

**EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE MARCADORES DE CÉLULAS-
TRONCO CD24, CD44, ALDH1 E CD90 E SUA ASSOCIAÇÃO
COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS EM
CARCINOMAS MAMÁRIOS DE PACIENTES MUITO JOVENS
(ATÉ 35 ANOS) COMPARADOS COM TUMORES DE UM GRUPO
DE PACIENTES DE MEIA-IDADE)**

MARIA AUXILIADORA BERNARDI

**Tese apresentada à Fundação Antônio
Prudente para a obtenção do título de Doutor
em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani

São Paulo

2017

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Bernardi, Maria Auxiliadora

Expressão diferencial de marcadores de células-tronco CD24, CD44, ALDH1 e CD90 e sua associação com características clínicas e patológicas em carcinomas mamários de pacientes muito jovens (até 35 anos) comparados com tumores de um grupo de pacientes de meia-idade / Maria Auxiliadora Bernardi – São Paulo, 2017.

80p.

Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração:
Oncologia.

Orientadora: Maria Mitzi Brentani

Descritores: 1. Neoplasias de Mama/patologia/Breast Neoplasms/pathology 2. Célula-Tronco Embrionária/Embryonic Stem Cells. 3. Antígenos CD44/Antigens, CD44. 4. Antígenos CD24/Antigens, CD24. 5. Antígenos Thy-1/Antigens, Thy-1. 6. ALDH1. 7. CD90.

DEDICATÓRIA

“... Isto é para os loucos. Os desajustados. Os rebeldes. Os causadores de confusões. Os peixes-fora-d'água. Aqueles que veem as coisas de forma diferente. Eles não gostam de regras. E eles não têm respeito pelo status quo. Você pode citá-los, discordar deles, glorificá-los ou difamá-los. A única coisa que você não pode fazer é ignorá-los. Porque eles transformam as coisas. Eles impulsionam a raça humana para frente. E enquanto alguns podem vê-los como os loucos, nós vemos o gênio. Porque as pessoas que são loucas o suficiente para acharem que podem mudar o mundo são aquelas que o fazem.”

(Campanha Think Different, da Apple, em 1997, nossa tradução.)

Dedico esta tese a Deus, por me abençoar com saúde, proporcionar-me uma família linda e ter colocado em meu convívio meus amigos, por ele escolhidos, pois sem todas essas pessoas, minha vida não faria sentido.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, por toda ajuda, por todo carinho e paciência que demonstra comigo e com todos os seus alunos e por poder conviver com ela todos esses anos, aprendendo a procurar novos caminhos e sempre a insistir em nunca desanimar, mesmo quando tudo parece nebuloso; meu eterno agradecimento.

Ao Dr. Victor P. Andrade, pela construção do TMA (*tissue microarray*) e as figuras editadas nesta tese

À Sueli Nonogaki, pesquisadora científica do Instituto Adolf Lutz e do A.C.Camargo Cancer Center, pelo auxílio no estudo imunoistoquímico.

À Srta. Amanda Duran, mestranda da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, área de Oncologia, pela colaboração na leitura das lâminas do TMA e organização das tabelas e resultados.

À Srta. Ana Letícia Santos, aluna de iniciação científica, pelo levantamento de prontuários e organização de tabelas.

À Sra. Ana Maria Rodrigues A. Kuninari, pelo auxílio e orientação das informações referentes a esta tese.

Ao Professor Fernando Soares, chefe da Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, agradeço a confiança e apoio dado, pois sem sua atenção e colaboração, este estudo não poderia ser realizado.

À Sra. Patrícia Logullo, agradeço pelo auxílio na edição desta tese.

Este projeto foi sustentado por um auxílio do CNPq (verba de pesquisa concedida à Dra. Maria Mitzi Brentani).

Agradeço aos meus pais, Américo e Annita, pelo apoio e paciência neste período.

Agradeço a minha irmã e meu cunhado, Maria Cecília e Élio, e minha sobrinha e afilhada Catarina, pela paciência, carinho e convívio.

Agradeço às minhas amigas e companheiras do dia a dia, Sandra Regina Lopes Sanches e Cristiane Andrade Ferreira Reis, pela paciência, pelos momentos de “riso e choro” e pelas dificuldades enfrentadas, pelo carinho e força na resolução delas.

Agradeço a todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para esta tese.

