, que participa na formação do tecido mamário normal, e também da iniciação e progressão do câncer de mama, através de múltiplos efeitos na proliferação e diferenciação celular, apoptose e, principalmente, manutenção de células tronco mamárias e sua capacidade de autopropagação. Estudos clínicos utilizando inibidores isolados desta via, através da combinação com quimioterápicos, docetaxel e doxorrubicina, apresentaram resultados animadores. Além disso, a ação do trastuzumabe parece também estar relacionada à inibição da via Notch. Acredita-se ainda que esta via esteja alterada em diferentes mecanismos de resistência ao tratamento do câncer de mama, seja na quimioterapia, terapia alvo HER2, radioterapia e hormonioterapia.

Os dados na literatura a respeito da associação prognóstica entre expressão proteica da via de sinalização Notch e o câncer de mama são escassos, já que a maioria dos estudos publicados são voltados para expressão gênica.

O presente estudo justifica-se na ampliação do conhecimento desta via através de sua imunoexpressão, o que o torna mais acessível e reprodutível, ao utilizar uma metodologia precisa.

Ao investigar-se um grupo de pacientes com estadiamento inicial que, contrariamente às expectativas de sobrevida, cursaram com recidiva, tem-se uma amostra com um perfil biológico certamente distinto, onde diferentes expressões protéicas implicadas no prognóstico serão mais facilmente observadas. Este seleto grupo de pacientes proporciona um universo científico a ser explorado, na tentativa de justificar tal desfecho desfavorável.

A confirmação da associação prognóstica da via Notch no câncer de mama fomentaria ensaios clínicos mais robustos com os recém-descobertos inibidores Notch.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão protéica de receptores da via Notch e principais proteínas de genes alvo em câncer de mama de estágio inicial de pacientes tratadas no serviço de Mastologia do Hospital Haroldo Juaçaba, e A.C.Camargo Cancer Center.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Comparar a expressão protéica de receptores Notch 1 2, 3 e 4, receptor Notch 1 ativado, e proteínas Bcl-2, Ciclina D1, p21 e survivina, entre pacientes com e sem recidiva tumoral.
- ✓ Analisar as diferenças de expressão protéica de receptores da via Notch 1 2, 3 e 4, e receptor Notch 1 ativado, e as proteínas de genes alvo, Bcl-2, Ciclina D1, p21 e survivina, considerando os diferentes subtipos moleculares de câncer de mama classificados por imuno-histoquímica.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 NATUREZA DO ESTUDO

Trata-se de um estudo retrospectivo horizontal analítico, do tipo caso-controle.

4.2 AMOSTRA

A amostragem é do tipo intencional, consistindo de pacientes do sexo feminino, tratadas por carcinoma mamário invasivo, cujo diagnóstico tenha ocorrido entre janeiro de 2001 e dezembro de 2010, no Hospital Haroldo Juaçaba - ICC, e A.C.Camargo Cancer Center.

As pacientes com evolução desfavorável da doença, ou seja, que apresentaram, ao longo do seguimento, recidiva local, locorregional ou sistêmica, integram o grupo caso, e pacientes que não tenham apresentado o desfecho, com evolução favorável da doença, representam o grupo controle.

4.3 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

4.3.1 Critérios de inclusão

- Sexo feminino;
- carcinoma invasivo da mama;
- estágios: pT1 ou pT2 pN0;
- tratamento segundo os protocolos atuais de cirurgia, quimioterapia, hormonioterapia e radioterapia.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Biópsia excisional prévia (pTx);
- tratamento cirúrgico realizado em outro serviço;
- terapia neoadjuvante;
- tratamento oncológico sistêmico prévio por qualquer outro tipo de tumor;
- abandono de tratamento;
- segunda neoplasia primária da mama (*in situ* ou invasora);
- blocos de parafina não localizados;
- ausência de informações no prontuário quanto à evolução clínica;
- amostras histológicas insuficientes para análise (exemplos: tumores microinvasores, bloco único de parafina com pequena representação tumoral), no intuito de garantir a reserva histológica da respectiva paciente para possível necessidade clínica futura.

4.4 GRUPOS CASO E CONTROLE

A amostra foi dividida em dois grupos, onde no grupo caso foram reunidas espécimes de pacientes que tenham apresentado o desfecho desfavorável, recidiva local, locorregional e/ou sistêmica, enquanto no grupo controle foram estudados casos de pacientes sem sinais de recidiva tumoral. Os grupos foram distribuídos numa razão 1:2 (casos: controles), pareados por idade, tamanho do tumor e positividade de receptor de estrógeno, tendo em vista os demais marcadores de imuno-histoquímica não serem realizados de rotina no início do período em questão (2001).

4.5 COLETA DE DADOS

A amostra foi selecionada inicialmente através do registro do Hospital Haroldo Juaçaba, Instituto do Câncer do Ceará (ICC), onde foram identificadas pacientes do sexo feminino cujo diagnóstico de carcinoma mamário invasivo ocorrera entre janeiro de 2001 e dezembro de 2010 no ICC, com estadiamento clínico T1-T2N0. A partir de então, foram selecionados os prontuários médicos sob guarda do serviço de Arquivo Médico e Estatística - SAME do Hospital Haroldo Juaçaba - Instituto do Câncer do Ceará. Utilizando-se uma ficha confeccionada para coleta de dados (apêndice), foram separados, de acordo com o desfecho (recidiva), as pacientes do grupo caso e controle. Blocos e lâminas do laboratório de patologia foram resgatados com dados de prontuário para dar continuidade da análise.

No intuito de ampliar o número de pacientes do grupo caso, foram incluídas pacientes do A.C.Camargo Cancer Center que apresentaram recidiva tumoral, através de bancos de dados de pesquisas previamente realizadas na instituição, utilizando-se os mesmos critérios de inclusão e exclusão utilizados nas pacientes do ICC.

4.6 VARIÁVEIS ESTUDADAS

4.6.1 Variáveis dependentes

- ✓ recidiva tumoral (desfecho);

4.6.2 Variáveis independentes

- idade;
- tipo histológico;
- grau histológico;
- estadiamento patológico;
- tratamento
- classificação molecular do câncer de mama por imuno-histoquímica;
- expressão de receptores Notch 1 2, 3 e 4, e Notch 1 ativado;
- expressão das proteínas ciclina D1, Bcl-2, Survivina e p21

4.7 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DO MATERIAL

Após a seleção da amostra, os laudos anatomopatológicos das cirurgias (quadrantectomia ou mastectomia) foram identificados e as respectivas lâminas localizadas. As lâminas coradas com hematoxilina-eosina (HE) foram revisadas por patologistas dedicados à área oncológica para confirmação do diagnóstico de carcinoma mamário invasivo. Realizou-se seleção da lâmina com maior representatividade do carcinoma invasor, demarcando-se a melhor área para realização do estudo. Em seguida, localizaram-se os blocos de parafina correspondentes. A área diagnosticada como invasiva na lâmina de HE com maior representatividade tumoral foi demarcada nos respectivos blocos de parafina, ilustrados na Figura 2. O material foi estudado de acordo com a técnica de microarranjo tecidual, *tissue microarray* (TMA), descrita a seguir.

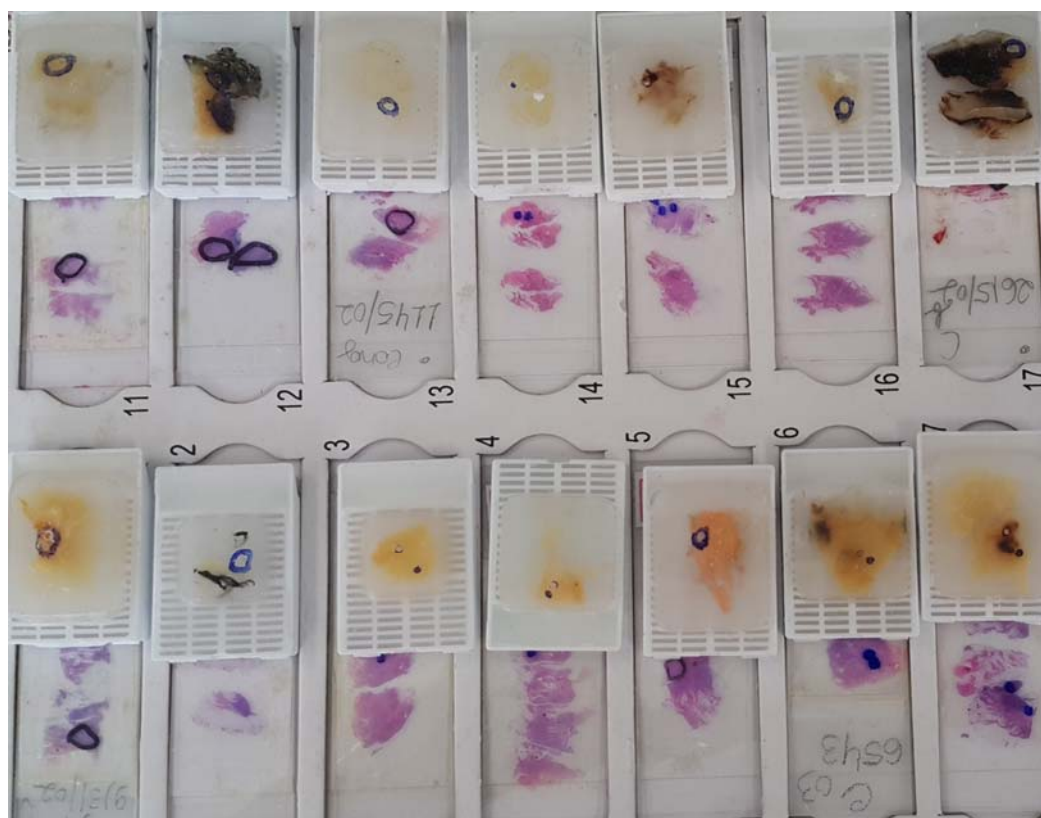


Figura 2 - Demarcação das lâminas e blocos originais para identificação das áreas representativas para confecção do bloco receptor - *Tissue Microarray* (TMA).

4.8 PREPARO DO BLOCO DE TMA (*TISSUE MICROARRAY*)

Inicialmente descrita em 1987 por WAN et al., e popularizada KONONEN et al. (1998), a técnica de *tissue microarray* (TMA) é um método que consiste em retirar pequenos fragmentos de múltiplos blocos de parafina convencionais (blocos doadores) e inseri-los em um único novo bloco vazio (bloco receptor). O TMA permite a avaliação de centenas de amostras teciduais em uma única lâmina. A obtenção de amostras dos blocos de parafina doadores é realizada por meio de agulha (*punch*) com diâmetro de 0,6; 1,0; 1,5 ou 2,0 milímetros. Estas amostras são então inseridas em um bloco receptor vazio, por meio de um aparelho chamado *tissue microarrayer*. A técnica de TMA proporciona uma importante redução de custos, minimizando a necessidade de reagentes, mão de obra e de tempo de confecção e análise de lâminas reduzido, sendo portanto um considerável avanço na pesquisa científica (ILYAS et al. 2013).

Após a confirmação histológica do diagnóstico de carcinoma infiltrante da mama, demarcação da área da lâmina em HE e, em seguida, do bloco de parafina doador, foram retiradas duas amostras cilíndricas com diâmetro de 1mm de cada caso clínico da região previamente demarcada. Cada cilindro retirado, por sua vez, foi transferido para um outro bloco de parafina, o bloco receptor, empregando-se um *tissue microarrayer* apropriado, ilustrado na Figura 3 (Beecher Instruments Micro Array Technology, NJ, EUA). Desta forma, foram confeccionados dois blocos de parafina de TMA que continham o material duplicado de todas as pacientes da amostra a serem analisados, permitindo leitura rápida e simultânea dos exames, ilustrado na figura 4.

Tecido de placenta foi adicionado ao início da sequência das amostras no bloco de TMA para facilitação de leitura histológica. A partir do bloco de TMA, foi efetuado o preparo das lâminas, cuja técnica é descrita a seguir.

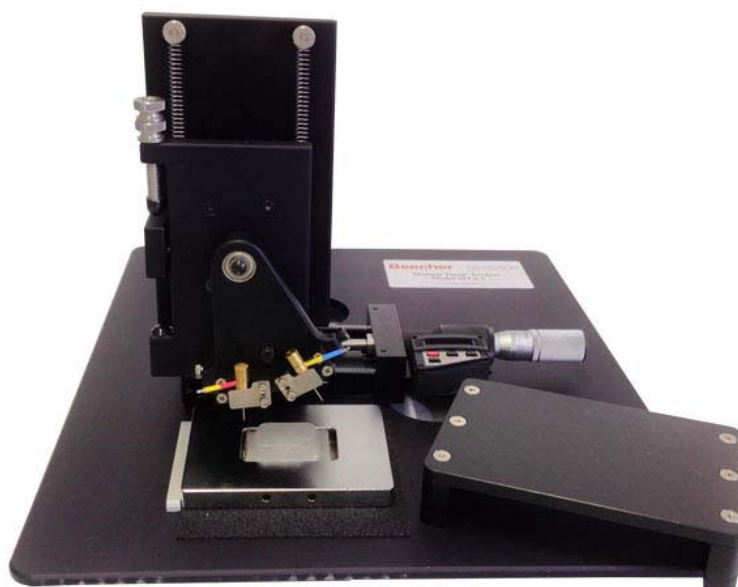


Figura 3 - Equipamento *Tissue microarrayer* (Beecher Instruments Micro Array Technology, NJ, EUA) utilizado para obter amostras cilíndricas de tecido do bloco original e inserir de forma organizada e matricial no bloco receptor



Figura 4 - Bloco receptor de *tissue microarray* (TMA) contendo replicatas técnicas (direita e esquerda) organizadas em matriz. As amostras foram obtidas de amostras de câncer de mama de pacientes tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center.

4.9 PREPARO DAS LÂMINAS PARA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Realizou-se cortes dos blocos de TMA resfriados em micrótomo rotativo na espessura de 5 μ m. Colocou-se o material em banho maria em torno de 40°C e aderido às lâminas. As lâminas foram então levadas à estufa aquecida a 60°C para remover o excesso de parafina e melhorar a fixação do corte à lâmina. Em seguida, realizou-se coloração clássica com hematoxilina-eosina (HE).

Uma vez as lâminas identificadas por código de barras, processou-se as reações de imuno-histoquímica em plataforma automatizada BenchMark ULTRA® (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA). O protocolo seguido apresentou as seguintes etapas:

- 1 Identificação das lâminas com as etiquetas de códigos de barras.

- 2 Desparafinização das lâminas em solução de EZ PREP (Ventana Medical Systems, Tucson, AZ, EUA).
- 3 Recuperação antigênica por calor em solução CC1 (*Ultra Cell Conditionig Solution*) com pH alto a 96°C em tempo previamente padronizado para cada anticorpo.
- 4 Bloqueio da peroxidase endógena por 5 minutos utilizando o reagente de bloqueio de peroxidase (*UltraView Universal DAB Inhibitor*, 3% H2O2).
- 5 Passagens em soluções de lavagem (*Wash buffer*).
- 6 Incubação com anticorpo primário com tempo previamente padronizado.
- 7 Passagens em soluções de lavagem.
- 8 Incubação com polímero HRP (HRP Multimer) com subseqüentes lavagens em tampão.
- 9 Incubação com o cromógeno Diaminobenzidine (DAB), passagem em tampão de lavagem e contracorados com Hematoxilina (Hematoxilina II), lavadas, passadas em água com detergente para retirada do LCS, seguida de lavagem em água corrente e destilada.
- 10 Passagem em xilol, álcool e montagem.
- 11 Os anticorpos utilizados estão listados no Quadro 1.

Quadro 1 – Características dos anticorpos e reagentes utilizados nas reações imuno-histoquímicas.

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Kit detecção
<i>Estrogen receptor (ER)</i>	Ventana	SP1	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
<i>Progesterone receptor (PR)</i>	Ventana	1.E2	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
HER-2/ <i>neu</i>	Ventana	4B5	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Ki-67	Ventana	30.-9	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Anti-Notch 1 - ChIP Grade	Abcam	AB27526	1/100	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Anti-Notch 2	Abcam	AB8926	1/600	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Anti-Notch 3	Abcam	AB23426	1/100	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Anti-Notch 4	Abcam	AB134831	1/600	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Anti-Notch 1 antibody - Cleaved - Val 174	Abcam	AB8925	1/100	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
P21 ^{WAF1}	Cell Marque	DCS-60-2	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Ciclina D1	Ventana	SP4-R	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Bcl-2	Ventana	124	<i>Ready to use</i>	<i>Ultraview Universal DAB Kit</i>
Survivina	NEOMARKERS	POLICLONAL	1/100	Novolink-polymer Novocastra

4.10 GRAU HISTOLÓGICO

A graduação histológica de carcinomas é uma estimativa de sua diferenciação, aplicada à porção invasiva do tumor. A graduação nuclear, por sua vez, é a avaliação citológica dos núcleos de células tumorais em comparação a núcleos de células normais da glândula mamária. Como a graduação nuclear não envolve a avaliação do padrão de crescimento tumoral, este procedimento é aplicável não somente a carcinomas mamários invasivos, mas também a lesões *in situ* (HODA 2014).

O sistema de graduação histológica mais amplamente utilizado é baseado nos critérios estabelecidos por BLOOM (1950), BLOOM e RICHARDSON (1957), e ELSTON e ELLIS (1991). As características avaliadas são: (a) extensão de formação tubular, (b) hipercromasia, tamanho e pleomorfismo nuclear, (c) atividade mitótica. A cada um destes três elementos é atribuído um escore em uma escala de 1 a 3, e o grau definitivo é determinado pela soma destes escores. A graduação histológica é tradicionalmente expressa em três categorias: escore 3 a 5, bem diferenciado (grau I), escore 6 a 7, moderadamente diferenciado (grau II), e escore 8 a 9, pouco diferenciado (grau III) (HODA 2014). Uma modificação da graduação proposta por Bloom-Richardson, a graduação histológica de Nottingham, apresentou critérios mais rigorosos para a definição dos parâmetros avaliados (Quadro 2), com aumento da concordância interobservadores (FRIERSON et al. 1995).

Quadro 2 - Sistema de graduação histológica combinada de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis (Sistema de Nottingham).

Formação Tubular (%)	Pleomorfismo Nuclear	Atividade Mitótica *
>75% = escore 1	Núcleo tumoral similar aos núcleos de células ductais normais = escore 1	0-5 mitoses por 10 CGA = escore 1
10% - 75% = escore 2	Tamanho nuclear intermediário = escore 2	6-10 mitoses por CGA = escore 2
<10% = escore 3	Núcleos bastante aumentados, usualmente com nucléolo vesicular proeminente = escore 3	11 ou mais mitoses por CGA = escore 3

*Para microscópio Nikon® (diâmetro de campo de 0,44 mm e objetiva de 40x).

A graduação histológica das amostras foi determinada previamente à época do diagnóstico e/ou tratamento, dando-se preferência ao grau histológico referido no laudo anatomopatológico da peça cirúrgica frente ao da biópsia de fragmento (*core biopsy*).

4.11 BIOMARCADORES

4.11.1 Receptores hormonais

Para o receptor de estrógeno, foi utilizado um anticorpo monoclonal de coelho (Tabela 1) que produz um padrão de marcação nuclear na célula epitelial e reconhece uma proteína de 67 KDa, identificada como o receptor de estrógeno alfa, um importante regulador do crescimento e diferenciação da glândula mamária (YEE e POTTER 2009). Para identificação da presença de receptores de progesterona, foi utilizado anticorpo monoclonal de rato (ELASHRY-STOWERS et al. 1988).

Foram utilizados os critérios do *American College of American Pathologists-ACAP*, que orienta que carcinomas mamários com marcação em quantidade maior ou igual a 1% em núcleos de células tumorais, sejam considerados imunorreativos para a presença de receptores de estrógeno ou de progesterona, na presença de marcação esperada em controle interno e externo (HAMMOND et al. 2010; FITZGIBBONS et al. 2014).

A determinação do *status* hormonal final para classificação imuno-histoquímica foi obtida através da utilização do *status* do receptor à época do diagnóstico da paciente, complementada, em casos de ausência de informação, pelo *status* hormonal obtido pelo TMA.

4.11.2 Status HER2

Para avaliar o *status* HER2, foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho (Quadro 1). As recomendações para o teste da hiperexpressão da proteína HER2 foram seguidas de acordo com os critérios da *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathology*, ASCO/CAP (WOLFF et al. 2013; FITZGIBBONS et al. 2014).