RESUMO

Bernardi MA. **Expressão diferencial de marcadores de células-tronco CD24, CD44, ALDH1 e CD90 e sua associação com características clínicas e patológicas em carcinomas mamários de pacientes muito jovens (até 35 anos) comparados com tumores de um grupo de pacientes de meia-idade.** São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

O câncer de mama em mulheres jovens apesar de incomum, está associado a um pior prognóstico. A identificação de células tronco tumorais e a sua influência na progressão tumoral têm importantes implicações clínicas com respeito ao desenvolvimento de estratégias de tratamento. Neste estudo, pacientes diagnosticadas com câncer de mama e tratadas em uma só instituição (A.C.Camargo Cancer Center) foram subdivididas em dois grupos por faixa etária: ≤ 35 anos de idade, denominadas pacientes jovens, ou entre 36 e 65 anos, denominadas pacientes de meia-idade. O objetivo foi avaliar a associação da expressão de marcadores de células-tronco com características clínicas e patológicas do câncer de mama diagnosticados em mulheres muito jovens. A partir dos prontuários dessas pacientes, as seguintes informações foram levantadas: tamanho do tumor, metástase linfonodal, recidiva, metástase a distância, grau histológico e grau nuclear, assim como a avaliação imunohistoquímica dos marcadores para receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR), Ki67e Her2 e sobrevida livre de doença. Comparados aos carcinomas invasivos de mama de pacientes de meia idade, pacientes jovens apresentam mais frequentemente tumores de grau histológico mais alto, positividade para HER2 e para Ki67, fenótipo molecular luminal B, maior frequência de antecedentes familiares de primeiro grau e de óbito. Também foram registrados dados das análises imunohistoquímicas e de *tissue microarray* (TMA), o qual foi construído a partir de 24 amostras tumorais de pacientes

jovens e 18 amostras de pacientes de meia-idade. Determinações imunohistoquímicas de ER, PR, HER-2, Ki67, CD44, CD24, CD90 e ALDH1 foram realizadas, sendo avaliadas as associações com parâmetros clínicos e fenótipos moleculares, mas não foram observadas diferenças significativas na distribuição dos subtipos luminal A e B, embora a frequência do luminal B tenha mostrado tendência a ser maior nos tumores de pacientes jovens. O fenótipo CD44⁻CD24⁻ foi mais frequente nas pacientes jovens em relação às pacientes de meia-idade sem atingir significância estatística ($p = 0,110$), quando avaliado na membrana e no citoplasma e as demais combinações também não atingiram significância estatística. O CD90 é um marcador mesenquimal e o fenótipo classificado como marcador de células-tronco (CD44⁺CD24⁻CD90⁺) mostrou-se presente apenas na membrana de células estromais nos tumores dos dois grupos de idade em quantidades semelhantes com maior expressão de CD90 no citoplasma de células tumorais de pacientes de meia-idade. Em conclusão, os resultados ainda não estão completamente claros a respeito do papel das células-tronco e o diferente comportamento dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade, sendo que este estudo pode ser considerado como exploratório. Estudos adicionais com um número muito maior de pacientes de ambos os grupos serão necessários para investigar a associação da expressão de marcadores de células-tronco tumorais com parâmetros clínico-patológicos, prognóstico e seu papel no tratamento destas pacientes. É possível que as investigações na área de câncer de mama em pacientes jovens tenham que caminhar no sentido de aceitar uma concepção multifatorial, em que diferentes marcadores de células-tronco atuem simultaneamente com diferentes pesos.

SUMMARY

Bernardi MA. **[Differential expression of the stem cells CD24, CD44, ALDH1 and CD90 and its association with clinical and pathological characteristics in breast carcinomas of very young women (up to 35 years old), compared to tumors in a group of middle-aged patients]**. São Paulo; 2017. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

Breast cancer in young women is an uncommon problem, but breast carcinomas in young women are associated with poor prognosis. The identification of stem cells in the tumor and their influence on disease progression have important clinical implications regarding the development of treatment strategies. In this study, patients diagnosed with breast cancer and treated in a single institution (AC Camargo Cancer Center Hospital) were divided into two groups according to age: ≤ 35 years old (the "young patients" group), or between 36 and 65 years old, (the "middle-aged group of patients"). The objective of this study was to assess the association of markers of stem cells with the clinical and pathological characteristics of very young women with invasive mammary carcinomas. From the medical records of these patients, the following information was collected: tumor size, lymph node metastasis, recurrence, distant metastasis, histological grade and nuclear grade, as well as the immunohistochemical evaluation of ER, PR, Ki67 and Her2 receptors/markers and disease-free survival. Compared to the tumors of middle-aged patients, young patients presented a higher frequency of higher histological grade, a higher frequency of HER2 and Ki67 positivity, a higher frequency of B-cell luminal phenotype, a higher frequency of family history of cancer and of death. Data from the immunohistochemical and tissue microarray (TMA) analyzes were also recorded. TMA was constructed from 24 tumor samples from young patients and 18 samples from middle-aged patients. Immunohistochemical determinations of ER (estrogen receptor), PR (progesterone receptor), HER-2, Ki67, CD44, CD24, CD90 and

ALDH1 were performed, associated with clinical parameters, classical tumor markers and molecular phenotypes, but no significant differences were observed in the distribution of luminal A and B subtypes, although the B luminal type has shown a tendency to be higher in tumors of young patients. The CD44-CD24 phenotype was more frequent in young patients than in middle-aged patients, without statistical significance ($p = 0.110$), when evaluated in the membrane and in the cytoplasm, and the other combinations did not reach statistical significance either. CD90 is a mesenchymal marker, and the phenotype classified as a marker for stem cells (CD44+ CD24- CD90+) was shown to be present only in the stromal cell membrane in the two age groups, in similar amounts, with a higher expression of CD90 in the cytoplasm of tumor cells from middle-aged patients. In conclusion, the results are still not completely clear about the role of stem cells and the different behavior of tumors of young and middle-aged patients, and this study can be considered as exploratory. Further studies with a much larger number of patients from both groups will be required to investigate the association of tumor stem cells with clinical-pathological parameters, prognosis and their role in the treatment of these patients. It is possible that investigations in the area of breast cancer in young patients have to move towards accepting a multifactorial design, in which different stem cell markers act simultaneously with different weights.

LISTA DE QUADRO, FIGURAS E TABELAS

Quadro 1	Antígenos utilizados na análise imunohistoquímica.....	19
Figura 1	Fluxograma de inclusão das pacientes e divisão dos grupos para análise.....	22
Tabela 1	Distribuição das pacientes com carcinoma invasivo mamário conforme idade e grau histológico (GH) do tumor.....	27
Tabela 2	Distribuição das pacientes com carcinoma invasivo mamário conforme idade e grau nuclear (GN).....	28
Tabela 3	Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme a positividade para o receptor de estrógeno (ER).....	30
Tabela 4	Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme a positividade para o receptor de progesterona (PR).....	31
Tabela 5	Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme a positividade para o receptor HER2 (<i>human epidermal receptor 2</i>).....	32
Tabela 6	Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme a positividade para Ki67.....	33
Tabela 7	Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme o perfil molecular baseado em marcadores imunohistoquímicos.....	34

Tabela 8	Comparação entre pacientes jovens (até 35 anos) e de meia-idade (≥ 36 anos) conforme positividade para marcadores biológicos para risco de câncer de mama e perfis de mau prognóstico.....	35
Tabela 9	Marcadores de células-tronco, subtipos moleculares e outros biomarcadores distribuídos de acordo com a idade das pacientes.....	37
Tabela 10	Comparação entre a frequência do imunofenótipo CD44 na membrana e no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade.....	39
Tabela 11	Comparação entre a frequência do imunofenótipo CD24 na membrana e no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade.....	40
Tabela 12	Comparação entre a frequência do imunofenótipo CD90 na membrana e no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade.....	42
Tabela 13	Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD24 no citoplasma dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade.....	46
Tabela 14	Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD24 na membrana dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade.....	47
Tabela 15	Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD44 no citoplasma dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade.....	48

Tabela 16	Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD44 na membrana dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade.....	49
Tabela 17	Comparação entre a frequência dos imunofenótipos CD44/CD24 no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade.....	50
Tabela 18	Comparação entre a frequência dos imunofenótipos CD44/CD24 na membrana de pacientes jovens e de meia-idade.....	51
Tabela 19	Comparação da associação de características clínico-patológicas e a expressão dos imunofenótipos CD44/CD24, positiva (pos) ou negativa (neg) no citoplasma dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade.....	52
Tabela 20	Comparação da associação de características clínico-patológicas e a expressão dos imunofenótipos CD44/CD24, positiva (pos) ou negativa (neg) na membrana dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade.....	54
Tabela 21	Comparação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ no citoplasma de células tumorais em pacientes jovens e de meia-idade.....	55
Tabela 22	Comparação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ na membrana de células estromais em pacientes jovens e de meia-idade.....	56
Tabela 23	Comparação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ no citoplasma de células estromais em pacientes jovens e de meia-idade.....	56