O *status* HER2 é considerado positivo quando, através da imuno-histoquímica, ao se observar dentro de células tumorais contíguas e homogêneas, evidencia-se superexpressão da proteína, com reação membranar circunferencial intensa e completa em mais de 10% das células tumorais (Score 3+). Quando a imunorreação membranar circunferencial for incompleta e/ou fraca/moderada em mais de 10% das células tumorais, ou ainda, quando a reação membranar circunferencial, apesar de intensa e

completa, não superou 10% das células tumorais, o *status* HER2 foi considerado equívoco, indeterminado (escore 2+). Em casos de imunorreação membranar fraca/quase indistinguível em mais de 10% das células tumorais, considerou-se o escore HER2 1+, com *status* HER2 negativo. A ausência de imunorreação ou reação membranar fraca em 10% ou menos das células tumorais receberam o escore zero, com *status* HER2 negativo (WOLFF et al. 2013; FITZGIBBONS et al. 2014).

A determinação do *status* HER2 final para classificação imuno-histoquímica foi obtida através da utilização do *status* obtido no TMA, complementada, em casos de ausência de informação pelo resultado à época do diagnóstico da paciente. Não houve indicação da realização de método de hibridização *in situ* do material do TMA, tendo em vista os casos duvidosos (escore 2+) terem já seu *status* previamente definidos à época do diagnóstico.

4.11.3 Índice proliferativo Ki67

A medida do Ki67 foi realizada através da técnica clássica de imunorreação com o anticorpo monoclonal MIB1 de ratos, já bem estabelecida na literatura (CATTORETTI et al. 1992). O resultado é fornecido através de um score, definido pela percentagem de células, ou figuras mitóticas, cujo núcleo apresenta clara imunomarcacão, sobre o total de células malignas visualizadas. No caso de marcação homogênea, são avaliados pelo menos 3 campos de grande aumento (CGA) randomicamente

selecionados (objetiva x 40), com o mínimo de visualização de 500 células e o ideal de 600 células (DOWSETT et al. 2011; FITZGIBBONS et al. 2014).

Em relação a interpretação do resultado, diferentes níveis de corte tem sido adotados, não havendo consenso na literatura em relação ao ponto de corte. Consideram-se tumores de baixo índice se valor de Ki67 inferior a 20%, alto índice se valor igual ou acima de 30%, de acordo com o consenso de *Saint Gallen* de 2015 (GNANT et al. 2015).

4.11.4 Análise das proteínas de genes alvo

A proteína ciclina D1 foi analisada através de percentual de células tumorais coradas, com utilização de ponto de corte de 10%, de acordo com a literatura (LI et al. 2011; RAVIKUMAR e ANANTHAMURTHY 2014).

A análise de Bcl-2 foi realizada em percentual, sendo considerados tumores com imunoexpressão abaixo de 10% negativos, e a partir de 10%, positivos para Bcl-2 (CALLAGY et al. 2006, 2008; DAWSON et al. 2010).

Em relação à interpretação do *status* das proteínas p21 e survivina, observou-se ausência de consenso na literatura, sendo evidenciados diferentes ponto de corte, ou utilização de escores heterogêneos. Optou-se, portanto, pela descrição do percentual de células tumorais coradas, identificação da localização intracelular da imunomarcacão e sua intensidade (ausente, fraca, moderada e intensa). Os pontos de corte para cada marcador foram definidos de acordo com construção de curva ROC para determinação do valor de melhor sensibilidade e especificidade para a recidiva.

4.11.5 Receptores Notch

Considerando a ausência de padronização na literatura validada para interpretar coloração por imuno-histoquímica dos receptores Notch 1, 2 e 3, 4, e Notch 1 ativado, os valores foram expressos registrando-se o local na célula da imunorreação (membranar, citoplasmática, nuclear), a intensidade da marcação e o percentual de células tumorais coradas. Construiu-se uma curva ROC para definição de ponto de corte do percentual de células coradas de melhor sensibilidade e especificidade em relação à recidiva.

Na tentativa de se obter um escore único, utilizou-se o *histoscore*, calculado através do produto entre o percentual de células coradas e a intensidade da imunomarcação (1, 2 ou 3), variando, portanto, de 0 a 300 (MCCARTY et al. 1986), com seu ponto de corte também definido por uma curva ROC.

4.12 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR

Os tumores foram classificados nos grupos: luminal A, luminal B, luminal B - HER2 positivo; luminal não especificado (Ki67 na faixa indeterminada entre 20 e 30%); HER2 hiperexpresso e triplo-negativo. A classificação foi através de imuno-histoquímica, em correlação à classificação molecular de acordo com o perfil de expressão gênica, com os parâmetros classificados no quadro 3, de acordo com o consenso de Saint Gallen de 2015 (COATES et al. 2015).

Quadro 3 - Imunofenótipo dos subtipos moleculares de câncer de mama classificados pelos receptores hormonais, Her2 e Ki-67.

Subtipos Moleculares	Imunofenótipo
Luminal A	- RE positivo; - RP positivo $\geq 20\%$; - HER2 negativo; - Ki67 $< 20\%$.
Luminal B	- RE e/ou RP positivo; - RP $< 20\%$ ou Ki67 $\geq 30\%$; - HER2 negativo.
Luminal B HER2 positivo	- RE e/ou RP positivos; - HER2 positivo
Luminal não especificado	- RE positivo; - RP positivo $\geq 20\%$; - HER2 negativo; - Ki67 $\geq 20\%$ e $< 30\%$
HER2 hiperexpresso	- HER2 positivo (não-luminal)
Triplo negativo	- RE e RP ausentes, HER2 negativo

4.13 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma análise descritiva da população foi realizada, com os dados coletados pelas fichas, através dos prontuários médicos. Os dados foram organizados, tabulados no *Microsoft Office Excel for Mac* 2011 e submetidos a tratamento estatístico através do programa *Statistical Package for the Social Science* (SPSS) versão 17.0 para Windows no qual as análises foram realizadas adotando-se um nível de significância (erro alfa) de 5%.

Para os marcadores quantitativamente expressos em forma de percentual de células marcadas foi traçado um ponto de corte por meio da construção de curvas ROC (sensibilidade e especificidade) tendo como desfecho a presença ou ausência de recidiva da lesão para categorização em lesões apresentando baixa e alta imunoexpressão de cada um dos marcadores avaliados.

Os dados categóricos foram expressos em forma de frequência absoluta e percentual e por meio dos testes exato de Fisher/Qui-quadrado de Pearson realizou-se a comparação dos números de pacientes com e sem recidiva e as variáveis de análise desse estudo. Foram construídas curvas de sobrevida de Kaplan-Meier do tempo livre de doença (recidiva) e avaliou-se a influência dos fatores clínicos, histopatológicos e fenotípicos nessas curvas por meio do teste de Log Rank Mantel Cox.

Foi utilizado um modelo de regressão logística com modelagem *stepwise forward selection* a partir de todas as variáveis que apresentaram nível de significância inferior a 0,200 para modelo de regressão de sobrevida

de Cox. O modelo foi repetido excluindo consecutivamente as variáveis significante e independentemente associadas ao tempo livre de doença com a finalidade de evidenciar os fatores de primeira, segunda, terceira ordem, e assim por diante, associados a modificação das curvas de sobrevida até não haver mais fatores independentemente associados ao desfecho deste estudo.

4.14 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a execução desta pesquisa, o projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer do Ceará, e do A.C.Camargo Cancer Center, que estão submetidos às regras da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP/Conselho Nacional de Saúde (resolução 466/2012), com número de aprovação 851.298.

Utilizou-se o Termo de Fiel Depositário, considerando que não houve nenhuma intervenção direta nas pacientes inclusas, apenas análise de amostras histológicas de pacientes cujo tratamento já foi concluído.

5 RESULTADOS

5.1 AMOSTRA

Ao todo, 1.331 pacientes foram identificadas no Instituto do Câncer do Ceará após busca no registro hospitalar e no livro de cirurgias, dentre as quais obteve-se acesso ao prontuário de 1.266 delas. Aplicou-se os critérios de inclusão e exclusão, identificando-se 244 pacientes do Instituto do Câncer do Ceará aptas para o estudo.

A maioria das exclusões, 34,9%, ocorreu por estadiamento fora do intervalo dos critérios utilizados (pT1N0 e pT2pN0), exemplificadas por carcinomas *in situ*, axila positiva, T3 ou T4; seguido de pacientes cujo tratamento cirúrgico foi realizado fora do ICC, em 25,15% dos casos; tumorectomia prévia, em 17,05% dos casos; perda de seguimento, em 10,5% dos casos; terapia neoadjuvante, realizada em 5,2% das pacientes excluídas, e tumores bilaterais em 3,4% dos casos. As demais exclusões, perfazendo 3,5% do total, ocorreram por ausência de informações nos prontuários, blocos de parafina não disponíveis, não conclusão do tratamento proposto, outros tumores primários, óbito por outra causa, câncer de mama masculino, e tumor de mama do tipo não carcinoma (linfoma, filodes maligno ou sarcoma mamário).

Dentre as 244 pacientes do Instituto do Câncer do Ceará aptas ao estudo, foram identificados 62 casos de recidiva tumoral. Após exclusão dos

casos onde os blocos não foram localizados e também dos casos onde, após revisão de lâmina, o componente invasor apresentava-se escasso para utilização, restaram 36 casos de recidiva no Instituto do Câncer do Ceará.

Em análise de banco de dados do A.C. Camargo Cancer Center, com aplicação dos mesmos critérios de inclusão e exclusão, foram identificados 23 casos de recidiva tumoral. Foi realizada busca de material histológico no arquivo com exclusão de 2 casos por bloco de parafina não identificado.

Ao todo, 57 pacientes que sofreram recidiva foram estudadas, identificadas como grupo caso (36 pacientes, perfazendo 63,16% do grupo caso pertencentes ao ICC e 21 pacientes, 36,84% do grupo, tratadas no A.C. Camargo Cancer Center).

Após completar-se o grupo caso, realizou-se pareamento com 113 pacientes do grupo controle, com evolução favorável da doença, por estadiamento, idade e *status* de receptor de estrógeno, tendo sido todas deste grupo tratadas no ICC, totalizando 170 pacientes.

5.2 PERFIL CLÍNICO-PATOLÓGICO

A idade média das pacientes foi 55 ± 1 anos de idade, não diferindo significativamente entre os grupos sem recidiva (56 ± 1) e com recidiva (55 ± 1) ($p=0,859$).

A maioria das pacientes da amostra, 92,9%, apresentavam carcinoma invasor do tipo não especial (carcinoma ductal infiltrante), sem diferença significativa entre grupos caso e controle ($p=0,244$). O estágio patológico

entre os grupos não variou de forma significativa, sendo a maioria classificada como pT1 ($p = 0,902$). As pacientes do grupo caso, com recidiva, apresentaram maior grau histológico quando comparadas ao grupo controle ($p = 0,005$). As características clínicas e histológicas estão descritas na Tabela 1.

5.3 EVOLUÇÃO E SEGUIMENTO

O tempo de seguimento (mediana) foi de 72 meses, sendo no grupo de pacientes controle de 96 meses, variando entre 48 e 132 meses. No grupo de pacientes recidivadas, o primeiro evento de recidiva ocorreu em média 31 meses após a data do diagnóstico, com variação entre 7 e 144 meses.

Dentre as pacientes recidivadas, 61,4% apresentou o primeiro foco de recidiva à distância, comparado com 38,6% das paciente que apresentaram recidiva locorregional. O principal sítio metastático foi ósseo, em 51,3% dos casos, seguido de metástase pleuropulmonar, em 25,6%, hepática, em 12,8% das pacientes, e em sistema nervoso central, em 7,7% dos casos.

A análise de pacientes com recidiva apontou que a maioria das pacientes (42,1%) apresentaram morte por câncer, estando 33,3% vivas, porém com doença em atividade, e 24,6% sem sinais de neoplasia detectáveis.

5.4 PERFIL TERAPÊUTICO

Os grupos caso e controle analisados apresentaram homogeneidade a respeito de terapia cirúrgica realizada, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia, sem diferenças estatisticamente significativas (Tabela 2).

Metade das pacientes realizaram mastectomia, não havendo diferenças significativas comparando-se taxa de biopsia de linfonodo sentinela, dissecação axilar e número de linfonodos dissecados.

A quimioterapia foi realizada em 70% do total de casos, 69% do grupo controle e 70,9% do grupo caso ($p = 0,12$). O regime mais utilizado foi a base de adriamicina ou epirrubicina associado a ciclofosfamida, em 53 pacientes (45,7%), seguido de CMF em 32 pacientes (27,6%). Não houve diferenças significativas entre o grupo caso e controle ($p = 0,294$). Dentre as pacientes que realizaram quimioterapia, 96,6% concluíram o tratamento, 98,7% no grupo controle e 92,7% no grupo caso, sem diferenças estatisticamente significativas ($p = 0,12$) (Tabela 3).

Tabela 1 - Caracterização clínico-patológica dos 170 casos de câncer de mama com e sem recidiva tratadas no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C. Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

		Recidiva		
	Total	Não	Sim	<i>p</i>
Idade				
Até 55 anos	86	58	28	0,786
	50,6%	51,3%	49,1%	
Mais de 55 anos	84	55	29	
	49,4%	48,7%	50,9%	
Tipo histológico				
Ductal	158	104	54	0,244
	92,9%	92,0%	94,7%	
Lobular	5	5	0	
	2,9%	4,4%	,0%	
Outros	7	4	3	
	4,1%	3,5%	5,3%	
Estadiamento patológico				
pT1a	7	5	2	0,902
	4,1%	4,4%	3,5%	
pT1b	21	13	8	
	12,4%	11,5%	14,0%	
pT1c	65	45	20	
	38,2%	39,8%	35,1%	
pT2	77	50	27	
	45,3%	44,2%	47,4%	
Grau histológico				
I	33	28	5	0,005
	19,4%	24,8%	8,8%	
II	75	49	26	
	44,1%	43,4%	45,6%	
III	41	19	22	
	24,1%	16,8%	38,6%	
Ignorado	21	17	4	
	12,4%	15,1%	7,0%	

Tabela 2 - Características do tratamento cirúrgico das pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticadas no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C. Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

		Recidiva			
	Total	Não	Sim	<i>p</i>	
Cirurgia realizada					
Mastectomia	85	57	28	1,000	
	50,0%	50,4%	49,1%		
Quadrante	85	56	29		
	50,0%	49,6%	50,9%		
Biopsia linfonodo sentinela					
Não realizada	32	20	12	0,353	
	18,82%	17,7%	18,2%		
Realizada	137	93	44		
	81,5%	82,3%	80,0%		
Ignorado	1	0	1	0,354	
	,6%	,0%	1,8%		
Linfadenectomia axilar					
Não realizada	129	87	42		0,354
	75,9%	77,0%	73,7%		
Realizada	40	26	14		
	23,5%	23,0%	24,6%		
Ignorado	1	0	1	0,933	
	,6%	,0%	1,8%		
Numero de linfonodos excisados					
Inferior a 10	4	3	1		0,933
	2,4%	2,7%	1,8%		
A partir de 10	35	23	12		
	20,6%	20,4%	21,1%		
Não se aplica	131	87	44	0,933	
	77,1%	77,0%	77,2%		

Dentre as 27 pacientes com Her-2 amplificado/superexpresso 13 foram submetidas a tratamento com trastuzumabe, representando 48,14% das pacientes com indicação de submissão ao tratamento. Este baixo percentual de pacientes tratadas deve-se ao fato de que o Sistema Único de Saúde (SUS), à época, não autorizava de rotina a utilização de trastuzumabe para tratamento de câncer de mama. Comparando-se os

grupos caso e controle, não houve diferença significativa entre o percentual de pacientes tratadas com trastuzumabe, perfazendo 8,9% e 7,1%, respectivamente ($p = 0,761$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Perfil terapêutico sistêmico realizado nas pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticadas no Hospital Haroldo Juaçaba no período e A.C.Camargo Cancer Center de 2001 a 2010 (n=170).

	Total	Recidiva		p
		Não	Sim	
Quimioterapia				
Não realizada	51 30,0%	35 31,0%	16 28,1%	0,697
Realizada	119 70,0%	78 69,0%	41 71,9%	
Quimioterapia completa				
Não	4 3,4%	1 1,3%	3 7,3%	0,120
Sim	114 96,6%	76 98,7%	38 92,7%	
Ignorado	1 ,6%	1 ,9%	0 ,0%	
Protocolo de quimioterapia				
FAC/FEC	24 20,7%	19 24,7%	5 12,8%	0,294
AC/EC	53 45,7%	35 45,5%	18 46,2%	
AC-T	7 6,0%	3 3,9%	4 10,3%	
CMF	32 27,6%	20 26,0%	12 30,8%	
Ignorado	3 1,8%	1 ,9%	2 3,5%	
Trastuzumabe				
Não	156 92,3%	105 92,9%	51 91,1%	0,761
Sim	13 7,7%	8 7,1%	5 8,9%	

A maioria das pacientes, 68,2%, realizou radioterapia, sendo 70,2% das pacientes do grupo caso tratadas e 67,3% do grupo controle. Esta diferença, no entanto, não foi estatisticamente significativa ($p = 0,70$) (Tabela 4). Todas as pacientes submetidas à radioterapia conseguiram concluir o tratamento proposto.

Não houve também diferença em relação à hormonioterapia entre os grupos estudados, sendo a maioria das pacientes tratadas (80,7% versus 84,1%, nos grupos caso e controle, respectivamente) ($p = 0,581$).

O protocolo de hormonioterapia mais utilizado foi o tamoxifeno, em 56,8% dos casos, seguido pelo *switch* (tamoxifeno seguido de anastrozol) em 22,3% das pacientes, e anastrozol isolado em 17,3% dos casos. Os grupos não diferiram considerando os múltiplos protocolos de hormonioterapia utilizados ($p = 0,234$).

Tabela 4 - Perfil terapêutico de radioterapia e hormonioterapia de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

		Recidiva		
	Total	Não	Sim	<i>p</i>
Radioterapia				
Não	54 31,8%	37 32,7%	17 29,8%	0,700
Sim	116 68,2%	76 67,3%	40 70,2%	
Hormonioterapia				
Não	29 17,1%	18 15,9%	11 19,3%	0,581
Sim	141 82,9%	95 84,1%	46 80,7%	
Protocolo de hormonioterapia				
Tamoxifeno	79 56,8%	48 51,6%	31 67,4%	0,234
Anastrozol	24 17,3%	17 18,3%	7 15,2%	
Switch	31 22,3%	25 26,9%	6 13,0%	
Outro	5 3,6%	3 3,2%	2 4,3%	
Ignorado	2 1,2%	2 1,8%	0 ,0%	

5.5 PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO

A maioria das pacientes, 81,2%, eram do subtipo luminal, enquanto 12,4% eram tumores triplo negativos e 6,5% do subtipo HER-2. Não houve diferenças estatisticamente significativas entre os subgrupos citados classificados por imuno-histoquímica, comparando-se pacientes com e sem recidiva.

A subclassificação dos luminais entre luminal A, luminal B, luminal B Her2, luminal não especificado (Ki67 entre 20 e 30%) também não evidenciou diferenças entre os grupos caso e controle, prevalecendo o subtipo luminal B (44,2% das pacientes dentre casos com subtipo luminal). Em 38 pacientes com subtipo luminal (22,35% da totalidade dos casos), não foi possível realizar a subclassificação entre os diferentes subgrupos (luminal A, luminal B, luminal B Her2 e luminal não especificado), tendo em vista ausência de informação de RP, Her2 e/ou Ki67.

Tabela 5 – Imunofenótipo do câncer de mama das pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Classificação	Total	Recidiva		p
		Não	Sim	
Luminal	138 81,2%	95 84,1%	43 75,4%	0,323
Triplo Negativo	21 12,4%	11 9,7%	10 17,5%	
HER2	11 6,5%	7 6,2%	4 7,0%	

5.6 RECEPTORES NOTCH

O receptor Notch 1 apresentou similar expressão em relação à localização celular, intensidade da marcação e percentual de células tumorais marcadas, não diferindo em relação ao *histoscore* entre grupos caso e controle (Tabela 11). Os pontos de corte para análise de percentual de células coradas (75%) e *histoscore* (130) foi definido após construção de curva ROC (Tabelas 12 e 13).