Tabela 24	Comparação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ na membrana de células tumorais em pacientes jovens e de meia-idade.....	57
Tabela 25	Dados de sobrevida das pacientes.....	57
Tabela 26	Dados de sobrevida associados com fenótipos de coexpressão de CD44/CD24 nos dois grupos de idade.....	58
Tabela 27	Informações gerais das pacientes jovens.....	60

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de mama em pacientes jovens	1
1.2	Célula-tronco	5
2	OBJETIVOS	10
2.1	Justificativa	10
3	MATERIAIS E MÉTODOS	12
3.1	Desenho do estudo e ética	12
3.2	Pacientes.....	12
3.3	Coleta de dados clínicos, patológicos e de imunohistoquímica.....	13
3.4	Método de avaliação anatomopatológica	15
3.5	Construção e análise dos microarranjos teciduais (tissue microarrays, TMA)	16
3.6	Estudo imunohistoquímica.....	17
3.7	Crerérios de Exclusão.....	20
4	RESULTADOS.....	21
4.1	Amostras	21
4.2	Características demográficas e clínicas das pacientes	23
4.3	Características clínicas das pacientes ao diagnóstico.....	24
4.4	Marcadores biológicos dos tumores	30
4.5	Perfis moleculares de pior prognóstico para o câncer de mama avaliados	33
4.6	<i>Tissue microarray</i> (TMA)	36
4.6.1	Características clínico-patológicas das pacientes do TMA.....	36
4.7	Síntese dos resultados	62
4.7.1	Casuística.....	62

4.7.2	Comparação de biomarcadores e subtipos moleculares entre os Dois grupos de idade.....	62
4.7.3	Comparação entre a frequência dos imunofenótipos de pacientes jovens e de meia-idade	63
4.7.4	Associação entre características clínico-patológicas e a expressão individual dos imunofenótipos CD44 e CD24 nos tumores de pacientes jovens.....	63
4.7.5	Comparação entre a frequência dos imunofenótipos CD44/CD24 pacientes jovens e de meia-idade e associação de características clínico-patológicas	63
4.7.6	Associação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ na membrana de células tumorais em pacientes jovens e de meia-idade	64
4.7.7	Sobrevida	64
5	DISCUSSÃO	65
6	CONCLUSÃO	71
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	72

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Figuras (1A e 1B), 1C e 1D),(2Ae 2B), (2Ce 2D), (3A, 3B e
3C), (4A, 4Be 4C), (5A)

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE MAMA EM PACIENTES JOVENS

O câncer de mama em mulheres jovens é um problema incomum: apenas 2-4% de todos os casos diagnosticados ocorrem na faixa etária < ou igual a 35 anos (YILDIRIM et al. 2000; GONZALEZ-ANGULO et al. 2005). A idade que define uma mulher como muito jovem para o câncer de mama foi inicialmente proposta pelo trabalho de HAN et al. (2010) como menor ou igual a 35 anos. Este corte tem sido considerado adequado também por vários outros trabalhos em câncer de mama (TAN et al. 2013; BASTOS et al. 2016; QUAN et al. 2017). Isso significa que essa idade de corte separa mulheres que têm um tipo de câncer de mama agressivo, geralmente de estágio avançado ao diagnóstico (DARWISH et al. 2017; UNLU et al. 2017), com invasão linfonodal frequente e pior prognóstico (UNLU et al. 2017) e menor sobrevida (THUERLIMANN 2001). De fato, na comparação com mulheres classificadas como de meia-idade, ou seja, com 35 a 50 anos, as jovens (de menos de 35 anos) tem estágio mais avançado, características mais agressivas, significativamente menor sobrevida em cinco anos, sendo que a idade menor que 35 anos ao diagnóstico já é estabelecido como um fator prognóstico independente de outras características hormonais ou genéticas (KATAOKA et al. 2016).