Tabela 6 - Imunoexpressão do receptor Notch 1 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

	Total*	Recidiva		p
		Não	Sim	
Notch 1 localização				
Ausente	1 0,7%	- -	1 2,1%	0,176
Citoplasmática	81 56,6%	49 51,6%	32 66,7%	
Nuclear	3 2,1%	3 3,2%	- -	
Nuclear e Membranar	34 23,8%	25 26,3%	9 18,8%	
Nuclear e Citoplasmática	24 16,8%	18 18,9%	6 12,5%	
Notch 1 intensidade				
Ausente	1 0,7%	- -	1 2,0%	0,278
Leve	54 37,8%	33 35,1%	21 42,9%	
Moderada	73 51,0%	49 52,1%	24 49,0%	
Forte	15 10,5%	12 12,8%	3 6,1%	
Notch 1 percentual				
Até 75%	62 43,4%	36 38,3%	26 53,1%	0,091
Mais de 75%	81 56,6%	58 61,7%	23 46,9%	
Notch 1 histoscore				
Até 130	66 46,2%	42 44,7%	24 49,0%	0,724
Mais de 130	77 53,8%	52 55,3%	25 51,0%	

*Em 9 casos (5,3%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA. Em 18 casos (10,6%), foi observada ausência de componente invasor significativo nesta amostra/lâmina específica do TMA.

Tabela 7 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 1 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (percentual de células Notch 1+)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
45,0	0,976	0,000	0,976
55,0	0,878	0,027	0,851
65,0	0,756	0,108	0,648
75,0*	0,537	0,365	0,172
85,0	0,268	0,757	-0,488

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

Tabela 8 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 1 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (histoscore Notch 1)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
45	0,976	0,000	0,976
55	0,902	0,014	0,889
65	0,805	0,054	0,751
75	0,732	0,176	0,556
85	0,634	0,324	0,310
95	0,585	0,419	0,166
110	0,561	0,432	0,129
130*	0,537	0,473	0,064
150	0,390	0,595	-0,204
170	0,244	0,824	-0,580
195	0,073	0,905	-0,832
225	0,073	0,919	-0,846
255	0,049	0,932	-0,884

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

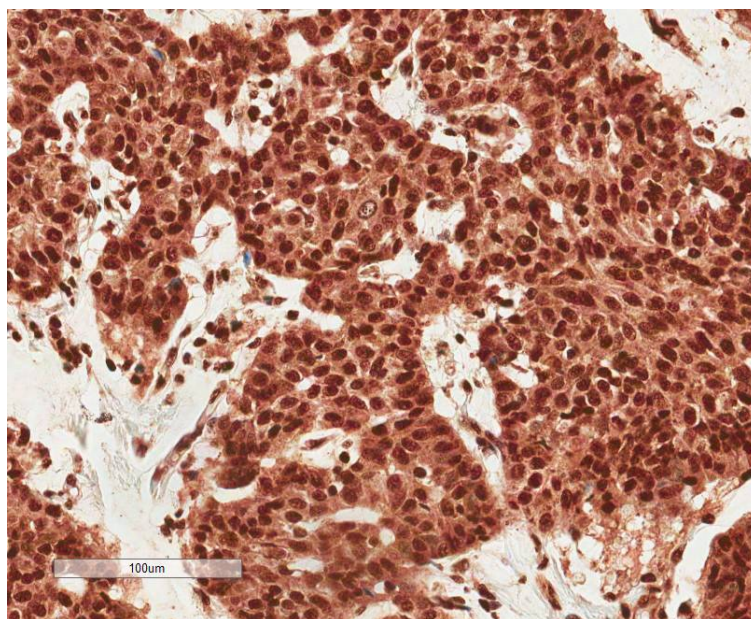


Figura 5 – Fotomicrografia da Imunoexpressão de receptor Notch 1 em carcinoma invasor da mama demonstrando co-expressão nuclear e citoplasmática (200x).

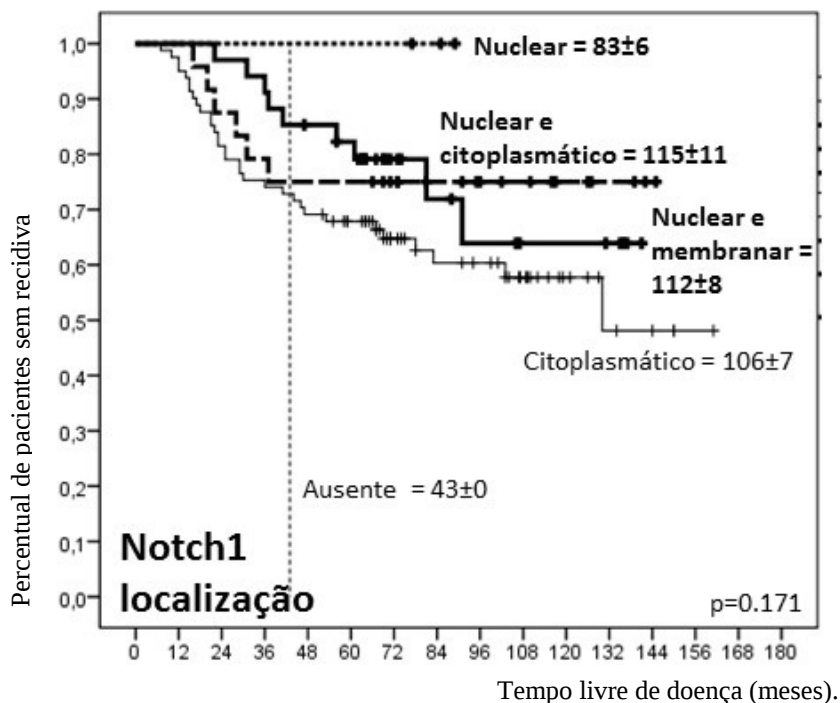


Figura 6 - Tempo livre de doença conforme a localização celular da imunoexpressão do receptor Notch 1 em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center.

A análise de expressão do receptor Notch 1 ativado não revelou diferenças entre os grupos caso e controle (Tabela 14). As análise de curva ROC do percentual de células coradas e histoscore está representada nas Tabelas 15 e 16, respectivamente.

Tabela 9 - Imunoexpressão do receptor Notch 1 ativado em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

		Recidiva			
	Total*	Não	Sim	p	
Notch 1 ativado localização					
Ausente	2 1,5%	2 2,2%	0 ,0%	0,557	
Citoplasmático	75 55,6%	50 56,2%	25 54,3%		
Membranar e citoplasmático	58 43,0%	37 41,6%	21 45,7%		
Notch 1 ativado intensidade					
Ausente	2 1,5%	2 2,2%	0 ,0%	0,600	
Leve	37 27,4%	23 25,8%	14 30,4%		
Moderada	64 47,4%	41 46,1%	23 50,0%		
Forte	32 23,7%	23 25,8%	9 19,6%		
Notch 1 ativado percentual					
Até 85%	92 68,1%	61 68,5%	31 67,4%		0,892
Mais de 85%	43 31,9%	28 31,5%	15 32,6%		
Notch 1 ativado <i>histoscore</i>					
Até 150	52 38,5%	34 38,2%	18 39,1%	0,916	
Mais de 150	83 61,5%	55 61,8%	28 60,9%		

*Em 28 casos (16,5%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA. Em 7 casos (4,1%), foi observada ausência de componente invasor significativo nesta amostra/lâmina específica do TMA.

Tabela 10 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 1 ativado como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (percentual de células Notch 1 ativado)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
25,0	1,000	0,014	0,986
55,0	1,000	0,041	0,959
65,0	1,000	0,122	0,878
75,0	0,805	0,270	0,535
85,0*	0,317	0,662	-0,345
92,5	0,024	0,973	-0,949

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

Tabela 11 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 1 ativado como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (histoscore Notch 1 ativado)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
25	1,000	0,014	0,986
55	1,000	0,027	0,973
65	1,000	0,108	0,892
75	0,902	0,176	0,727
85	0,780	0,270	0,510
95	0,683	0,297	0,386
120	0,683	0,311	0,372
150*	0,585	0,392	0,193
170	0,317	0,608	-0,291
210	0,195	0,784	-0,589
255	0,098	0,865	-0,767
278	0,024	0,973	-0,949

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

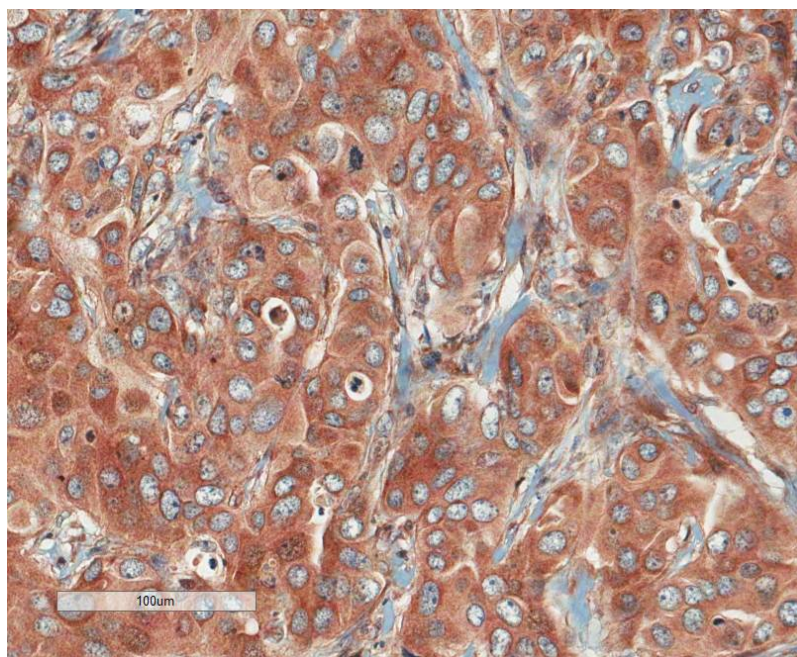


Figura 7 - Fotomicrografia da imunoexpressão citoplasmática forte e difusa do receptor Notch 1 ativado em carcinoma invasor da mama (200x).

O receptor Notch 2 apresentou localização celular e intensidade de marcação similares entre os grupos caso e controle. O percentual de células tumorais marcadas, no entanto, divergiu entre os grupos, sendo identificado maior percentual de imunomarcação em pacientes sem recidiva tumoral (Tabela 17 e Figura 15). Não houve diferenças estatisticamente significativas entre o *histoscore* dos grupos.

Tabela 12 - Imunoexpressão do receptor Notch 2 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

		Recidiva		
	Total*	Não	Sim	<i>p</i>
Notch 2 localização				
Ausente	6 4,5%	5 6,0%	1 2,1%	0,213
Citoplasmática	53 40,2%	30 35,7%	23 47,9%	
Membranar e citoplasmática	66 50,0%	46 54,8%	20 41,7%	
Nuclear e citoplasmática	7 5,3%	3 3,6%	4 8,3%	
Notch 2 intensidade				
Ausente	6 4,5%	5 6,0%	1 2,1%	0,470
Leve	59 44,7%	34 40,5%	25 52,1%	
Moderada	59 44,7%	39 46,4%	20 41,7%	
Forte	8 6,1%	6 7,1%	2 4,2%	
Notch 2 percentual				
Até 75%	58 43,9%	30 35,7%	28 58,3%	0,012
Mais de 75%	74 56,1%	54 64,3%	20 41,7%	
Notch 2 histoscore				
Até 105	66 50,0%	39 46,4%	27 56,3%	0,278
Mais de 105	66 50,0%	45 53,6%	21 43,8%	

*Em 25 casos (14,7%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA. Em 13 casos (7,7%), foi observada ausência de componente invasor significativo nesta amostra/lâmina específica do TMA.

O valor de ponto de corte do receptor Notch 2 para percentual de células marcadas e *histoscore* foi definido após construção de curva ROC, definido como 75% e 105, respectivamente (Tabelas 15 e 16).

Tabela 13 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 2 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (percentual de células Notch 2+)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
25,0	1,000	0,054	0,946
55,0	0,951	0,054	0,897
65,0	0,756	0,162	0,594
75,0*	0,488	0,365	0,123
85,0	0,195	0,797	-0,602

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

Tabela 14 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 2 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (histoscore Notch 2)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
25	10,000	0,054	0,946
55	0,951	0,054	0,897
65	0,829	0,135	0,694
75	0,707	0,257	0,451
85	0,610	0,392	0,218
105*	0,512	0,486	0,026
130	0,439	0,514	-0,074
150	0,293	0,595	-0,302
170	0,122	0,851	-0,729
210	0,049	0,932	-0,884
255	0,024	0,973	-0,949

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

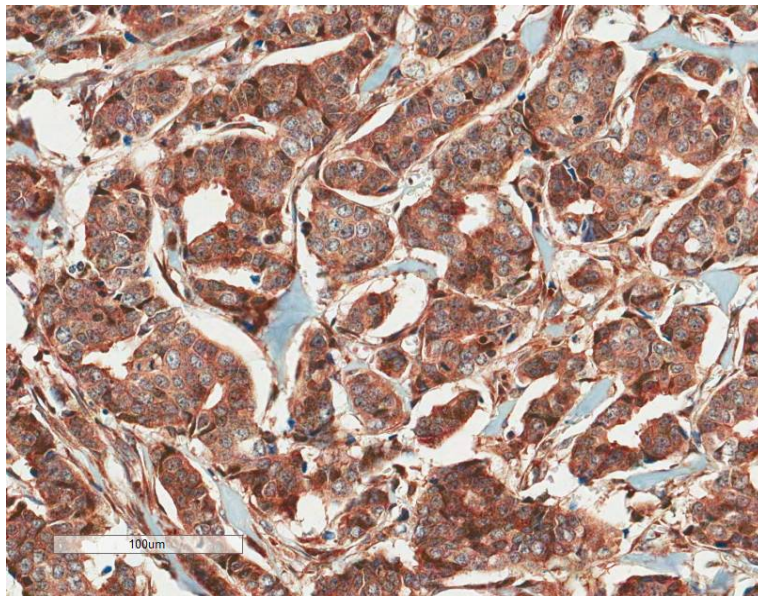


Figura 8 - Fotomicrografia Imunoexpressão citoplasmática forte e difusa do receptor Notch 2 em carcinoma invasor da mama (200x).

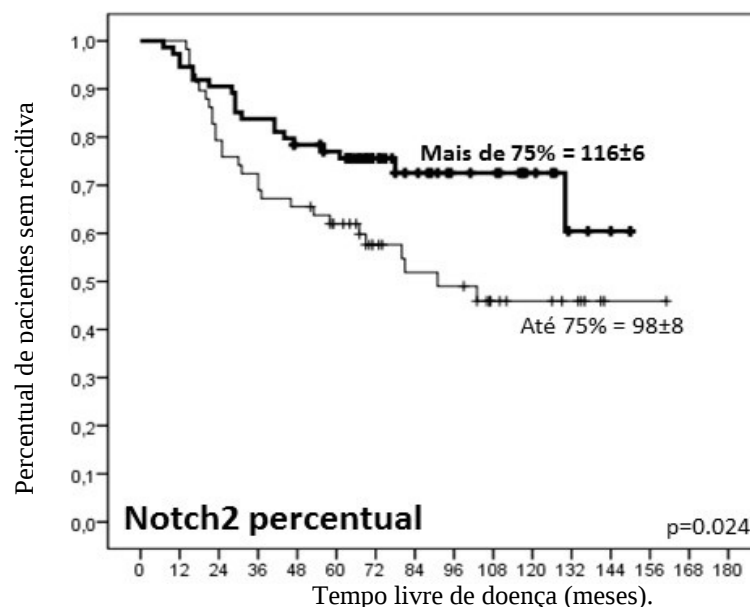


Figura 9 - Tempo livre de doença conforme o percentual de imunoexpressão de Notch 2 em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C.Camargo Cancer Center.

O receptor Notch 3 apresentou imunoexpressão homogênea entre os grupos, ao se comparar a localização celular, intensidade da marcação, percentual de células coradas e *histoscore* (Tabela 20).

O valor de ponto de corte do receptor Notch 3 para percentual de células marcadas e *histoscore* foi definido após construção de curva ROC (Tabelas 21 e 22).

Tabela 15 - Imunoexpressão do receptor Notch 3 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

	Total*	Recidiva		p
		Não	Sim	
Notch 3 localização				
Citoplasmática	59	41	18	0,334
	43,1%	46,1%	37,5%	
Membranar e citoplasmática	78	48	30	
	56,9%	53,9%	62,5%	
Notch 3 intensidade				
Leve	24	18	6	0,495
	17,4%	20,2%	12,2%	
Moderada	72	45	27	
	52,2%	50,6%	55,1%	
Forte	42	26	16	
	30,4%	29,2%	32,7%	
Notch 3 percentual				
Até 85%	94	61	33	0,886
	68,1%	68,5%	67,3%	
Mais de 85%	44	28	16	
	31,9%	31,5%	32,7%	
Notch 3 <i>histoscore</i>				
Até 165	74	49	25	0,649
	53,6%	55,1%	51,0%	
Mais de 165	64	40	24	
	46,4%	44,9%	49,0%	

*Em 20 casos (11,8%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA. Em 12 casos (7,0%), foi observada ausência de componente invasor significativo nesta amostra/lâmina específica do TMA.

Tabela 16 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 3 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (percentual de células Notch 3+)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
55,0	1,000	0,014	0,986
65,0	0,927	0,081	0,846
75,0	0,780	0,270	0,510
85,0*	0,341	0,635	-0,294

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

Tabela 17 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 3 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (histoscore Notch 3)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
55	1,000	0,014	0,986
65	0,951	0,027	0,924
75	0,902	0,054	0,848
85	0,902	0,122	0,781
105	0,902	0,189	0,713
130	0,878	0,230	0,648
150	0,829	0,378	0,451
165*	0,537	0,568	-0,031
175	0,488	0,568	-0,080
195	0,317	0,770	-0,453
225	0,268	0,784	-0,515
255	0,122	0,892	-0,770

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

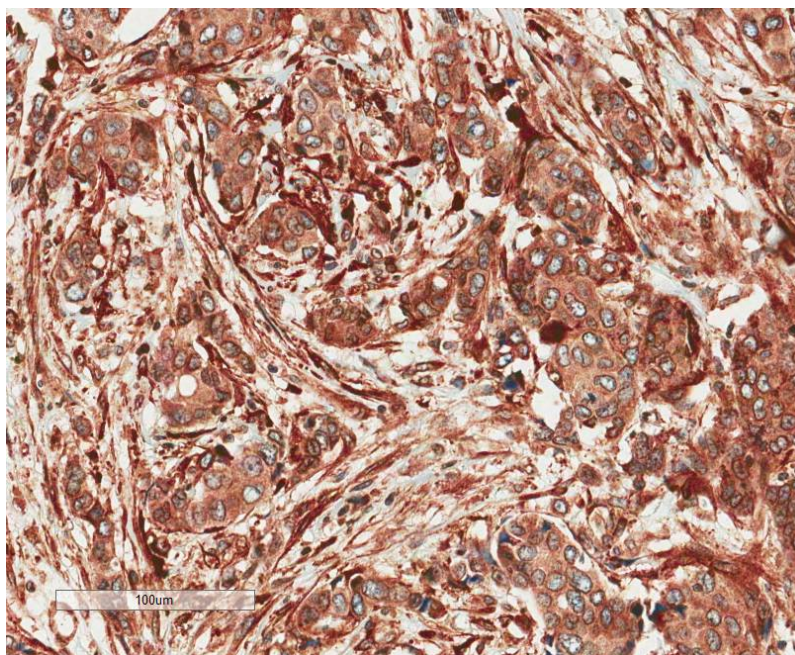


Figura 10 – Fotomicrografia da imunoexpressão citoplasmática forte e difusa de receptor Notch 3 em carcinoma invasor da mama e células estromais (200x).

Não houve diferenças estatisticamente significativas na expressão de Notch 4 entre pacientes com e sem recidiva tumoral (Tabelas 23, 24 e 25).

Tabela 18 - Imunoexpressão do receptor Notch 4 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

		Recidiva		
	Total*	Não	Sim	p
Notch 4 localização				
Ausente	9 6,3%	7 7,9%	2 3,8%	0,636
Membranar	1 0,7%	1 1,1%	- -	
Citoplasmática	39 27,5%	23 25,8%	16 30,2%	
Membranar e citoplasmática	93 65,5%	58 65,2%	35 66,0%	
Notch 4 intensidade				
Ausente	9 6,3%	7 7,9%	2 3,8%	0,406
Leve	86 60,6%	50 56,2%	36 67,9%	
Moderada	41 28,9%	27 30,3%	14 26,4%	
Forte	6 4,2%	5 5,6%	1 1,9%	
Notch 4 percentual				
Até 75%	76 53,5%	48 53,9%	28 52,8%	0,899
Mais de 75%	66 46,5%	41 46,1%	25 47,2%	
Notch 4 histoscore				
Até 85	82 57,7%	51 57,3%	31 58,5%	0,890
Mais de 85	60 42,3%	38 42,7%	22 41,5%	

*Em 9 casos (5,3%%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA. Em 19 casos (11,1%), foi observada ausência de componente invasor significativo nesta amostra/lâmina específica do TMA.

Tabela 19 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para Notch 4 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (percentual de células Notch 4+)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
20,0	1,000	0,068	0,932
45,0	1,000	0,108	0,892
55,0	0,878	0,149	0,729
65,0	0,756	0,324	0,432
75,0*	0,488	0,527	-0,039
85,0	0,244	0,824	-0,580

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

Tabela 20 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de histoscore para Notch 4 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

Valores preditores (histoscore Notch 4)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
20	1,000	0,068	0,932
45	1,000	0,108	0,892
55	0,878	0,135	0,743
65	0,780	0,257	0,524
75	0,561	0,378	0,183
85*	0,439	0,527	-0,088
95	0,293	0,608	-0,315
110	0,293	0,622	-0,329
130	0,268	0,676	-0,407
150	0,220	0,743	-0,524
170	0,098	0,851	-0,754
195	0,024	0,932	-0,908
225	0,024	0,946	-0,922
255	0,024	0,986	-0,962

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

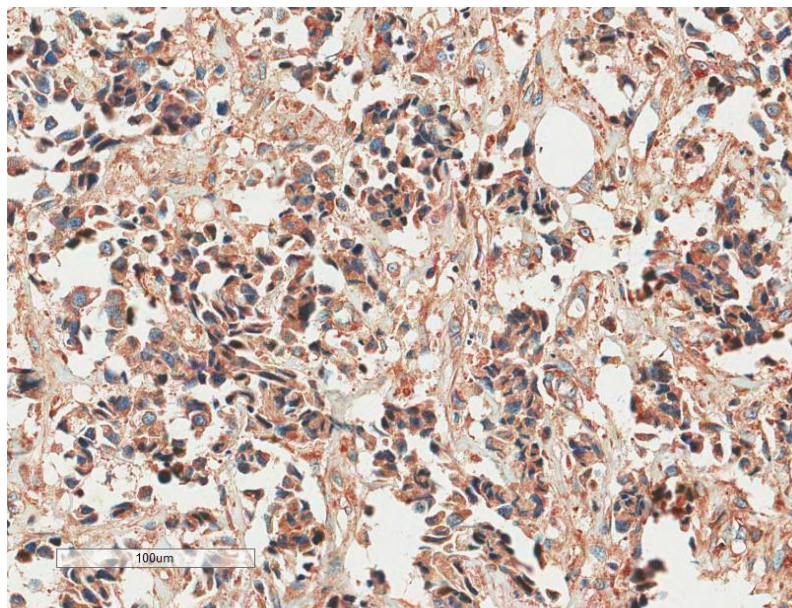


Figura 11 – Fotomicrografia da imunoexpressão citoplasmática do receptor Notch 4 em carcinoma invasor da mama. (200x)

5.7 ANÁLISE DAS PROTEÍNAS DE GENES ALVO

A maioria dos tumores expressou a proteína survivina (84,7% da amostra), sendo o principal sítio celular da expressão o citoplasma. Não houve diferenças em relação à localização celular da expressão da survivina ($p = 0,942$).

Tabela 21 - Frequências dos padrões de imunexpressão da proteína Survivina em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

	Total**	Recidiva		p
		Não	Sim	
Survivina padrão				
Ausente	4 2,7%	2 2,1%	2 3,8%	0,942
Citoplasma	89 60,1%	57 60,0%	32 60,4%	
Nuclear	23 15,5%	15 15,8%	8 15,1%	
Ambos	32 21,6%	21 22,1%	11 20,8%	
Survivina intensidade				
Ausente	4 2,7%	2 2,1%	2 3,8%	0,021
Fraca	73 49,3%	53* 55,8%	20 37,7%	
Moderada	62 41,9%	38 40,0%	24 45,3%	
Forte	9 6,1%	2 2,1%	7* 13,2%	
Survivina percentual TMA				
Até 50%	109 73,6%	77 81,1%	32 60,4%	0,006
Mais de 50%	39 26,4%	18 18,9%	21 39,6%	

*p<0,05, teste X² ou exato de Fisher. Dados expressos em forma de frequência absoluta e percentual.

**Em 14 casos (8,2%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA. Em 8 casos (4,7%), foi observada ausência de componente invasor significativo nesta amostra/lâmina específica do TMA.

Ao se analisar o percentual de células coradas, foi construída uma curva ROC para estudo de ponto de corte de melhor sensibilidade, especificidade em relação à recidiva, com definição do ponto de corte de 50% para survivina. Excluindo-se as amostras onde o percentual de imunomarcção de survivina foi ignorado (campo vazio no TMA ou ausência de componente invasor naquela amostra), observou-se que tumores de pacientes com recidiva apresentaram maior expressão de survivina (18,9% vs. 39,6%; $p = 0,006$), de acordo com a Tabela 6. Na figura 6, observa-se que pacientes que expressaram survivina em mais de 50% das células tumorais apresentaram menor tempo livre de doença, em análise univariada.

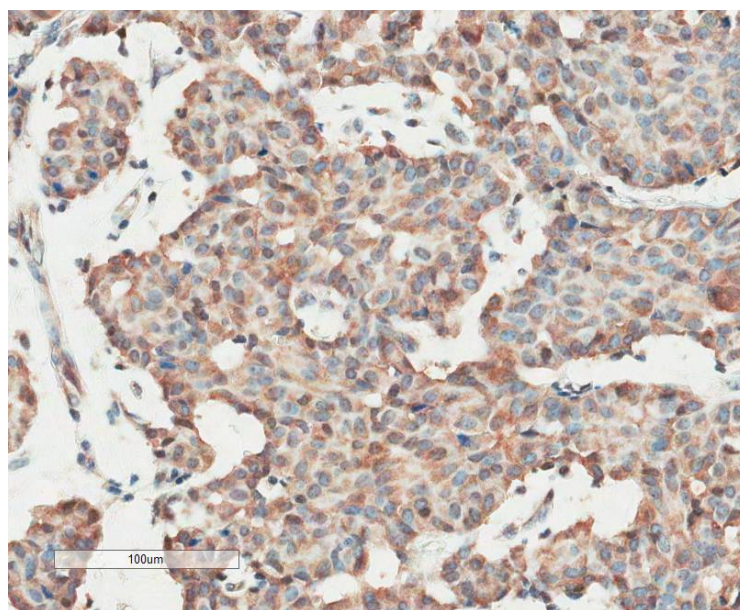


Figura 12 - Fotomicrografia da imunoexpressão citoplasmática da proteína survivina no câncer invasivo da mama (200x).

Tabela 22 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para survivina como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center entre 2001 e 2010.

Valores preditores (percentual de células survivina +)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
5,0	0,962	0,021	-0,941
15,0	0,943	0,116	-0,828
25,0	0,849	0,295	-0,554
35,0	0,755	0,505	-0,249
45,0*	0,585	0,642	0,057
55,0*	0,396	0,811	0,414
65,0	0,226	0,895	0,668
75,0	0,113	0,916	0,803
85,0	0,019	0,968	0,950
95,0	0,000	0,989	0,989

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

Analisando-se a intensidade da marcação da survivina nas células tumorais, observou-se que tumores de pacientes com recidiva apresentaram maior percentual de expressão intensa comparada a pacientes sem recidiva 13,2% vs. 2,1%, sendo maior o percentual de tumores pacientes com imunomarcacão de intensidade fraca nas pacientes sem recidiva, 55,8% vs. 37,7% ($p=0,021$) (Tabela 6). Na Figura 7, observa-se que, em análise univariada, pacientes que expressaram survivina em forte intensidade apresentaram menor tempo livre de doença quando comparado a pacientes que expressaram em intensidade fraca e moderada.

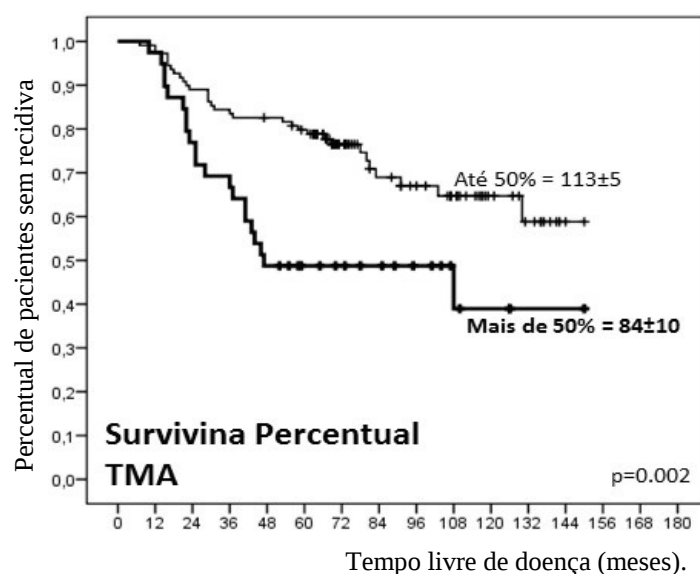


Figura 13 - Tempo livre de doença conforme o percentual de imunoeexpressão de survivina em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C. Camargo Cancer Center.

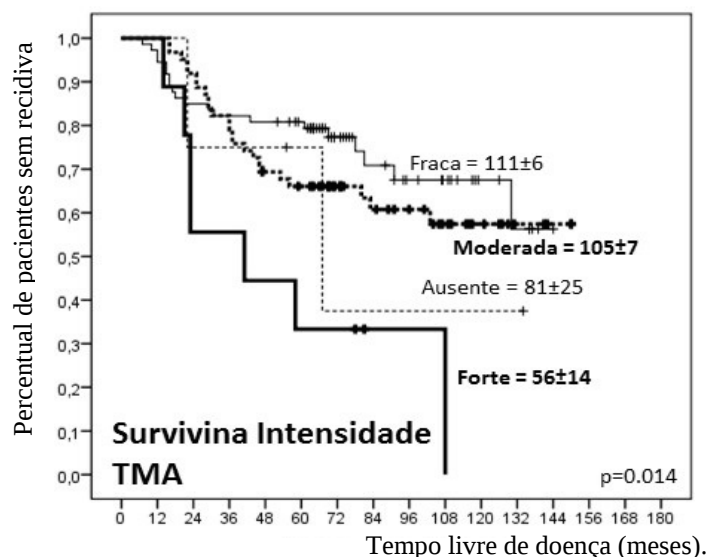


Figura 14 - Tempo livre de doença conforme a intensidade da imunomarcacão da survivina em pacientes com diagnóstico de câncer de mama tratadas entre 2001 e 2010 no Instituto do Câncer do Ceará e A.C. Camargo Cancer Center

Não houve diferenças na expressão de ciclina D1 e Bcl2 entre paciente com e sem recidiva tumoral (Tabela 8).

Tabela 23 - Imunoexpressão de Ciclina D1 e Bcl2 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

	Total	Recidiva		p
		Não	Sim	
Ciclina D1*				
Inferior a 10%	26 20,8%	18 22,2%	8 18,2%	0,498
A partir de 10%	99 79,2%	63 77,8%	36 81,8%	
Bcl2**				
Inferior a 10%	84 66,7%	57 70,4%	27 60,0%	0,198
A partir de 10%	42 33,3%	24 29,6%	18 40,0%	

*Em 32 casos (18,8%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA de Ciclina D1, e em 13 casos (7,6%), foi observada ausência de componente invasor significativo naquela amostra/lâmina específica do TMA de ciclina D1.

**Em 33 pacientes (19,4%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA de Bcl2, e em 11 pacientes (6,5%) 13 casos (7,6%), foi observada ausência de componente invasor significativo naquela amostra/lâmina específica do TMA de Bcl2.

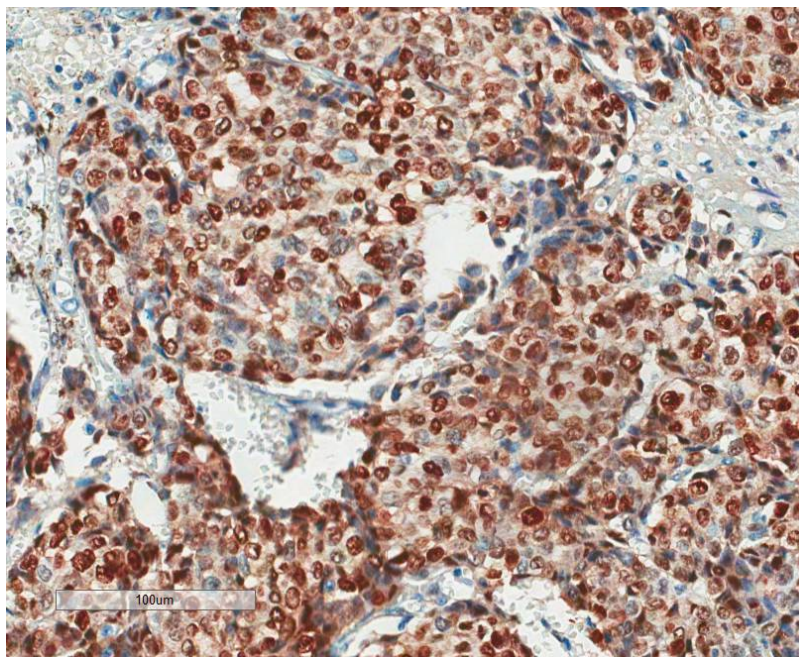


Figura 15 - Fotomicrografia da imunoexpressão nuclear forte e difusa da proteína Ciclina D1 no carcinoma invasor da mama (200x).

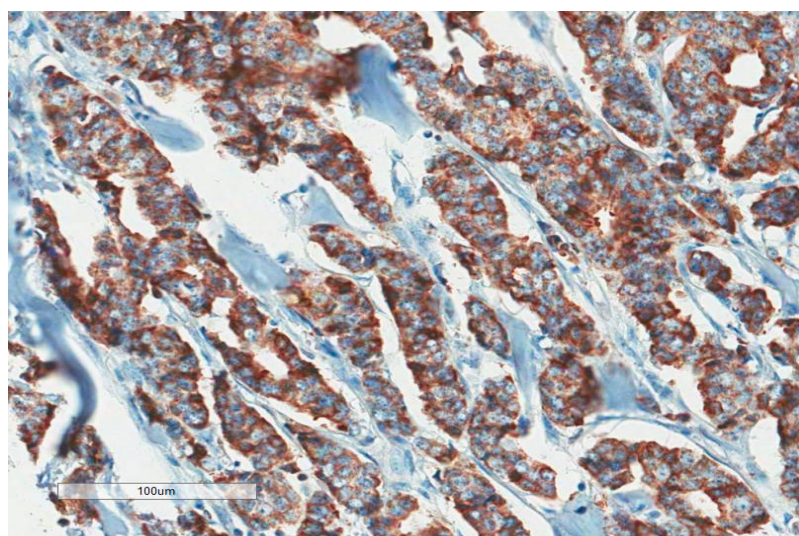


Figura 16 - Fotomicrografia da imunoexpressão citoplasmática forte e difusa da proteína Bcl2 no carcinoma invasor da mama (200x).

A expressão de p21 foi analisada em percentual de células tumorais apresentando imunorreação, sendo construída uma curva ROC para definição do ponto de corte de 5% (Tabela 9). Não foram identificadas diferenças na expressão de p21 entre os grupos caso e controle ($p = 0,091$) (Tabela 10).

Tabela 24 - Construção de curva ROC para encontrar ponto de corte de percentual de positivas para p21 como marcador preditor de recidiva de câncer de mama em pacientes diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center entre 2001 e 2010.

Valores preditores (percentual de células p21 +)	Sensibilidade	Especificidade	Sensibilidade - especificidade
0,5	0,938	0,170	-0,767
2,0	0,479	0,568	0,089
4,0*	0,479	0,580	0,100
7,5	0,313	0,818	0,506
12,5	0,167	0,898	0,731
17,5	0,167	0,909	0,742
25,0	0,063	0,955	0,892
35,0	0,021	0,977	0,956

*Valores ótimos são considerados aqueles com melhores sensibilidade e especificidade.

Tabela 25 - Imunoexpressão de p21 em tumores de pacientes com câncer de mama com e sem recidiva diagnosticados e tratados no Hospital Haroldo Juaçaba e A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010.

	Total	Recidiva		p-Valor
		Não	Sim	
p21*				
Até 5%	107 77,5%	74 82,2%	33 68,8%	0,091
Mais de 5%	31 22,5%	16 17,8%	15 31,3%	

*Em 18 casos (10,6%), foi identificado campo ausente nesta lâmina de TMA.
Em 14 casos (8,2%), foi observada ausência de componente invasor significativo nesta amostra/lâmina específica do TMA.

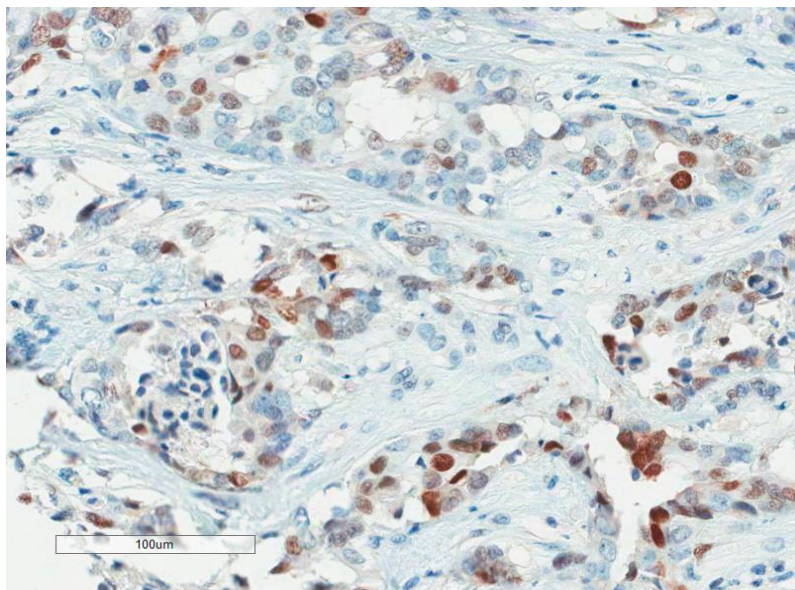


Figura 17 - Fotomicrografia da imunoexpressão fraca nuclear com intensidade heterogênea da proteína p21 no carcinoma invasor da mama (200x).

5.8 ANÁLISE MULTIVARIADA

Em análise multivariada com regressão logística de sobrevivência de Cox, variáveis com $p < 0.200$ foram utilizadas com a finalidade de evidenciar os fatores de primeira ordem independentemente associados ao tempo livre de doença, com identificação de grau histológico e intensidade de imunomarcção da survivina associados de forma estatisticamente significativa a aumento de recidiva (OR 2,108; $p = 0,007$ e OR 1,850; $p = 0,023$). Já a localização celular nuclear do receptor Notch 1 esteve associada como fator protetor (OR 0,631; $p = 0,038$). No segundo modelo excluíram-se as variáveis com associação significativa no modelo 1 com a finalidade de evidenciar os fatores de segunda ordem independentemente

associados ao tempo livre de doença. Nesta análise, o maior percentual de expressão da survivina surgiu como fator associado a maior possibilidade de recidiva (OR 2,290; $p=0,016$). No terceiro modelo não houve fatores independentemente associados ao tempo livre de doença (Tabela 26).

Tabela 26 - Modelo de regressão de sobrevida de Cox de pacientes diagnosticados e tratados por carcinoma mamário invasivo no Hospital Haroldo Juaçaba e Hospital A.C.Camargo Cancer Center no período de 2001 a 2010 (n=170).

	p-Valor	OR Ajustada
Modelo 1		
Grau histológico	*0,007	2,108
Survivina intensidade TMA	*0,023	1,850
Survivina percentual (ponto de corte 50%)	0,100	1,876
Classificação molecular	0,263	1,126
Bcl2	0,179	1,717
p21	0,312	1,481
Notch 1 localização	*0,038	0,631
Notch 1 percentual (ponto de corte 75%)	0,461	0,754
Notch 2 localização	0,291	1,255
Notch 2 percentual (ponto de corte 75%)	0,634	0,829
Modelo 2		
Survivina percentual (ponto de corte 50%)	*0,016	2,290
Classificação molecular	0,093	1,170
Bcl2	0,109	1,784
p21	0,590	1,221
Notch 1 percentual (ponto de corte 75%)	0,672	0,855
Notch 2 localização	0,707	0,944
Notch 2 percentual (ponto de corte 75%)	0,228	0,637
Modelo 3		
Classificação molecular	0,241	1,107
Bcl2	0,154	1,658
p21	0,396	1,371
Notch 1 percentual (ponto de corte 75%)	0,715	0,868
Notch 2 localização	0,540	0,910
Notch 2 percentual (ponto de corte 75%)	0,282	0,662

Modelo de regressão de sobrevida de Cox. No primeiro modelo as variáveis com $p<0,200$ foram utilizadas com a finalidade de evidenciar os fatores de primeira ordem independentemente associados ao tempo livre de doença. No segundo modelo excluíram-se as variáveis com associação significativa no modelo 1 com a finalidade de evidenciar os fatores de segunda ordem independentemente associados ao tempo livre de doença. No terceiro modelo não houve fatores independentemente associados ao tempo livre de doença.