Segundo ORTEGA JACOME et al. (2010), no Brasil há uma tendência de aumento na incidência de câncer de mama em mulheres mais jovens como informado nos registros de câncer de base populacional do Ministério da Saúde de 2009. A taxa de incidência de idade específica para o câncer de mama aumentou significativamente desde 1980. Entre as mulheres de 25-29 anos de idade, as taxas que eram de 6,4/100.000 em 1983, subiram para 7,8/100.000 em 1999-2000 e de 19 para 27,6/100.000 em mulheres de 30-34 anos de idade. Esse aumento deve ser explicado ou pelo aumento das notificações dos casos, ou pelo resultado das mudanças dos padrões de exposição a diferentes fatores de riscos ambientais, ou ainda outros fatores ainda não completamente esclarecidos que possivelmente tornam este grupo de mulheres jovens mais susceptíveis ao desenvolvimento de câncer de mama em idade mais precoce.

Vários estudos em diferentes países indicam que os carcinomas de mama em mulheres jovens ligam-se a um mau prognóstico (GONZALEZ-ANGULO et al. 2005; UHRHAMMER et al. 2008; GENTILINI et al. 2010; CANCELLO et al. 2010; KIM et al. 2011; KATAOKA et al. 2016). Esse mau prognóstico reflete-se em várias características clínico-patológicas, tais como o aumento da incidência de cânceres de grau avançado entre essas mulheres jovens (EL SAGHIR et al. 2006; ELKUM et al. 2007). Juntamente com a maior incidência de tumores grau III no grupo etário mais jovem, também houve um aumento da incidência de invasão vascular neste grupo. Nenhuma tentativa foi feita para diferenciar entre vasos sanguíneos e invasão linfática nesse estudo. Quando a invasão vascular é registrada sem separação para essas

categorias, uma incidência de 23-57% é relatada (GAJDOS et al. 2000; COLLEONI et al. 2002; SIDONI et al. 2003; FERNANDOPULLE et al. 2006; HAN et al. 2011).

Nos tumores dessas pacientes parece haver uma maior probabilidade de invasão linfática, de carcinoma ductal *in situ* extenso em associação com o componente invasivo, maior frequência de negatividade para os receptores hormonais como o estrogênio e a progesterona e ainda negatividade para o marcador de fator de crescimento epidérmico, HER2 (EL SAGHIR et al. 2006; ELKUM et al. 2007). Além disso, as mulheres mais jovens tendem a sofrer recorrência da doença mais precocemente quando comparadas a outras mulheres mais velhas. Isso sugere que, de estágio para estágio, as mulheres jovens têm uma doença mais agressiva do que as mais velhas (YILDIRIM et al. 2000). Embora a incidência de tumores na faixa etária menor de 35 anos seja rara, ela é concordante com uma maior incidência de metástases linfonodais nessa faixa etária (GAJDOS et al. 2000).

Um aspecto óbvio da relação câncer de mama/idade envolve o tempo necessário entre a iniciação mutagênica e a promoção tumoral completa, gerando um câncer clinicamente aparente. A promoção pode levar décadas. Por esse raciocínio, tumores de mama em pacientes jovens em geral parecem estar associados a mutações herdadas ou a eventos transformantes, afetando um epitélio mamário imaturo (ANDERSON et al. 2002; BENZ 2008).

História familiar de carcinoma de mama foi previamente observada em 10% a 37% de pacientes, sugerindo uma susceptibilidade genética. No

entanto, somente 5% a 10% dos casos em pacientes jovens foram associados a mutações de BRCA 1 ou 2 nas pacientes com história familiar e uma frequência ainda menor de mutações (3 a 10%) foi detectada em casos de pacientes jovens sem história familiar (LALLOO et al. 2006; FACKENTHAL e OLOPADE 2007). Portanto, o carcinoma de mama ocorrendo em pacientes jovens é uma entidade relacionada a um complexo processo biológico ainda não completamente entendido, estendendo-se além das síndromes hereditárias (ANDERS et al. 2008).

Em estudos anteriores, propusemos que a expressão diferencial de microRNAs poderia regular genes e proteínas potencialmente responsáveis pelo fenótipo agressivo dos tumores mamários em pacientes jovens e definimos perfis gênicos tumorais e estromais, que distinguiram pacientes jovens sem mutações germinativas e com tumores expressando receptores de estrógeno positivos (luminais) de pacientes de meia-idade com as mesmas características. Concluímos que, de acordo com outros estudos em pacientes de diferentes etnias, que os carcinomas mamários em pacientes jovens parecem ser de uma entidade biológica diferente daqueles provenientes de pacientes de meia-idade (BASTOS et al. 2016).