6 DISCUSSÃO

O forte impacto global do câncer de mama impõe-se como uma realidade inquestionável. O tumor mais frequente entre mulheres preocupa por ser a principal causa de óbito por câncer entre elas (FERLAY et al. 2015). Na luta pela sobrevivência, a principal ferramenta é, sem dúvida, o diagnóstico inicial, pois a sobrevida em tumores de estágio inicial é superior a 98% em cinco anos, de acordo com dados do *National Cancer Institute-NCI* (HOWLADER et al. 2016). O diagnóstico de uma recidiva tumoral, após o tratamento de um câncer de mama em estágio inicial é, portanto, pouco esperado, levando a uma grande frustração para o médico e, principalmente, para sua paciente, vide a perspectiva de cura anterior otimista. Identificar pacientes com câncer de mama em estágio inicial com maior potencial de recidiva é fundamental para otimizar o tratamento da neoplasia mamária.

Em contrapartida, o *overtreatment*, ou o tratamento excessivo do câncer de mama, têm sido questionado, principalmente após o estabelecimento amplo do rastreamento mamográfico, responsável pelo aumento significativo do diagnóstico de tumores de mama em estágio inicial (WELCH et al. 2016). Interroga-se a possibilidade de, caso não tratados, muitos destes tumores jamais evoluírem para metástases, sem impacto real na sobrevida da paciente. Neste raciocínio, é possível que inúmeras pacientes tenham sido submetidas a tratamentos agressivos como mutilações cirúrgicas, quimioterapias e radioterapias potencialmente

desnecessárias para este grupo restrito. Se confirmado, o custo humano e financeiro do *overtreatment* no câncer de mama precisa ser considerado. Há, portanto, uma clara necessidade de identificar pacientes neste heterogêneo universo de tumores de mama em estágio inicial que apresentam pior prognóstico, diferenciando-as daquelas que potencialmente não se beneficiariam de tratamentos agressivos. Neste cenário, vê-se proliferar a busca por novas ferramentas prognósticas e preditivas que auxiliassem na tomada de decisões no tratamento do câncer de mama.

Historicamente, as principais decisões terapêuticas para o câncer de mama eram baseadas apenas em critérios clínicos e morfológicos, como idade da paciente, tamanho do tumor, *status* linfonodal e grau histológico. O estudo dos receptores hormonais representou um marco no tratamento da neoplasia mamária, com importante valor prognóstico e, principalmente, preditivo de resposta à hormonioterapia. Considerada a primeira terapia-alvo, a hormonioterapia trouxe importante impacto na sobrevida, levando a um universo em expansão de novas possibilidades terapêuticas com baixíssima taxa de complicações, comparada às opções mais tóxicas de quimioterapia (ORVIETO e VIALE 2002; EBCTCG 2011).

A partir daí, uma sequência de novos marcadores prognósticos para o câncer de mama foi evidenciada, culminando com a classificação molecular do câncer de mama, consequente do estudo de expressão gênica tumoral, hoje importante ferramenta prognóstica e preditiva de resposta à quimioterapia (MARKOPOULOS et al. 2017). Confirmou-se, neste ponto, que o câncer de mama é uma doença amplamente heterogênea, reunindo

inúmeras afecções distintas, com aspectos epidemiológico, clínico, morfológico, prognóstico e terapêutico diversos, todas acolhidas sob o mesmo nome (REIS-FILHO e PUSZTAI 2011; WEIGELT et al. 2011).

Na ampla pesquisa de novos marcadores para o câncer de mama, foi observada, com entusiasmo, a via de sinalização Notch, por exercer essencial função regulatória na população de células-tronco tumorais, que são cruciais para carcinogênese mamária, atuando como protagonistas dos mecanismos de recidiva do câncer de mama (MA et al. 2011). Ela tem sido apontada como potencial fator prognóstico no câncer de mama, com atuação também relevante nos mecanismos de resistência a múltiplas modalidades terapêuticas (LEONG et al. 2006).

Optou-se, no presente estudo, por pesquisar a imunoexpressão da via Notch enfocando uma população valiosa entre pacientes com câncer de mama, pois tratam-se de tumores com estágio inicial (pT1pN0 ou pT2pN0) que evoluíram com recidiva tumoral, apesar das improváveis taxas de recidiva esperadas em pacientes nestes estágios. A amostra destacou-se também pela homogeneidade entre os grupos caso e controle em relação ao perfil clínico-patológico e terapêutico. Mesmo havendo pacientes selecionadas em um amplo período (entre 2001 e 2010), não houve, por exemplo, diferenças entre os diversos protocolos de quimioterapia aplicados, que se modificaram muito ao longo dos anos.

A via Notch desempenha um papel predominantemente oncogênico em várias malignidades, incluindo o câncer de mama, de acordo com a literatura (REEDIJK et al. 2005, KLINAKIS et al. 2006, ALIMIRAH et al.

2007). Dentre os receptores Notch, o receptor Notch 1 é até o momento o mais investigado em sua correlação potencial com a carcinogênese mamária. Vários estudos avaliaram o significado prognóstico da expressão de Notch 1 no câncer de mama (MA et al. 2011; YAO et al. 2011; ZHU et al. 2013; CAO et al. 2014; YUAN et al. 2015). Utilizando 21 artigos envolvendo 3.867 pacientes, uma metanálise publicada sobre o tema revelou que a expressão de Notch 1 foi significativamente maior no câncer de mama do que nos tecidos normais (OR = 7,21; IC95%, 4,7-11,07), e que uma maior expressão de Notch 1 foi associada à transição de carcinoma ductal *in situ* para carcinoma invasivo (OR = 3,75; IC 95% 1,8-7,78). Observou-se nesta metanálise maior atividade de Notch 1 no subtipo basal de câncer de mama (OR = 2,53; IC95% 1,18-5,43). Os pacientes com superexpressão de Notch 1 apresentaram, nessa metanálise, uma pior sobrevida global e livre de recorrência, com avaliações incluindo os métodos de imuno-histoquímico, ELISA ou pesquisa de RNA (YUAN et al. 2015).

ZHAO et al. (2016) analisou a expressão de Notch 1 em 171 amostras de pacientes com câncer de mama por imuno-histoquímico, utilizando a técnica de TMA. Foi observada associação entre maior expressão de receptor Notch 1 e pior sobrevida livre de recorrência.

Não foram identificadas na amostra diferenças entre a taxa de imunoexpressão de Notch 1 nos grupos caso e controle. ZARDAWI et al. (2010) também não identificou associação prognóstica na expressão de notch 1 avaliada por imuno-histoquímica utilizando TMA. No entanto, em análise multivariada, observou-se que tumores com localização nuclear de

Notch 1 apresentaram menor taxa de recidiva comparada à localização citoplasmática ou membranar. Observa-se imunorreação isoladamente citoplasmática em 56,6% dos casos, nuclear isolada em 2,1%, nuclear e membranar simultâneas em 23,8%, e nuclear e citoplasmática simultâneas em 16,8% das pacientes.

São poucos os estudos que se referem à localização celular da imunorreação com Notch 1. YAO et al. (2011) estudou 48 casos de neoplasia mamária: 36 carcinomas invasivos e 12 não invasivos. A expressão do receptor Notch 1 foi principalmente citoplasmática (52%) em comparação com membranar (27%) ou coloração nuclear (6%). Os marcadores de Notch foram então correlacionados com fatores prognósticos conhecidos do câncer da mama. Foi observado que os tumores RE positivo expressavam Notch 1 com maior frequência na membrana. Na análise univariada, o Ki67 associou-se de forma significativa com a expressão nuclear de Notch 1. No entanto, na análise multivariada esta associação não foi confirmada, sendo evidenciada apenas a associação entre expressão citoplasmática de Notch 1 e *status* linfonodal mais avançado (YAO et al. 2011).

SPEISER et al. (2012) demonstrou, especificamente em tumores triplo negativos, o achado de imunorreatividade nuclear e citoplasmática simultânea em 64% dos casos, e apenas imunorreatividade citoplasmática em 36% dos casos. Não havendo casos demonstrando imunorreatividade membranar ou nuclear isoladas. Não foi investigada, no estudo em questão, associação entre a localização celular da imunorreação e o prognóstico

(SPEISER et al. 2012). RIZZO et al. (2008) demonstrou que células tumorais mamárias tratadas com estrógeno apresentaram níveis elevados de receptor Notch 1 membranar, e níveis relativamente baixos de Notch citoplasmático e nuclear. Enquanto células privadas de estrógeno ou tratadas com tamoxifeno apresentaram menor expressão em intensidade de Notch. No estudo de YAO et al. (2011), foi observado que tumores RE positivo apresentaram reação membranar de Notch mais significativa comparados ao grupo RE negativo, sugerindo que a via estrogênica tende a acumular Notch 1 na membrana celular.

Estudos anteriores postulam que no caso da sinalização Notch, a localização celular é potencialmente uma ilustração morfológica de sua função, o que pode ser mais informativo do que a descrição da simples intensidade ou percentual de imunomarcação das células tumorais (REEDJIK et al. 2005; YAO et al. 2011). Desta forma, a localização perinuclear de Notch provavelmente representaria receptores recentemente sintetizados, pós maturação no retículo endoplasmático, o Notch membranar representaria o receptor Notch maduro ainda não ativado, enquanto a localização nuclear representaria o receptor Notch ativo (RIZZO et al. 2008). Na literatura, ressalta-se que o receptor Notch no núcleo é rapidamente fosforilado, ubiquitinado e degradado, e raramente se acumula no núcleo (RIZZO et al. 2008; YAO et al. 2011).

O número de casos em que se observa o receptor Notch 1 expresso isoladamente no núcleo foi limitado (3 pacientes). No entanto, foi intrigante a significativa diferença prognóstica encontrada, sendo observado melhor

prognóstico nestes casos. Até o momento desta análise, este foi o primeiro estudo a demonstrar a associação entre a expressão exclusivamente nuclear de Notch 1 e a recidiva tumoral, utilizando-se a base de dados PubMed, com os descritores “*notch receptors*” e “*breast neoplasms*”, pesquisando-se artigos completos publicados na língua inglesa. Ressalta-se a necessidade de estudos multicêntricos prospectivos randomizados que abordem a localização intracelular como potencial fator prognóstico no câncer de mama.

O receptor Notch 1 ativado representa a porção intracelular do receptor Notch liberada após clivagens sucessivas na membrana. Este receptor ativado é transportado ao núcleo onde atinge os genes alvo. Em teoria, a análise do receptor Notch ativado poderia ser um marcador mais apropriado da atividade do receptor Notch 1. Nesta amostra, a expressão do receptor Notch 1 ativado foi a mesma entre grupos caso e controle. Analisando carcinomas mamários invasivos por, utilizando a técnica de TMA, e um anticorpo com referência idêntica ao utilizado nesta amostra, ERCAM et al. (2012) e CAO et al. (2014) observaram que maior expressão do receptor Notch 1 ativado estava associada a pior prognóstico. Em análise de carcinomas mamários *in situ*, FARNIE et al. (2007) demonstrou que maior expressão de Notch 1 ativado foi preditora de recorrência precoce.

Usualmente, o receptor Notch 2 não é expresso em células epiteliais mamárias normais. No entanto, contrariamente aos demais receptores Notch, demonstrou-se que a maior expressão de Notch 2 esteve associada a melhor sobrevida em pacientes com câncer de mama, com sua elevada

expressão associada a tumores melhor diferenciados (PARR et al. 2004). Estes dados dão suporte ao modelo intrigante onde a ativação de Notch 2 corresponde a uma queda na agressividade tumoral. O'NEILL et al. (2007) demonstrou que o domínio intracelular de Notch 2 ativado constitutivamente em linhagens celulares de adenocarcinoma humano MDA-MB-231 aumentou a apoptose *in vitro*. O receptor Notch 2 ativado suprimiu o crescimento tumoral, reduzindo em 60% os tumores, que foram significativamente menores e mais necróticos. Estes resultados demonstram que a sinalização Notch 2 é um potente inibidor de sinal da carcinogênese humana mamária (GUO et al. 2011).

Em análise univariada, identificou-se associação inversa entre imunexpressão de Notch 2 e recidiva. Esta associação, no entanto, não foi confirmada após análise multivariada. Os achados estão de acordo com a literatura, que associa maior expressão de Notch 2 a um melhor prognóstico (PARR et al. 2004), possivelmente em consequência ao aumento da apoptose *in vitro* (O'NEILL et al. 2007). XU et al. (2016), analisaram mRNA em tumores mamários, associando também a maior expressão de Notch 2 com melhor prognóstico, especialmente em tumores de mama RE positivo (XU et al. 2016). Investigando o receptor Notch 2 por através de TMA, FLORENA et al. (2007), evidenciou associação positiva entre a expressão de Notch 2 e Her2.

Foi demonstrado que a regulação positiva (*upregulation*) de Notch 3 em glândulas mamárias levou ao desenvolvimento de tumores mamários, sugerindo que o Notch 3 apresenta potenciais transformadores *in vivo*

(PARR et al. 2004). YAMAGUCHI et al. (2008) identificou a expressão de domínios intracelulares de Notch 1 e Notch 3 na maioria das linhagens celulares de câncer de mama. A sinalização Notch 3 ativou a transcrição mediada por CSL nestas células. Há estudo demonstrando associação positiva entre Notch 3 e a atividade de osteoblastos (ZHANG et al. 2010). Além disso, lesões osteolíticas foram significativamente reduzidas após inoculação de células com expressão de Notch 3 constitutivamente reduzida. Estes resultados sugerem que o Notch 3 está possivelmente associado a formação de metástases ósseas (GUO et al. 2011).

Não foram identificadas diferenças na expressão dos receptores Notch 3 entre os grupos caso e controle. A literatura aponta este receptor como associado a prognóstico desfavorável para o câncer de mama (REEDJIK et al. 2005; ZHANG et al. 2010). GU et al. (2016), associou também a expressão de Notch 3 à quimiorresistência a antracíclicos, e demonstrou que pacientes com tumores RE positivo e com menor expressão de Notch 3 apresentaram pior sobrevida livre de recorrência à distância (GU et al. 2016). A análise de MA et al. (2011) indica que a expressão de Notch 3 é maior em pacientes com baixa taxa de expressão de Notch 1.

Alterações genéticas de Notch 4 que levaram a níveis desregulados do receptor Notch 4 intracelular ativado representam mutações de ganho de função associadas à carcinogênese mamária (JHAPPAN et al. 1992; GALLAHAN et al. 1996). Notch 4 também foi associado à subversão da morfogênese epitelial normal e à promoção da invasão da matriz extracelular. Além disso, o Notch 4 aumentou significativamente o potencial

tumorigênico *in vitro* de células epiteliais mamárias através da alteração de suas propriedades morfogênicas (SORIANO et al. 2000; CALLAHAN et al. 2001).

Nesta amostra, não houve expressão diferenciada do receptor Notch 4 entre pacientes com e sem recidiva tumoral. Já YAO et al. (2011) demonstrou associação de maior imunoexpressão de Notch 4 e indicadores de pior prognóstico em carcinomas mamários invasivos, como Ki67. Analisando a imunoexpressão do receptor Notch 4 em tumores triplo-negativos, SPEISER et al. (2012) também identificou associação de Notch 4 a fatores de pior prognóstico, como Ki67 e grau histológico.

Destaca-se como principal resultado encontrado neste estudo a maior imunoexpressão da survivina, proteína de gene alvo da via de sinalização Notch, entre pacientes que apresentaram recidiva do câncer de mama. A survivina, expressa na fase G2-M do ciclo celular, apresenta função antiapoptótica, atuando também no controle da divisão celular e na promoção da angiogênese (RYAN et al. 2006). Esta proteína encontra-se expressa em múltiplos tumores malignos, como câncer de mama, colorretal, pulmão, gástrico, hepático, melanoma e linfoma, frequentemente associada a pior prognóstico (AMBROSINI et al. 1997; REED et al. 2000; ATHANASSIADOU et al. 2011), e geralmente não se expressa em tecidos humanos normais (YOUSSEF et al. 2008). No entanto, apesar de exibir um elevado grau de expressão tumoral específica, e ainda ser um dos 16 genes associados ao câncer contemplados no teste Oncotype DX, o papel da survivina como um marcador do câncer de mama persiste tema de extenso

debate (PAIK et al. 2004), sendo seu papel prognóstico na literatura ainda ambíguo a respeito da neoplasia mamária (TANAKA et al. 2000; KENNEDY et al. 2003; O'DRISCOLL et al. 2003; SPAN et al. 2004).

Nesta amostra, mais de 97% das pacientes apresentaram alguma expressão de survivina, e em quase 27% delas esta expressão foi em mais de 50% das células tumorais. Foi demonstrado que pacientes com recidiva tumoral expressaram a proteína survivina tanto em maior percentual de células tumorais, quanto em intensidade mais forte, comparando-se a pacientes sem recidiva tumoral, após análise multivariada. Os resultados encontrados estão de acordo com recente metanálise publicada (LI et al. 2014), onde, após a análise de 23 estudos, totalizando 3.259 pacientes com câncer de mama, foi demonstrado que pacientes com maior expressão de survivina apresentaram marcadamente um maior risco de recorrência e pior sobrevida global. Os achados de associação prognóstica identificados na metanálise de LI et al. (2014) foram observados independente do método utilizado, seja por imuno-histoquímica ou RT-PCR, tendo a maioria dos estudos utilizado a imuno-histoquímica. LI et al. (2014) demonstraram também que pacientes com câncer de mama em estágios mais avançados e com metástases linfonodais apresentaram maiores expressões da survivina, dado não avaliado na amostra tendo em vista termos estudado apenas tumores de mama em estágio inicial.

HINNIS et al. (2007) avaliaram 165 amostras de tumores de pacientes que morreram por câncer de mama, investigando a expressão de survivina por imuno-histoquímica. A survivina apresentou-se como um fator

prognóstico independente associado a pior sobrevida em pacientes com câncer de mama (HINNIS et al. 2007). YOUSSEF et al. (2008) observou maior expressão de survivina em tumores de mama de estadiamento mais avançado, maior índice de Ki67, e sem expressão de receptores hormonais. YAKIREVICH et al. (2012) associaram maior expressão de survivina em tumores de mama de alto risco, com particular prevalência em tumores basais. Analisando apenas carcinomas mamários triplo-negativos, ZHANG et al. (2014) demonstraram associação da expressão de survivina a pior sobrevida global e sobrevida livre de doença em carcinomas mamários invasivos. Nesta amostra, os achados de associação prognóstica entre maior expressão de survivina e recidiva foram independentes da classificação por imuno-histoquímica dos subtipos moleculares de câncer de mama.

O ponto de corte utilizado para definição de tumores com superexpressão de survivina é amplamente heterogêneo na literatura. Há registros da utilização de variados escores de diferentes graduações correlacionando-se tanto o percentual de células tumorais com expressão de survivina quanto a intensidade da imunomarcacão (HINNIS et al. 2007; AL-JOUDI et al. 2007; YOUSSEF et al. 2008; PETRARCA et al. 2011; YAKIREVICH et al. 2012; SARTI et al. 2013; ZHAO et al. 2014), e também a utilização de pontos de corte específicos do percentual de expressão, variando entre 20% (LIN et al. 2013) e 50% (LO MUZIO et al. 2003; ZHANG et al. 2013). Considerando tal heterogeneidade, uma curva ROC foi confeccionada para identificar o valor de corte com melhor sensibilidade e

especificidade associado ao desfecho, e optou-se por avaliar de forma independente a intensidade da imunomarcação. O valor encontrado, 50%, coincide com os utilizados por LO MUZIO et al. (2003) e ZHANG et al. (2013).

Observou-se imunomarcação de survivina tanto no núcleo quanto no citoplasma das células tumorais, sendo expressa predominantemente no citoplasma, em concordância com os achados de SPAN et al. (2004) e ZHAO et al. (2014). A localização celular da survivina no presente estudo não diferiu entre os grupos caso e controle.

Na literatura, as evidências a respeito da localização da expressão da survivina dentro da célula tumoral e sua relação com o prognóstico são conflitantes (KENNEDY et al. 2003; BRENNAN et al. 2008; REXHEPAJ et al. 2010). Alguns estudos sugerem que a elevada taxa de expressão citoplasmática de survivina e baixos níveis de expressão nuclear estão associados a pior prognóstico (KENNEDY et al. 2003), enquanto outros estudos sugerem o oposto (BRENNAN et al. 2008; REXHEPAJ et al. 2010), ou reportam ausência de associação prognóstica. Já SARTI et al. (2013) identificaram isoladamente a expressão nuclear de survivina como fator de pior prognóstico no câncer de mama, apresentando forte associação com o subtipo triplo-negativo. Em recente metanálise, foi demonstrado que a localização citoplasmática da survivina esteve associada a maior risco de recidiva, enquanto que a localização nuclear não apresentou associação prognóstica significativa (LI et al. 2014). O número de publicações incluídas na metanálise que analisam a localização intracelular da survivina é, no

entanto, restrito, com uma ampla heterogeneidade de resultados, impedindo a metanálise em questão de ser conclusiva sobre o assunto (LI et al. 2014).

Questiona-se o diferente impacto da survivina no prognóstico de acordo com a localização celular. Tal fato pode ser causado pela ação efetiva da survivina citoplasmática no bloqueio da apoptose, quando é fosforilada para ligação à caspase processada. Já a survivina nuclear estaria associada à regulação da proliferação celular (SWANA et al. 1999; MOON e TARNAWSKI 2003; NASSAR et al. 2008). Algumas publicações sugerem que uma mudança absoluta ou percentual da localização intracelular da survivina pode impactar a agressividade das células tumorais (O'DRISCOLL et al. 2003; QI et al. 2009).

Há ainda descrição na literatura de diferentes isoformas da survivina, que podem apresentar funções celulares diferentes, justificando a disparidade dos resultados encontrados nos estudos. MAHOTKA et al. (1999) descreveu a existência de dois novos transcritos diferentes de survivina, denominados survivina-deltaEx3 e survivina-2B em células humanas, sem no entanto demonstrar associação prognóstica. Adicionalmente, foram descritas as formas survivina-3B e survivina-2A, que apresentaram valor prognóstico em análise multivariada (SPAN et al. 2006).

Atribui-se à survivina não apenas o papel prognóstico no câncer de mama, mas também o papel de preditor de resposta à quimioterapia neoadjuvante. PETRARCA et al. (2011) identificou associação entre maior expressão de survivina e a presença de resposta patológica completa em pacientes com câncer de mama estágios II e III, após quimioterapia

neoadjuvante. Este papel preditor de resposta à quimioterapia foi demonstrado tanto em regimes com antracíclicos (BOIDOT et al. 2009; ZHAO et al. 2014), quanto com docetaxel (LIN et al. 2013). Encontram-se em investigação potenciais terapias-alvo direcionadas a survivina (TSURUMA et al. 2004; HONMA et al. 2009; TANIOKA et al. 2011).

Bcl2 é uma proteína citoplasmática antiapoptótica que, inicialmente, foi descrita como protumorigênica (TSUJIMOTO et al. 1984). Estudos subsequentes descobriram que a função de Bcl2 nos diferentes tipos celulares era mais complexa, e incluía a inibição do crescimento de células tumorais, influenciando a entrada no ciclo celular (HOCKENBERY et al. 1990; PIETENPOL et al. 1994; O'REILLY et al. 1996; HUANG et al. 1997; GREIDER et al. 2002; ZINKEL et al. 2006). No câncer de mama, a função de Bcl2 é, portanto, diversa, incluindo papel na sinalização p53 (SILVESTRINI et al. 1994; QUINN et al. 1998), sobrevida celular (antiapoptótica) (HOCKENBERY et al. 1990), e controle do ciclo celular (HOCKENBERY et al. 1990; PIETENPOL et al. 1994; HUANG et al. 1997; ZINKEL et al. 2006).

Estudos apontam Bcl2 como marcador prognóstico no câncer de mama, demonstrando que pacientes com maior expressão da proteína apresentam, usualmente, prognóstico mais favorável frente a pacientes com câncer de mama sem expressão da proteína (HUANG et al. 1997; CALLAGY et al. 2006; KALLEL-BAYOUDH et al. 2011). Analisando a expressão de Bcl2 nos diferentes subgrupos moleculares do câncer de mama, EOM et al. (2016) identificou que a expressão de Bcl2 nos tumores luminais A correlacionou-se com melhor sobrevida livre de recorrência, e sobrevida

específica de doença em 5 anos. Este achado, no entanto, não foi evidenciado nos demais subtipos histológicos classificados por imuno-histoquímica (EOM et al. 2016).

Em tumores mamários triplo-negativos, os achados divergem, havendo controvérsias na literatura do papel prognóstico de Bcl2. Apesar da expressão de Bcl2 estar associada ao *status* do receptor de estrógeno, há relato de associação com prognóstico favorável em tumores RE negativos (DAWSON et al. 2010). Já BOUCHALOVA et al. (2015) demonstrou que tumores triplo-negativos que expressavam Bcl2 apresentaram pior sobrevida livre de doença.

A explicação para os antagônicos significados da expressão de Bcl2 nos diferentes subtipos moleculares de câncer de mama ainda não foi elucidada. Acredita-se que esta diferença possa ser causada pela interação de Bcl2 com outras proteínas como p27, Her3 e MDM4 em tumores positivos para Bcl2 (ABDEL-FATAH et al. 2013).

Apesar da literatura favorecer o valor prognóstico usualmente favorável de Bcl2, o presente estudo não evidenciou diferenças na expressão da proteína entre pacientes com e sem recidiva tumoral.

A ciclina D1, reguladora do ciclo celular essencial para a progressão através da fase G1, tem sido implicada na patogênese de inúmeros tumores humanos, incluindo o carcinoma invasor da mama (WANG et al. 2013). Sua atividade oncogênica está relacionada possivelmente à sua capacidade de influenciar na atividade proliferativa (CALDON et al. 2010).

Foi encontrada hiperexpressão da proteína em 79,2% de pacientes da

população estudada. A comparação deste valor de expressão com a literatura é dificultada pelos diferentes pontos de corte utilizados e diferentes anticorpos. Muitos estudos apontam uma expressão positiva de ciclina D1 em 65-70% dos tumores de mama, o que demonstra concordância com os resultados encontrados (ZHANG et al. 1994; ZUKERBERG et al. 1995; HWANG et al. 2003).

No atual estudo, não foram identificadas diferenças na expressão de ciclina D1 entre pacientes com e sem recidiva tumoral. Na literatura, há indícios de associação prognóstica de ciclina D1 em câncer de mama de diferentes formas. A maioria dos estudos apontam a ciclina D1 como fator prognóstico de forma amplamente heterogênea. A hiperexpressão de ciclina D1 e amplificação do gene de ciclina *CCDN1*, no entanto, apresentaram-se como um preditor de baixa resposta para terapia antiestrogênica (KENNY et al. 1999; PEURALA et al. 2013).

Contrariamente a estes dados, analisando-se apenas carcinomas mamários lobulares invasivos através da técnica de TMA, TOBIN et al. (2012) identificaram associação entre a superexpressão de ciclina D1 e maior risco de recidiva da doença. MYLONA et al. (2013) publicaram uma análise de 290 tumores de mama avaliados por imuno-histoquímica, correlacionando a expressão de ciclina D1 com melhor sobrevida global tanto em pacientes não selecionados, como em subgrupo triplo-negativo.

Em uma metanálise reunindo 33 estudos e 8.537 casos de câncer de mama, Xu et al. (2013) observaram que a expressão do gene *CCND1* apresentou associação prognóstica significativa apenas em câncer de mama

com receptor de estrógeno positivo, apontando pior sobrevida global neste grupo (XU et al. 2013).

Ahlin et al. (2017) analisaram a expressão nuclear de ciclina D1 por imuno-histoquímica em TMA em um estudo caso-controle de câncer de mama com axila negativa, identificando que uma maior expressão de ciclina D1 esteve associada a maior mortalidade em tumores mamários com positividade para receptor de estrógeno, sem nenhuma associação prognóstica nos tumores sem expressão estrogênica (AHLIN et al. 2017).

É evidente que as publicações sobre ciclina D1 apontam resultados conflitantes em relação ao prognóstico. Apesar da heterogeneidade, observa-se que o papel prognóstico da ciclina D1 tem forte relação com a expressão de receptor de estrógeno. É necessário portanto aprofundamento das pesquisas, em estudos prospectivos, para melhor elucidação do papel da ciclina D1.

A p21 é uma CKI implicada nos mecanismos de controle do ciclo celular que permitem a reparação do DNA. Ela bloqueia a transição do G1 à fase de S e suprime a proliferação celular. Parece estar relacionada à diferenciação celular em diversos modelos de tumores. Embora as mutações do gene *p21* sejam raras, a superexpressão da proteína p21 é vista frequentemente nos carcinomas de mama (JONG et al. 1999; HEIKKILA et al. 2000; BALASENTHIL et al. 2004).

Não foram identificadas diferenças na expressão imuno-histoquímica de p21 entre os grupos com e sem recidiva tumoral. Na literatura, a análise da expressão de p21 por imuno-histoquímica em carcinomas invasores da

mama e sua associação prognóstica é escassa, a maioria dos estudos fazem referência a tumores *in situ*, ou utilizam análise de expressão gênica. Já SOMLO et al. (2008) demonstraram que pacientes com baixa expressão proteica de p21 evoluíram com pior sobrevida global e livre de recorrência. Analisando especificamente carcinomas invasivos da mama em homens, através de imuno-histoquímica, KANTHAN et al. (2010) contrariamente identificaram que pacientes com maior expressão de p21 apresentaram pior sobrevida livre de recorrência. WEI et al. (2015) analisaram tanto a expressão proteica por imuno-histoquímica, quanto a expressão gênica de p21 em 65 amostras de câncer de mama. Foi identificada expressão de p21 positiva em 66,2% dos tumores, enquanto 44,6% apresentaram positividade para p21 no tecido adjacente não tumoral, diferença estatisticamente significativa. A expressão tumoral de p21 esteve associada a maior tamanho tumoral, maior grau histológico e metástases linfonodais. A análise multivariada identificou p21 como fator preditivo independente para sobrevida livre de doença, indicando pior prognóstico (WEI et al. 2015).

Houve dificuldades na execução deste estudo. Uma população específica, com critérios de inclusão e exclusão restritivos foi contemplada, o que levou a uma amostra inicialmente insuficiente. Para atingir a amostra planejada, foi necessário acréscimo somente de casos com recidiva do A.C.Camargo Cancer Center, utilizando-se os mesmos critérios de elegibilidade. Pacientes advindas de centros oncológicos distintos potencialmente poderiam levar à heterogeneidade da amostra. No entanto,

ao comparar-se os aspectos clínicos e histológicos, não foram identificadas diferenças entre os grupos caso e controle.

Optou-se pela avaliação da expressão dos marcadores por imuno-histoquímica, frente às demais técnicas. A imuno-histoquímica é relevante devido à sua praticidade ao se examinar material histológico em blocos embebidos em parafina, sem a necessidade de técnicas mais complexas de biologia molecular. Com amplo benefício pelos baixos custos, a imuno-histoquímica pode ser executada em centros de pesquisa de menor infraestrutura. O uso desta técnica nos permitiu também um importante ganho na investigação dos biomarcadores: a definição da localização intracelular, achado original neste estudo. Outra vantagem da análise por imuno-histoquímica é a possibilidade de armazenar a lâmina corada por amplo período, permitindo posteriores reavaliações. A técnica apresenta, no entanto, algumas limitações: trata-se de uma análise qualitativa, o que requer a interpretação de patologistas ou técnicos laboratoriais que podem dar laudos amplamente variáveis.

Ao confeccionar o TMA, apresentam-se perdas de amostras tumorais consideráveis, seja pela identificação de campo vazio ou ausência de componente invasor em dado corte do bloco de TMA. Tais perdas são, no entanto, inerentes à técnica (ILYAS et al. 2013). O percentual de perdas por campos vazios no TMA variou de 5,3% a 19,4% da amostra, entre os diferentes marcadores utilizados. Os percentuais estão próximos aos aceitáveis na literatura para esta técnica, que é entre 10 e 15 % (ILYAS et al. 2013). A utilização de blocos de parafina com mais de 10 anos certamente

contribui para a existência de maior percentual de campos vazios no TMA. A experiência técnica na execução do TMA também é um fator a ser considerado em casos de falhas (ILYAS et al. 2013). A ausência de componente invasor variou de 4,1% a 11,1 %, consequente da heterogeneidade intratumoral. Este estudo contou com patologistas dedicados à área de oncologia, e técnico em patologia com vasta experiência em pesquisa na execução de TMA.

Na análise dos marcadores, um dos grandes desafios encontrados foram os diferentes pontos de corte utilizados para as proteínas na literatura. Para minimizar o impacto deste problema, realizou-se a construção de uma curva ROC no intuito de identificar o melhor ponto de corte em relação a sensibilidade e especificidade daqueles marcadores com literatura mais indefinida.

Os resultados apresentados necessitam de confirmação através de estudos prospectivos, com uma amostra mais robusta, principalmente em relação à localização intracelular do receptor Notch 1. Ressalta-se a importância na padronizar os métodos, principalmente os pontos de corte utilizados nos novos marcadores, fundamental para a comparação dos dados, minimizando discrepâncias potenciais causadas por esta heterogeneidade. É necessário avaliar também os diferentes papéis da via Notch, considerando possíveis interações desta complexa via com outros marcadores, incluindo potenciais agonistas e antagonistas. A análise dos receptores e proteínas da via Notch individualizando-se os diferentes subgrupos moleculares do câncer de mama é uma natural perspectiva futura deste estudo.

7 CONCLUSÃO

A análise da imunoexpressão dos Receptores Notch 1, 2, 3, 4 e 5, e das proteínas Bcl-2, survivina, p21 e ciclina D1, em carcinomas invasores da mama nos estágios pT1pN0 ou pT2pN0 revelou maior expressão de survivina no grupo de pacientes com recidiva tumoral de câncer de mama frente às aquelas com evolução favorável. A expressão nuclear de Notch 1, nesta amostra, foi associada a menor taxa de recidiva tumoral. O receptor Notch 2 foi mais expresso em pacientes com evolução favorável da doença, em análise univariada, sugerindo tratar-se de um marcador de melhor prognóstico. A análise multivariada, no entanto, não confirmou esta associação. Os demais marcadores não apresentaram associação prognóstica. Os achados deste estudo foram independentes da classificação molecular baseada em imuno-histoquímica.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdel-Fatah TM, Perry C, Dickinson P, et al. Bcl2 is an independent prognostic marker in triple negative breast cancer (TNBC) and predicts response to anthracycline combination (ATC) chemotherapy (CT) in adjuvant and neoadjuvant settings. **Ann Oncol** 2013; 24:2801-7.

Acar A, Simões BM, Clarke RB, Brennan K. A Role for notch signaling in breast cancer and endocrine resistance. **Stem Cells Int** 2016; 2016:2498764.

Adamkov M, Halasova E, Kajo K, et al. Survivin: a promising biomarker in breast carcinoma. **Neoplasma** 2010; 57:572-77.

Al Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, et al. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:3983-98.

Al-Joudi FS, Iskandar ZA, Hasnan J, et al. Expression of surviving and its clinicopathological correlations in invasive ductal carcinoma of the breast. **Singapore Med J** 2007; 48:607-14.

Alimirah F, Panchanathan R, Davis FJ, et al. Restoration of p53 expression in human cancer cell lines upregulates the expression of Notch 1: implications for cancer cell fate determination after genotoxic stress. **Neoplasia** 2007; 9:427-34.

Altieri DC. Survivin, cancer networks and pathway-directed drug discovery. **Nat Rev Cancer** 2008; 8:61-70.

Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. **Nat Med** 1997; 3:917-21.

Androutsellis-Theotokis A, Leker RR, Soldner F, et al. Notch signalling regulates stem cell numbers in vitro and in vivo. **Nature** 2006; 442:823-26.

Arnold A, Papanikolaou A. Cyclin D1 in breast cancer pathogenesis. **J Clin Oncol** 2005; 23:4215-24.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. **Science** 1999; 284:770-6.

Athanassiadou AM, Patsouris E, Tsipis A, Gonidi M, Athanassiadou P. The significance of survivin and Nectin-4 expression in the prognosis of breast carcinoma. **Folia Histochem Cytobiol** 2011; 49:26-33.

Balasenthil S, Sahin AA, Barnes CJ, et al. p21-activated kinase-1 signaling mediates cyclin D1 expression in mammary epithelial and cancer cells. **J Biol Chem** 2004; 279:1422-8.

Basu A, Haldar S. The relationship between Bcl2, Bax and p53: consequences for cell cycle progression and cell death. **Mol Hum Reprod** 1998; 4:1099-109.

Bertucci F, Finetti P, Rougemont J, et al. Gene expression profiling for molecular characterization of inflammatory breast cancer and prediction of response to chemotherapy. **Cancer Res** 2004; 64:8558-855.

Bloom HJG. Prognosis in carcinoma of the breast. **Br J Cancer** 1950; 4:259-88.

Bloom HJG, Richardson WW. Histological grading and prognosis in breast cancer: a study of 1049 cases, of which 359 have been followed 15 years. **Br J Cancer** 1957; 11:359-77.

Boecker W, Moll R, Dervan P, et al. Usual ductal hyperplasia of the breast is a committed stem (progenitor) cell lesion distinct from atypical ductal hyperplasia and ductal carcinoma in situ. **J Pathol** 2002; 198:458-467.

Boidot R, Vegran F, Lizard-Nacol S. Predictive value of survivin alternative transcript expression in locally advanced breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy. **Int J Mol Med** 2009; 23:285-91.

Bouchalova K, Kharaishvili G, Bouchal J, et al. Triple negative breast cancer: BCL2 in prognosis and prediction. **Curr Drug Targets** 2014; 15:1166-75.

Bray SJ. Notch signalling: a simple pathway becomes complex. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2006; 7:678-89.

Breasted JH. **The Edwin Smith surgical papyrus. Classics of medicine library.** Chicago: University of Chicago Press; 1991.

Brennan DJ, Rexhepaj E, O'Brien SL, et al. Altered cytoplasmic-to- nuclear ratio of survivin is a prognostic indicator in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2008; 14:2681-9.

Caldon CE, Sutherland RL, Musgrove E. Cell cycle proteins in epithelial cell differentiation: implications for breast cancer. **Cell Cycle** 2010; 9:1918-28.

Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. **Clin Cancer Res** 2006; 12:2468-75.

Callahan R, Chestnut BA, Raafat A. Original Research: Featured Article: Imatinib mesylate (Gleevec) inhibits Notch and c-Myc signaling: five-day treatment permanently rescues mammary development. **Exp Biol Med** 2017; 242:53-67.

Callahan R, Raafat A. A Notch signaling in mammary gland tumorigenesis. **J Mammary Gland Biol Neoplasia** 2001; 6:23-36.

Cao YW, Li WQ, Wan GX, et al. Correlation and prognostic value of SIRT1 and Notch 1 signaling in breast cancer. **J Exp Clin Cancer Res** 2014; 33:97.

Casimiro MC, Crosariol M, Loro E, et al. ChIP sequencing of cyclin D1 reveals a transcriptional role in chromosomal instability in mice. **J Clin Invest** 2012; 122:833-43.

Cattoretti G, Becker MH, Key G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J Pathol** 1992; 168:357-63.

Chia S, Norris B, Speers C, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. **J Clin Oncol** 2008; 26:5697-704.

Christgen M, Ballmaier M, Bruchhardt H, et al. Identification of a distinct side population of cancer cells in the Cal-51 human breast carcinoma cell line. **Mol Cell Biochem** 2007; 306:201-21.

Chute JP, Muramoto GG, Whitesides J, et al. Inhibition of aldehyde dehydrogenase and retinoid signaling induces the expansion of human hematopoietic stem cells. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 31:11707-12.

Coates AS, Winer EP, Goldrich A, et al. Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Ann Oncol** 2015; 26:1533-46.

Curtis C, Shah SP, Chin SF, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. **Nature** 2012; 486:346-52.

Dang TP, Gazdar AF, Virmani AK, et al. Chromosome 19 translocation, overexpression of Notch3, and human lung cancer. **J Natl Cancer Inst** 2000; 92:1355-7.

Dawson SJ, Makretsov N, Blows FM, et al. BCL2 in breast cancer: a favourable prognostic marker across molecular subtypes and independent of adjuvant therapy received. **Br J Cancer** 2010; 103:668-75.

de Azambuja E, Cardoso F, de Castro Jr G, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. **Br J Cancer** 2007; 96:1504-13.

Denkert C, Budczies J, von Minckwitz G, et al. Strategies for developing Ki67 as a useful biomarker in breast cancer. **Breast** 2015; 24(Suppl. 2):S67-72.

De Ronde JJ, Hannemann J, Halfwerk H, et al. Concordance of clinical and molecular breast cancer subtyping in the context of preoperative chemotherapy response. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 119:119-26.