A nossa hipótese no presente projeto foi que a proporção de células-tronco nas pacientes jovens determinada através da expressão de marcadores de células tronco, poderia ser a explicação da maior agressividade dos tumores em mulheres jovens.

1.2 CÉLULA-TRONCO

Tradicionalmente, o câncer tem sido visto como uma doença onde os eventos endógenos ou microambientais induzem mutações em oncogenes ou genes supressores expressos na célula normal (HANAHAHAN e WEINBERG 2011). Na última década, aumentaram as evidências de que tumores malignos se originam da transformação de células-tronco, por mutações que levam à desregulação dos mecanismos normais que controlam crescimento e proliferação das células-tronco (SMALLEY e ASHWORTH 2003).

Células-tronco normais são classicamente definidas pela sua capacidade de autorregeneração de gerar células filhas que se diferenciam em diferentes linhagens, formando todos os tipos de células encontradas no organismo. Elas possuem duas grandes características: a autorrenovação e a diferenciação em múltiplas linhagens celulares. A autorrenovação consiste na formação de uma célula idêntica à primeira (SMALLEY e ASHWORTH 2003) e ocorre de maneira simétrica ou assimétrica. Como o nome já diz, a autorrenovação simétrica produz duas células filhas idênticas à célula progenitora, ou seja, duas células-tronco. Já na autorrenovação assimétrica, uma célula produzida é idêntica à progenitora e outra sofre diferenciação, para se tornar uma “célula progenitora comprometida” com um determinado perfil de diferenciação. A célula idêntica à *stem cell* mantém o compartimento de células-tronco; a célula diferente sofre uma série de divisões e passos de diferenciação, gerando uma população diferenciada.

As células intermediárias entre a célula-tronco e as terminalmente diferenciadas são chamadas de progenitoras. Para manter a homeostase tissular, o número de células-filhas que mantêm a identidade de células-tronco deve ser estritamente controlado (SMALLEY e ASHWORTH 2003).

O conceito de que cânceres apresentam uma subpopulação de células semelhantes a células-tronco normais foi proposto há vários anos. O crescimento expansivo de lesões malignas, assim como a resposta patológica inadequada ao tratamento quimioterápico, poderiam indicar a presença de células progenitoras ou *stem cells* do tumor, com propriedades de proliferação indefinidas (HAMBURGER e SALMON 1977). Sugeriu-se que as células-tronco tumorais poderiam surgir de duas maneiras: 1. mutações oncogênicas das células-tronco normais, alterando mecanismos que restringem a expansão dessas células; 2. mutações oncogênicas permitindo que células progenitoras continuem proliferando sem entrar em um estado pós-mitótico diferenciado (CLARKE e FULLER 2006). A heterogeneidade do câncer é devida aos vários caminhos que as células progenitoras têm, levando a diferenciação aberrante (REYA et al. 2001).

Vários marcadores são utilizados para a identificação de células-tronco em carcinomas de mama, tais como: expressão alta de CD44 e níveis baixos ou indetectáveis de CD24 (LIU et al. 2007). Investigamos a expressão de CD44 e CD24 em 95 casos de carcinoma de mama e encontramos, porém, uma baixa frequência deste fenótipo no nosso trabalho de dissertação de mestrado (BERNARDI et al. 2012). Outros marcadores prováveis incluem o gene BMI1, membro da família "*polycomb*" de repressores transcricionais

essenciais para a manutenção da autorrenovação, e ALDH1 (aldeído desidrogenase-1), encontrada em células-tronco neoplásicas (DE BROT et al. 2012).

No entanto, há evidências crescentes de que um subconjunto de células-tronco residentes na mama exibe uma reativação de um programa embrionário que permite a reprogramação de uma célula epitelial polarizada a um fenótipo mesenquimal com aumento da motilidade celular. Este processo (EMT, transição epitélio-mesênquima) leva a um relaxamento dos contatos célula-célula pavimentando o caminho para a movimentação necessária à gastrulação e à organogênese (POLYAK e WEINBERG 2009). Um evento molecular na dissolução dos contatos célula-célula é a perda da E-caderina e a expressão *de novo* de genes mesenquimais tais como: fibronectina, actina do músculo liso (α -SMA) e vimentina, que tornam as células independentes das vizinhas, adquirindo a capacidade de invasão.