Dievart A, Beaulieu N, Jolicoeur P. Involvement of Notch 1 in the development of mouse mammary tumors. **Oncogene** 1999; 18: 5973-81.

Doane AS, Danso M, Lal P, et al. An estrogen receptor-negative breast cancer subset characterized by a hormonally regulated transcriptional program and response to androgen. **Oncogene** 2006; 25:3994-4008.

Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. **Genes Dev** 2003; 17:1253-70.

Dontu G, Jackson KW, et al. Role of notch signaling in cell-fate determination of human mammary stem/progenitor cells. **Breast Cancer Res** 2004; 6:R605-R15.

Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in Breast Cancer working group. **J Natl Cancer Inst** 2011; 103:1656-64.

Duffy MJ, Harbeck N, Nap M, et al. Clinical use of biomarkers in breast cancer: Updated guidelines from the European Group on Tumor Markers (EGTM). **Eur J Cancer** 2017; 75:284-298.

[EBCTCG] Early Breast Cancer Trialist Collaborative Group, Davies C, Godwin J, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomized trials. **Lancet** 2011; 378:771-84.

Efstratiadis A, Szabolcs M, Klinakis A. Notch, Myc and breast cancer. **Cell Cycle** 2007; 6:418-29.

Elashry-Stowers D, Zava DT, Speers WC, Edwards DP. Immunocytochemical localization of progesterone receptors in breast cancer with anti-human receptor monoclonal antibodies. **Cancer Res** 1988; 48:6462-74.

Elledge RM, Green S, Pugh R, et al. Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR) by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immune-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group study. **Int J Cancer** 2000; 89:111-7.

Ellisen LW, Bird J, West DC, et al. TAN-1, the human homolog of the *Drosophila* notch gene is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms. **Cell** 1991; 66:649-61.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factor 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.

Eom YH, Kim HS, Lee A, Song BJ, Chae BJ. BCL2 as a subtype-specific prognostic marker for breast cancer. **J Breast Cancer** 2016; 19:252-60.

Ercam C, Vermeulen JF, Hoefnagel L, et al. HIF-1 α and NOTCH signaling in ductal and lobular carcinomas of the breast. **Cell Oncol** 2012; 35:435-42.

Eroglu Z, Tagawa T, Somlo G. Human epidermal growth factor receptor (HER) family-targeted therapies in the treatment of HER2-overexpressing breast cancer. **Oncologist** 2014; 19:135-50.

Fantl V, Stamp G, Andrews A, et al. Mice lacking cyclin D1 are small and show defects in eye and mammary gland development. **Genes Dev** 1995, 9:2364-72.

Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. **Oncogene** 2005; 24:4660-71.

Farnie G, Clarke RB, Spence K, et al. Novel cell culture technique for primary ductal carcinoma in situ: role of Notch and epidermal growth factor receptor signaling pathways. **J Nat Cancer Inst** 2007; 99:616-27.

Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R, et al. Cancer incidence and mortality worldwide: Sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer** 2015; 136: E359–E86.

Fitzgibbons PL, Dillon DA, Alsabeh R, et al. Template for reporting results of biomarker testing of specimens from patients with carcinoma of the breast. **Arch Pathol Lab Med** 2014; 138:595-601.

Fletcher SW, Black W, Harris R, Rimer BK, Shapiro S. Report of the international workshop on screening for breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 1993; 85:1644-56.

Florena AM, Tripodo C, Guarnotta C, et al. Associations between Notch-2, Akt-1 and HER2/neu expression in invasive human breast cancer: a tissue microarray immunophenotypic analysis on 98 patients. **Pathobiology** 2007; 74:317-22.

Fortugno P, Wall NR, Giodini A, et al. Survivin exists in immunochemically distinct subcellular pools and is involved in spindle microtubule function. **J Cell Sci** 2002; 115:575-85.

Frierson HF Jr, Wolber RA, Berean KW, et al. Interobserver reproducibility of the Nottingham modification of the Bloom and Richardson histologic grading scheme for infiltrating ductal carcinoma. **Am J Clin Pathol** 1995; 103:195-8.

Fu M, Wang C, Li Z, Sakamaki T, Pestell RG. Cyclin D1: normal and abnormal functions. **Endocrinology** 2004; 145:5439-47.

Gallahan D, Callahan R. Mammary tumorigenesis in feral mice: identification of a new int locus in mouse mammary tumor virus (Czech II)-induced mammary tumors. **J Virol** 1987; 61:66-74.

Gallahan D, Jhappan C, Robinson G, et al. Expression of a truncated Int3 gene in developing secretory mammary epithelium specifically retards lobular differentiation resulting in tumorigenesis. **Cancer Res** 1996; 56:1775-85.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, 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; 1:555-567.

Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB, et al. Breast Cancer-Major changes in the American Joint Committee on Cancer eighth edition cancer staging manual. **CA Cancer J Clin** 2017; 67:290-303.

Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. **J Clin Invest** 2005; 115:1503-21.

Gnant M, Thomssen C, Harbeck N. St. Gallen/Vienna 2015: A Brief Summary of the Consensus Discussion. **Breast Care (Basel)** 2015; 10:124-30.

Goldhirsch A, Wood WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn H. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. **Ann Oncol** 2007; 18:1133-44.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, 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; 22:1736-47.

Greider C, Chattopadhyay A, Parkhurst C, et al. BCL-x(L) and $\square$ BCL2 delay Myc-induced cell cycle entry through elevation of p27 and inhibition of G1 cyclin-dependent kinases. **Oncogene** 2002; 21:7765-75.

Gu X, Lu, C, He D, et al. Notch 3 negatively regulates chemoresistance in breast cancers. **Tumor Biol** 2016 Oct 14. [Epub ahead of print]

Guo S, Liu M, Gonzalez-Perez RR Role of Notch and its oncogenic signaling crosstalk in breast cancer. **Biochimica Biophysica Acta** 2011; 1815:197-213.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:907-22.

Han J, Hendzel MJ, Allalunis-Turner J. Notch signaling as a therapeutic target for breast cancer treatment? **Breast Cancer Res** 2011; 12:210.

Harrison H, Farnie G, Howell SJ, et al. Regulation of breast cancer stem cell activity by signaling through the Notch 4 receptor. **Cancer Res** 2010; 70:709-18.

Hartman J, Lam EW, Gustafsson JA, Strom A. Hes-6, an inhibitor of Hes-1, is regulated by 17beta-estradiol and promotes breast cancer cell proliferation. **Breast Cancer Res** 2009; 11:R79.

Heikkila P, Boguslawski K, Heikkilä P, et al. Predictive value of p53, mdm-2, p21, and mib-1 for chemotherapy response in advanced breast cancer. **Clin Cancer Res** 2000; 6: 3103-10.

Hendrix MJ, Seftor RE, Seftor EA, et al. Transendothelial function of human metastatic melanoma cells: role of the microenvironment in cell-fate determination. **Cancer Res** 2002; 62:979-86.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol** 2007; 8:R76.

Hess DA, Meyerrose TE, Wirthlin L, et al. Functional characterization of highly purified human hematopoietic repopulating cells isolated according to aldehyde dehydrogenase activity. **Blood** 2004; 104:1648-55.

Hinnis AR, Lockett JC, Walker RA. Survivin is an independent predictor of short-term survival in poor prognostic breast cancer patients. **Br J Cancer** 2007; 96:639-45.

Ho MM, Ng AV, Lam S, Hung JY. Side population in human lung cancer cell lines and tumors is enriched with stem-like cancer cells. **Cancer Res** 2007; 67:4827-33.

Hockenbery D, Nunez G, Millman C, et al. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. **Nature** 1990; 348:334-6.

Hoda SA. Invasive Ductal Carcinoma. In: Hoda SA, Brogi E, Koerner FC, Rosen PP, editors. **Rosen's breast pathology**. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2014; p. 179-198.

Honma I, Kitamura H, Torigoe T, et al. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein survivin-derived peptide vaccination for patients with advanced or recurrent urothelial cancer. **Cancer Immunol Immunother** 2009; 58:1801-7.

Howlader N, Noone AM, Krapcho M, et al. **SEER cancer statistics review 1975-2013**. based on November 2015 SEER data submission, posted to the SEER web site, April 2016. Available from: <URL:http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/> [2017 jan 12]

Hu Z, Fan C, Oh DS et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. **BMC Genomics** 2006; 7: 96.

Huang DC, O'Reilly LA, Strasser A, et al. The anti-apoptosis function of Bcl-2 can be genetically separated from its inhibitory effect on cell cycle entry. **EMBO J** 1997; 16:4628-38.

Huelsken J, Vogel R, Brinkmann V, et al. Requirement for beta-catenin in anterior-posterior axis formation in mice. **J Cell Biol** 2000; 148:567-78.

Hwang TS, Han HS, Hong YC, Lee HJ, Paik NS. Prognostic value of combined analysis of cyclin D1 and estrogen receptor status in breast cancer patients. **Pathol Int** 2003; 53:74-80.

Ilyas M, Grabsch H, Ellis IO, et al. National Cancer Research Institute (UK) Biomarker and Imaging Clinical Studies Group. Guidelines and considerations for conducting experiments using tissue microarrays. **Histopathology** 2013; 62:827-39.

Iso T, Kedes L, Hamamori Y. HES and HERP families: multiple effectors of the Notch signaling pathway. **J Cell Physiol** 2003; 194:237-55.

Jhappan C, Gallahan D, Stable C, et al. Expression of an activated Notch-related int-3 transgene interfere with cell differentiation and induces neoplastic transformation in mammary and salivar glands. **Genes Dev** 1992; 6:345-55.

Jong JS, van Diest PJ, et al. Concerted overexpression of the genes encoding p21 and cyclin D1 is associated with growth inhibition and differentiation in various carcinomas. **Mol Pathol** 1999; 52:78-83.

Jung S, Han W, Lee JW, et al. Ki-67 expression gives additional prognostic information on st.gallen 2007 and adjuvant! Online risk categories in early breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2009; 16:1112-21.

Kallel-Bayoudh I, Hassen HB, Khabir A, et al. Bcl-2 expression and triple negative profile in breast carcinoma. **Med Oncol** 2011; 28:555-61.

Karhadkar SS, Bova GS, Abdallah N, et al. Hedgehog signalling in prostate regeneration, neoplasia and metastasis. **Nature** 2004; 431:707-12.

Karkarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. **J Clin Oncol** 2008; 26:2813-20.

Kato J-Y, Matsushime H, Hiebert SW, Ewen ME, Sherr CJ. Direct binding of cyclin D to the retino-blastoma gene product (pRb) and pRb phosphorylation by the cyclin D-dependent kinase CDK4. **Genes Dev** 1993; 7:331-42.

Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. **Development** 2004; 131:2803-15.

Kennedy SM, O'Driscoll L, Purcell R, et al. Prognostic importance of survivin in breast cancer. **Br J Cancer** 2003; 88:1077-83.

Kenny FS, Hui R, Musgrove EA, et al. Overexpression of cyclin D1 messenger RNA predicts for poor prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. **Clin Cancer Res** 1999; 5:2069-76.

Kanthan R, Fried I, Rueckl T, Senger JL, Kanthan SC. Expression of cell cycle proteins in male breast carcinoma. **World J Surg Oncol** 2010; 12:8-10.

Klinakis A, Szabolcs M, Politi K, et al. Myc is a Notch 1 transcriptional target and a requisite for Notch 1-induced mammary tumorigenesis in mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 2006; 103: 9262-7.

Kondo T. Stem cell-like cancer cells in cancer cell lines. **Cancer Biomarkers** 2007; 3:245-50.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med** 1998; 4:844-7.

Kopan R, Ilagan RX. The canonical Notch signaling pathway: unfolding the activation mechanism. **Cell** 2009; 137:216-33.

Krajewska M, Krajewski S, Banares S, et al. Elevated expression of inhibitor of apoptosis proteins in prostatic cancer. **Clin Cancer Res** 2003; 9:4914-25.

Kuperwasser C, Chavarria T, Wu M, et al. Reconstruction of functionally normal and malignant human breast tissues in mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004; 101:4966-71.

Lebeau A, Unholzer A et al. EGFR, HER-2/neu, cyclin D1, p21 and p53 in correlation to cell proliferation and steroid hormone receptor status in ductal carcinoma in situ of the breast. **Breast Cancer Res Treat** 2003; 79:187-98.

Lee A, Park WC, Yim HW, et al. Expression of c-erbB2, cyclin D1 and estrogen receptor and their clinical implications in the invasive ductal carcinoma of the breast. **Jpn J Clin Oncol** 2007; 37:708-14.

Lee CW, Raskett CM, Prudovsky I, Altieri DC. Molecular dependence of estrogen receptor-negative breast cancer on a notch-survivin signaling axis. **Cancer Res** 2008; 68:5273-81.

Leethanakul C, Patel V, Gillespie J, et al. Distinct pattern of expression of differentiation and growth-related genes in squamous cell carcinomas of the head and neck revealed by the use of laser capture microdissection and cDNA arrays. **Oncogene** 2000;19:3220-4.

Lens SM, Vader G, Medema RH. The case for Survivin as mitotic regulator. **Curr Opin Cell Biol** 2006; 18:616-22.

Leong KG, Karsan A. Recent insights into the role of Notch signaling in tumorigenesis. **Blood** 2006; 107:2223-33.

Leung SCY, Nielsen TO, Zabaglo L, et al. Analytical validation of a standardized scoring protocol for Ki67: phase 3 of an international multicenter collaboration. **NPJ Breast Cancer** 2016; 2:16014.

Li F, Ling X. Survivin study: an update of “what is the next wave”? **J Cell Physiol** 2006; 208:476-86.

Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100: 672-9.

Li XR, Liu M, Zhang YJ, et al. Evaluation of ER, PgR, HER-2, Ki-67, cyclin D1, and nm23-H1 as predictors of pathological complete response to neoadjuvant chemotherapy for locally advanced breast cancer. **Med Oncol** 2011; 28 Suppl 1:S31-8.

Li Y, Ma X, Wu X, Liu X, Liu L. Prognostic significance of surviving in breast cancer: meta-analysis. **Breast J** 2004; 514-24.

Lin Q, Liu Y, Chen H, et al. Survivin, Ki-67 and tumor grade as predictors of response to docetaxel-based neoadjuvant chemotherapy in locally advanced breast cancer. **Mol Clin Oncol** 2013; 1:839-44.

Liu J, Shen J, Wen X, Guo Y, Zhang G. Targeting Notch degradation system provides promise for breast cancer therapeutics. **Crit Rev Oncol Hematol** 2016; 104:21-9.

Liu S, Dontu G, Wicha MS, et al. Mammary stem cells, self-renewal pathways, and carcinogenesis. **Breast Cancer Res** 2005, 7:86-95.

Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, et al. Survivin expression in oral squamous cell. **Br J Cancer** 2003; 89:2244-8.

Lobo NA, Shimono Y, Qian D, Clarke MF. The biology of cancer stem cells. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2007; 23:675-99.

Locatelli MA, Aftimos P, Dees EC, et al. Phase I study of the gamma secretase inhibitor PF-03084014 in combination with docetaxel in patients with advanced triple-negative breast cancer. **Oncotarget** 2017; 8:2320-8.

Ma D, Dong X, Zang S, et al. Aberrant expression and clinical correlation of Notch signaling molecules in breast cancer of Chinese population. **Asia Pac J Clin Oncol** 2011; 7:385-391.

Mahotka C, Wenzel M, Springer E, Gabbert HE, Gerharz CD. Survivin-deltaEx3 and survivin-2B: two novel splice variants of the apoptosis inhibitor survivin with different antiapoptotic properties. **Cancer Res** 1999; 59:6097-102.

Markopoulos C, van de Velde C, Zarca D, Ozmen V, Masetti R. Clinical evidence supporting genomic tests in early breast cancer: do all genomic tests provide the same information? **Eur J Surg Oncol** 2017; 43:909-20.

Maruthanila VL, Elancheran R, Kunnumakkara AB, Kabilan S, Kotoky J. Recent development of targeted approaches for the treatment of breast cancer. **Breast Cancer** 2017; 24:191-219.

Mccarty KS Jr, Szabo E, Flowers JL, et al. Use of a monoclonal anti-estrogen receptor antibody in the immunohistochemical evaluation of human tumors. **Cancer Res** 1986; 46:716-21.

McCormick D, Chong H, Hobbs C, Datta C, Hall PA. Detection of the ki-67 antigen in fixed and wax-embedded sections with the monoclonal antibody mib1. **Histopathology** 1993; 22:355-60.

McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14; 18). **Nature** 1991; 349:254-6.

McDonnell TJ, Troncoso P, Brisbay SM, et al. Expression of the protooncogene bcl-2 in the prostate and its association with emergence of androgen-independent prostate cancer. **Cancer Res** 1992; 52:6940-4.

Messersmith WA, Shapiro GI, Cleary JM, et al. A phase I dose-finding study in patients with advanced solid malignancies of the oral gamma-secretase inhibitor PF-03084014. **Clin Cancer Res** 2015; 21:60.

Miele L, Osborne B. Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis. **J Cell Physiol** 1999; 181:393-409.

Miele L, Miao H, Nickoloff BJ. Notch signaling as a novel câncer therapeutic target. **Curr Cancer Drug Targets** 2006; 6:313-23.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa/2016 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA; 2016.

Mittal S, Subramanyam D, Dey D, Kumar RV, Rangarajan A. Cooperation of Notch and Ras/MAPK signaling pathways in human breast carcinogenesis. **Mol Cancer** 2009; 8:128.

Molofsky AV, Pardal R, Morrison SJ. Diverse mechanisms regulate stem cell self-renewal. **Curr Opin Cell Biol** 2004;16:700-7.

Monzo M, Rosell R, Felip E, et al. A novel anti-apoptosis gene: re-expression of survivin messenger RNA as a prognosis marker in non-small-cell lung cancers. **J Clin Oncol** 1999; 17:2100-4.

Moon WS, Tarnawski AS. Nuclear translocation of survivin in hepatocellular carcinoma: a key to cancer cell growth? **Hum Pathol** 2003; 34:1119-26.

Moriai R, Tsuji N, Moriai M, Kobayashi D, Watanabe N. Survivin plays as a resistant factor against tamoxifen-induced apoptosis in human breast cancer cells. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 117:261-71.

Muller P, Kietz S, Gustafsson JA, Strom A. The anti-estrogenic effect of all-trans-retinoic acid on the breast cancer cell line MCF-7 is dependent on HES-1 expression. **J Biol Chem** 2002; 277:28376-9.

Mylona E, Tzelepis K, Theohari I, et al. Cyclin D1 in invasive breast carcinoma: favourable prognostic significance in unselected patients and within subgroups with an aggressive phenotype. **Histopathology** 2013; 62:472-80.

Nassar A, Lawson D, Cotsonis G, Cohen C. Survivin and caspase-3 expression in breast cancer: correlation with prognostic parameters, proliferation, angiogenesis, and outcome. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2008;16:113-20.

[NCCN] Clinical Practice Guidelines in Oncology. **Breast Cancer, version 2. 2017.** Available from: <URL:https://www.nccn.org/professionals/physician_gls/pdf/breast.pdf. [2017 fev 12]

O'Neill CF, Urs S, Cinelli C, et al. Notch 2 signaling induces apoptosis and inhibits human MDA-MB-231 xenograft growth. **Am J Pathol** 2007; 171:1023-36.

O'Driscoll L, Linehan R, M Kennedy S, et al. Lack of prognostic significance of survivin, survivin-del- taEx3, survivin-2B, galectin-3, bag-1, bax-alpha and MRP-1 mRNAs in breast cancer. **Cancer Lett** 2003; 201:225-36.

O'Reilly LA, Huang DC, Strasser A. The cell death inhibitor Bcl- 2 and its homologues influence control of cell cycle entry. **EMBO J** 1996; 15:6979-90.

Orvieto E, Viale G. Receptores de hormônios esteróides. In: Veronesi U, editor. **Mastologia oncológica**. Rio de Janeiro: Medsi; 2002. p.267-71.

Osipo C, Patel P, Rizzo P, et al. ErbB-2 inhibition activates Notch-1 and sensitizes breast cancer cells to a gamma-secretase inhibitor. **Oncogene** 2008; 27:5019-32.

Paik S, Shak S, Tang G, et al. A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2004; 351:2817-26.

Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol** 2009; 27:1160-7.

Parr C, Watkins G, Jiang WG. The possible correlation of Notch-1 and Notch-2 with clinical outcome and tumor clinicopathological parameters in human breast cancer. **Int J Mol Med** 2004; 14:779-86.

Pasca Di Magliano M, Hebrok M. Hedgehog signalling in cancer formation and maintenance. **Nat Rev Cancer** 2003, 3:903-911.

Pearce DJ, Taussig D, Simpson C, et al. Characterization of cells with a high aldehyde dehydrogenase activity from cord blood and acute myeloid leukemia samples. **Stem Cells** 2005; 23:752-60.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature** 2000; 406:747-752.

Petrarca CR, Brunetto AT, Duval V, et al. Survivin as a predictive biomarker of complete pathologic response to neoadjuvant chemotherapy in patients with stage II and stage III breast cancer **Clin Breast Cancer** 2011; 11:129-34.

Petrelli F, Viale G, Cabiddu M, Barni S. Prognostic value of different cut-off levels of Ki-67 in breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 64,196 patients. **Breast Cancer Res Treat** 2015; 153:477-91.

Peurala E, Koivunen P, Haapasaari KM, et al. The prognostic significance and value of cyclin D1, CDK4 and p16 in human breast cancer. **Breast Cancer Res** 2013 15:R5.

Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. **J Natl Cancer Inst** 2006; 98:1777-85.

Pietenpol JA, Papadopoulos N, Markowitz S, et al. Paradoxical inhibition of solid tumor cell growth by bcl2. **Cancer Res** 1994; 54:3714-7.

Politi K, Feirt N, Kitajewski J. Notch in mammary gland development and breast cancer. **Semin Cancer Biol** 2004;14:341-7.

Prat A, Parker JS, Karginova O, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2010; 12:R68.

Previs RA, Coleman RL, Harris AL, Sood AK. Molecular pathways: translational and therapeutic implications of the Notch signaling pathway in cancer. **Clin Cancer Res** 2015; 21: 955-61.

Qi G, Tuncel H, Aoki E, et al. Intracellular localization of survivin determines biological behavior in colorectal cancer. **Oncol Rep** 2009; 22:557-62.

Qiu M, Peng Q, Jiang I, et al. Specific inhibition of Notch 1 signaling enhances the antitumor efficacy of chemotherapy in triple negative breast cancer through reduction of cancer stem cells. **Cancer Lett** 2013; 328:261-70.

Quinn CM, Ostrowski JL, Harkins L, et al. Loss of bcl-2 expression in ductal carcinoma in situ of the breast relates to poor histological differentiation and to expression of p53 and c-erbB-2 proteins. **Histopathology** 1998; 33:531-6.

Rae FK, Stephenson SA, Nicol DL, Clements JA. Novel association of a diverse range of genes with renal cell carcinoma as identified by differential display. **Int J Cancer** 2000; 88:726-32.

Ravdin PM, Green S, Dorr TM, et al. Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest oncology Group study. **J Clin Oncol** 1992; 10:1284-91.

Ravikumar G, Ananthamurthy A. Cyclin D1 expression in ductal carcinoma of the breast and its correlation with other prognostic parameters. **J Cancer Res Ther** 2014;10:671-5.

Reed JC, Bischoff JR. Bringing chromosomes through cell division-and survivin' the experience. **Cell** 2000; 102:545-8.

Reed W, Flørems VA, Holm R, Hannisdal E, Nesland JM. Elevated levels of p27, p21 and cyclin D1 correlate with positive oestrogen and progesterone receptor status in node-negative breast carcinoma patients. **Virchows Arch** 1999; 435:116-24.

Reedijk M, Odorcic S, Chang L, et al. High-level coexpression of JAG1 and NOTCH 1 is observed in human breast cancer and is associated with poor overall survival. **Cancer Res** 2005; 65:8530-7.

Reis-Filho JS, Savage K, Lambros MB, et al. Cyclin D1 protein overexpression and CCND1 amplification in breast carcinomas: An immunohistochemical and chromogenic in situ hybridisation analysis. **Mod Pathol** 2006; 19:999-1009.

Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication and prediction. **Lancet** 2011; 378:1812-23.

Rexhepaj E, Jirstrom K, O'Connor DP, et al. Validation of cytoplasmic-to-nuclear ratio of survivin as an indicator of improved prognosis in breast cancer. **BMC Cancer** 2010; 10:639.

Rizzo P, Miao H, D'Souza G, et al. Cross-talk between notch and the estrogen receptor in breast cancer suggests novel therapeutic approaches. **Cancer Res** 2008; 68:5226-35.

Roy PG, Thompson AM. Cyclin D1 and breast cancer. **Breast** 2006; 15:718-27.

Ryan BM, Konecny GE, Kahlert S, et al. Survivin expression in breast cancer predicts clinical outcome and is associated with HER2, VEGF, urokinase plasminogen activator and PAI-1. **Ann Oncol** 2006; 17:597-604.

Sarela AI, Macadam RC, Farmery SM, Markham AF, Guillou PJ. Expression of the antiapoptosis gene, survivin, predicts death from recurrent colorectal carcinoma. **Gut** 2000; 46:645-50.

Sarti M, Pinton S, Limoni C, et al. Differential expression of testin and surviving in breast cancer subtypes. **Oncol Rep** 2013; 30:824-32.

Scott RJ, Hall PA, Haldane JS, et al. A comparison of immunohistochemical markers of cell proliferation with experimentally determined growth fraction. **J Pathol** 1991; 165:173-8.

Shackleton M, Vaillan F, Simpson KJ, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. **Nature** 2006; 439:84-8.

Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, et al. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. **J Natl Cancer Inst** 1994; 86:499-504.

Simões BM, O'Brien CS, Eyre R, et al. Anti-estrogen resistance in human breast tumors is driven by JAG1-NOTCH 4-dependent cancer stem cell activity. **Cell Reports** 2015; 12:1868-77.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, et al. Human breast cancer: Correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science** 1987; 235:177-182.

Somlo G, Chu P, Frankel P, et al. Molecular profiling including epidermal growth factor receptor and p21 expression in high-risk breast cancer patients as indicators of outcome. **Ann Oncol** 2008; 19:1853-9.

Soriano JV, Uyttendaele H, Kitajewski J, et al. Expression of an activated Notch 4 (int-3) oncoprotein disrupts morphogenesis and induces an invasive phenotype in mammary epithelial cells in vitro. **Int J Cancer** 2000; 86:652-9.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA** 2001; 98:10869-74.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA** 2003; 100:8418-23.

Span PN, Sweep FC, Wiegerinck ET, et al. Survivin is an independent prognostic marker for risk stratification of breast cancer patients. **Clin Chem** 2004; 50:1986-93.

Span PN, Tjan-Heijnen VC, Heuvel JJ, et al. Do the survivin (BIRC5) splice variants modulate or add to the prognostic value of total survivin in breast cancer. **Clin Chem** 2006; 52:1693-700.

Speiser J, Foreman K, Drinka E, et al. Notch-1 and Notch-4 biomarker expression in triple-negative breast cancer. **Int J Surg Pathol** 2012; 20:139-45.

Stingl J, Eaves CJ, Kuusk U, et al. Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast. **Differentiation** 1998; 63:201-13.

Strom A, Arai N, Leers J, Gustafsson JA. The Hairy and Enhancer of Split homologue-1 (HES-1) mediates the proliferative effect of 17beta-estradiol on breast cancer cell lines. **Oncogene** 2000; 19:5951-3.

Sui L, Dong Y, Ohno M, et al. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. **Int J Oncol** 2002; 21:315-20.

Suzuki T, Aoki D, Susumu N, Udagawa Y, Nozawa S. Imbalanced expression. Of TAN-1 and human Notch 4 in endometrial cancers. **Int J Oncol** 2000; 17:1131-9.

Swana HS, Grossman D, Anthony JN, Weiss RM, Altieri DC. Tumor content of the antiapoptosis molecule survivin and recurrence of bladder cancer. **N Engl J Med** 1999; 341:452-3.

Tabar L, Fagerberg CJ, Gad A, et al. Reduction in mortality from breast cancer after mass screening with mammography. randomised trial from the breast cancer screening working group of the swedish national board of health and welfare. **Lancet** 1985; 1:829-32.

Takai N, Miyazaki T, Nishida M, Nasu K, Miyakawa I. Survivin expression correlates with clinical stage, histological grade, invasive behavior and survival rate in endometrial carcinoma. **Cancer Lett** 2002; 184:105-16.

Takebe N, Miele L, Harris PJ, et al. Targeting Notch, Hedgehog, and Wnt pathways in cancer stem cells: clinical update. **Nat Rev Clin Oncol** 2015; 12:445-64.

Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, et al. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2000; 6:127-34.

Tanioka M, Nokihara H, Yamamoto N, et al. Phase I study of LY2181308, an antisense oligonucleotide against survivin, in patients with advanced solid tumors. **Cancer Chemother Pharmacol** 2011; 68:505-11.

Tobin NP, Lundgren KL, Conway C, et al. Automated image analysis of cyclin D1 protein expression in invasive lobular breast carcinoma provides independent prognostic information. **Hum Pathol** 2012; 43:2053-61.

Touplikioti P, Chondronasiou D, Ziouti F, et al. Expression of Notch receptors in primary breast cancer and correlation with pathological features. **Clin Exp Pharmacol** 2012; 2:1.

Tsujimoto Y, Finger LR, Yunis J, et al. Cloning of the chromosome breakpoint of neoplastic B cells with the t(14;18) chromosome translocation. **Science** 1984; 226:1097-9.

Tsuruma T, Hata F, Torigoe T, et al. Phase I clinical study of anti-apoptosis protein, survivin-derived peptide vaccine therapy for patients with advanced or recurrent colorectal cancer. **J Transl Med** 2004; 2:19.

Viale G, Giobbie-Hurder A, Regan MM, et al. Prognostic and predictive value of centrally reviewed ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from breast international group trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole. **J Clin Oncol** 2008; 26:5569-75.

Visbal AP, Lewis MT. Hedgehog signaling in the normal and neoplastic mammary gland. **Curr Drug Targets** 2010; 11:1103-11.

Vorechovsky I, Benediktsson KP, Toftgård R. The patched/hedgehog/smoothed signalling pathway in human breast cancer: No evidence for H133Y SHH, PTCH and SMO mutations. **Eur J Cancer** 1999; 35:711-3.

Wan WH, Fortuna MB, Furmanski P. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples simultaneously. **J Immunol Methods** 1987; 103:121-9.

Wang Q, Shi Y, Butler HJ, et al. Role of delta-like ligand-4 in chemoresistance against docetaxel in MCF-7 cells. **Hum Exp Toxicol** 2017; 36:328-38.

Wang TC, Cardiff RD, Zukerberg L, et al. Mammary hyperplasia and carcinoma in MMTV-cyclin D1 transgenic mice. **Nature** 1994, 369:669-71.

Wang Y, Zhu JF, Liu YY, Han GP. An analysis of cyclin D1, cytokeratin 5/6 and cytokeratin 8/18 expression in breast papillomas and papillary carcinomas. **Diagn Pathol** 2013; 18:8.

Wei CY, Tan QX, Zhu X, et al. Expression of CDKN1A/p21 and TGFBR2 in breast cancer and their prognostic significance. **Int J Clin Exp Pathol** 2015; 8:14619-29.

Weigelt B, Pusztai L, Ashworth A, et al. Challenges translating breast cancer gene signatures into the clinic. **Nat Rev Clin Oncol** 2011; 9:58-64.

Weijzen S, Rizzo P, Braid M, et al. Activation of Notch-1 signaling maintains the neoplastic phenotype in human Ras-transformed cells. **Nat Med** 2002; 8:979-86.

Welch HG, Prorok PC, O'Malley AJ, Kramer BS. Breast-cancer tumor size, overdiagnosis, and mammography screening effectiveness. **N Engl J Med** 2016; 375:1438-47.

Wend P, Holland JD, Ziebold U, Birchmeier W. Wnt signaling in stem and cancer stem cells. **Semin Cell Dev Biol** 2010; 21:855-63.

Weng AP, Ferrando AA, Lee W, et al. Activating mutations of NOTCH1 in human T cell acute lymphoblastic leukemia. **Science** 2004; 306:269-71.

Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: An old idea - a paradigm shift. **Cancer Res** 2006; 66:1883-90.

Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, et al. American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J Clin Oncol** 2013; 31:3997-4013.

Wu Y, Cain-Hom C, Choy L, et al. Therapeutic antibody targeting of individual Notch receptors. **Nature** 2010; 464:1052.

Xiao Y, Ye Y, Yearsley K, et al. The lymphovascular embolus of inflammatory breast cancer expresses a stem cell-like phenotype. **Am J Pathol** 2008; 173:561-574.

Xu J, Song F, Jin T, et al. Prognostic values of Notch receptors in breast cancer. **Tumour Biol** 2016; 37:1871-7.

Yakirevich E, Samkari A, Holloway M, et al. Total Survivin and acetylated surviving correlate with distinct molecular subtypes of breast cancer. **Hum Pathol** 2012; 43:865-73.

Yamaguchi N, Oyama T, Ito E, et al. Notch 3 signaling pathway plays crucial roles in the proliferation of erbB2-negative human breast cancer cells. **Cancer Res** 2008; 68:1881-8.

Yamashita S, Masuda Y, Kurizaki T, et al. Survivin expression predicts early recurrence in early-stage breast cancer. **Anticancer Res** 2007; 27:2803-8.

Yao K, Rizzo P, Rajan P, et al. Notch-1 and notch-4 receptors as prognostic markers in breast cancer. **Int J Surg Pathol** 2011; 19:607-13.

Yee D, Potter D. Steroid receptors in breast cancer. In: Bland KI, Copeland EM, editors. **The breast: comprehensive management of benign and malignant disorders**. 4th ed. Philadelphia: Saunders; 2009. p.485-97.

Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. **Lancet Oncol** 2010; 11:174-83.

Youssef NS, Hewedi IH, Raboh NM. Immunohistochemical expression of survivin in breast carcinoma: relationship with clinicopathological parameters, proliferation and molecular classification. **J Egypt Natl Canc Inst** 2008; 20:348-57.

Yuan X, Zhang M, Wu H, et al. Expression of Notch 1 correlates with breast cancer progression and prognosis. **PLoS ONE** 2015; 10:e0131689.

Zang S, Ji C, Qu X, et al. A study on notch signaling in human breast cancer. **Neoplasma** 2007; 54:304.

Zanotti S, Canalis E. Notch and the skeleton. **Mol Cell Biol** 2010; 30:886-96.

Zardawi SJ, Zardawi I, McNeil CM, et al. High Notch 1 protein expression is an early event in breast cancer development and is associated with the HER-2 molecular subtype. **Histopathology** 2010; 56:286-96.

Zhang CC, Yan Z, Zing Q, et al. Synergistic effect of the gamma-secretase inhibitor PF-03084014 and docetaxel in breast cancer models. **Stem Cells Transl Med** 2013; 2:233.

Zhang M, Zhang X, S, Wang Y, et al. Prognostic value of surviving and EGFR protein expression in triple-negative breast cancer (TNBC) patients. **Targ Oncol** 2014; 9:349-357.

Zhang SY, Caamano J, Cooper F, Guo X, Klein-Szanto AJ. Immunohistochemistry of cyclin D1 in human breast cancer. **Am J Clin Pathol** 1994; 102:695-8.

Zhang Z, Wang H, Ikeda S, et al. Notch 3 in human breast cancer cell lines regulates osteoblast-cancer cell interactions and osteolytic bone metastasis. **Am J Pathol** 2010; 177:1457-69.

Zhao L, Zhang QY, Luan X, et al. Relationship between the expression of Notch 1 and EZH2 and the prognosis of breast invasive ductal carcinoma. **Genet Mol Res** 2016; 15(1).

Zhao Y, Wang Y, Ni X, et al. Clinical significance of smac and survivin in breast cancer patients treated with anthracycline-based neoadjuvant chemotherapy. **Mol Med Rep** 2014; 9:614-20.

Zhu H, Bhaijee F, Ishaq N, et al. Correlation of Notch 1, pAKT and nuclear NF- κ B expression in triple negative breast cancer. **Am J Cancer Res** 2013; 3:230-9.

Zinkel S, Gross A, Yang E. BCL2 family in DNA damage and cell cycle control. **Cell Death Differ** 2006; 13:1351-9.

Zuckerberg LR, Yang WJ, Gadd M, et al. Cyclin D1 (PRAD1) protein expression in breast cancer: approximately one-third of infiltrating mammary carcinomas show overexpression of the cyclin D1 oncogene. **Mod Pathol** 1995; 8:560-7.

Apêndice - Ficha para Coleta de Dados

PRONT		INICIAIS		BLOCO		DATA DIAG		IDADE		FICHA	
-------	--	----------	--	-------	--	-----------	--	-------	--	-------	--

1. ESTADIAMENTO CLÍNICO

T1a	1	T1b	2	T1c	3	T2	4	IGN	99
-----	---	-----	---	-----	---	----	---	-----	----

2. ESTADIAMENTO PATOLÓGICO

T1a	1	T1b	2	T1c	3	T2	4	IGN	99
-----	---	-----	---	-----	---	----	---	-----	----

3. TIPO HISTOLÓGICO

DUCTAL	1	LOBULAR	2	OUTRO	3	IGN	4
--------	---	---------	---	-------	---	-----	---

4. GRAU HISTOLÓGICO

	1		2		3	IGN	99
--	---	--	---	--	---	-----	----

5. IMUNOISTOQUÍMICA - PERFIL MOLECULAR

RE (-)	0	(+)	1	IGN	99	HER (-)	0	(+)	1	IND	2	IGN	99	KI67 (-)	0	(+)	1	IGN	99
RP (-)	0	(+)	1	IGN	99	FISH (-)	0	(+)	1	IND	2	IGN	99	NA	999				

6. CIRURGIA REALIZADA - MAMA

MASTECT. CLASSICA	1	MASTECT. SKIN SPARING	2	ADENECTOMIA	3	QUADRANTE	4	IGN	99
-------------------	---	-----------------------	---	-------------	---	-----------	---	-----	----

7. BIÓPSIA DE LINFONODO SENTINELA - REALIZADA?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99
-----	---	-----	---	-----	----

8. LINFADENECTOMIA AXILAR - REALIZADA?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99	NA	999
-----	---	-----	---	-----	----	----	-----

9. SE SIM PARA ÍTEM 7, QUANTOS LINFONODOS DISSECADOS?

<10	1	>10	2	IGN	99	NA	999
-----	---	-----	---	-----	----	----	-----

10. QUIMIOTERAPIA ADJUVANTE?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99
-----	---	-----	---	-----	----

11. SE SIM PARA ÍTEM 9, O PROTOCOLO FOI COMPLETO?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99	NA	999
-----	---	-----	---	-----	----	----	-----

12. SE SIM PARA O ÍTEM 9, QUAL O PROTOCOLO UTILIZADO?

FAC/FEC	1	AC/EC	2	AC/EC-T/D	3	CMF	4	TAC	5	OUTRO	6	IGN	99	NA	999
---------	---	-------	---	-----------	---	-----	---	-----	---	-------	---	-----	----	----	-----

13. HERCEPTIN?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99
-----	---	-----	---	-----	----

14. RADIOTERAPIA ADJUVANTE?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99
-----	---	-----	---	-----	----

15. SE SIM PARA ÍTEM 12, O PROTOCOLO FOI COMPLETO?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99	NA	999
-----	---	-----	---	-----	----	----	-----

16. HORMONIOTERAPIA ADJUVANTE?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99	NA	999
-----	---	-----	---	-----	----	----	-----

17. SE SIM PARA ÍTEM 14, O PROTOCOLO FOI COMPLETO (5 anos)?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99	NA	999
-----	---	-----	---	-----	----	----	-----

18. SE SIM PARA ÍTEM 14, QUAL O TRATAMENTO HORMONAL UTILIZADO?

TAMOXIFENO	1	ANASTROZOL	2	SWITCH	3	OUTRO	4	IGN	99	NA	999
------------	---	------------	---	--------	---	-------	---	-----	----	----	-----

19. RECIDIVA?

NÃO	0	SIM	1	IGN	99	NA	999
-----	---	-----	---	-----	----	----	-----

20. DATA DA RECIDIVA

21. SE SIM PARA ÍTEM 17, QUAL O SÍTIO DA RECIDIVA?

LOCORREGIONAL	1	À DISTANCIA	2	IGN	99	NA	999
---------------	---	-------------	---	-----	----	----	-----

22. EM CASO DE RECIDIVA À DISTÂNCIA, QUAL O ÓRGÃO?

OSSOS	1	PLEUROPULM.	2	FIGADO	3	SNC	4	OUTROS	5	NA	999
-------	---	-------------	---	--------	---	-----	---	--------	---	----	-----

23. DATA ÚLT. FOLLOW-UP

24. STATUS:

SEM DOENÇA	1	COM DOENÇA	2	MOCA	3	MORTE/OUTRA CAUSA	4	PERDIDO	5	IGN	99
------------	---	------------	---	------	---	-------------------	---	---------	---	-----	----