O programa EMT resulta na geração de células epiteliais que exibem propriedades de células-tronco (MOREL et al. 2008). Evidências se acumulam de que células-tronco de tecidos epiteliais exibem misturas de características epiteliais e mesenquimais resultando em uma EMT parcial (PATTABIRAMAN e WEINBERG 2014).

Outro marcador candidato para definir células-tronco em câncer de mama é o CD90, um marcador de células-tronco mesenquimais, também conhecido como Thy-1 (DOMINICI et al. 2006). O CD90 é uma glicoproteína ancorada à superfície celular, já tendo sido descrita em células-tronco de diferentes tipos celulares: células hematopoiéticas, células endoteliais,

fibroblastos, gliomas e queratinócitos. A expressão do CD90 foi evidenciada previamente em linhagens celulares de câncer de mama, estando relacionada com o grau de malignidade das linhagens analisadas (LOBBA et al. 2012). Alguns estudos verificaram que células mamárias normais MCF-10A transfectadas com CD90 apresentaram aumento de expressão de marcadores mesenquimais, sugerindo que o CD90 possa iniciar a transição para o fenótipo mesenquimal sem estímulos extracelulares e fatores presentes no meio ambiente (MANI et al. 2008, BOZORGI et al. 2015). A expressão de CD90 em células associadas ao tumor representa um marcador mesenquimal típico (MANDEL et al. 2013).

Alguns estudos recentes sobre a associação entre a frequência de células-tronco e fatores hormonais em câncer de mama forneceram subsídios para a nossa hipótese, sugerindo uma alteração desta população específica em pacientes jovens. A exposição a estrógeno e progesterona é um fator de risco para câncer de mama já estabelecido. Estudos experimentais recentes demonstram que o número de células-tronco mamárias em camundongo aumenta pelo tratamento com estrógeno + progesterona e a gravidez aumenta este número em 11 vezes (ASSELIN-LABAT et al. 2010). Progesterona aumenta 14 vezes o número de células-tronco durante a fase lútea (JOSHI et al. 2010). Durante a puberdade e em ciclos de lactação, a população mamária de células-tronco é especialmente ativa (SMALLEY e ASHWORTH 2003). Um estudo recente (FILLMORE et al. 2010) mostrou a expansão de células mamárias tumorais com características de células-tronco pelo tratamento com estrógeno através de sinalização parácrina, já que tais

células não expressam receptores de estrógeno e progesterona (ER e PR). Os resultados apresentados acima sugerem a possibilidade de que células-tronco tenham associação com a aquisição de um fenótipo tumoral mais agressivo em pacientes muito jovens mesmo na ausência de mutações em BRCA1 ou BRCA2.

2 OBJETIVOS

Considerando-se que a frequência relativa de células-tronco tumorais em carcinomas de mama (identificada pelo perfil de marcadores) em pacientes jovens poderia ser uma explicação possível para o perfil agressivo da doença nas pacientes jovens, o objetivo geral deste estudo foi, portanto, estudar a associação de marcadores de células-tronco tumorais com características clínicas e patológicas do câncer de mama em mulheres jovens com carcinomas mamários.

Os objetivos específicos foram:

- 1 Definir a frequência de subtipos moleculares de câncer de mama em mulheres jovens através da avaliação imunohistoquímica dos receptores de estrógeno, progesterona, HER2 e Ki67.
- 2 Demonstrar a frequência da expressão dos marcadores de células-tronco (CD44+CD24-, ALDH1 e CD90) por imunohistoquímica nos carcinomas mamários de mulheres jovens e de meia-idade, pois investigar a associação desses marcadores com características clínico-patológicas dessas pacientes.

2.1 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama em pacientes jovens no Brasil mostra uma tendência ao aumento de incidência (ORTEGA JACOME et al. 2010), mas características clínicas e biológicas desse grupo de pacientes ainda não

estão bem definidas. A nossa hipótese no presente estudo foi que carcinomas de mama em pacientes muito jovens poderiam estar associados a uma desregulação dos mecanismos que controlam o crescimento e a proliferação de células-tronco.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 DESENHO DO ESTUDO E ÉTICA

Os casos deste estudo foram selecionados a partir de 7.774 pacientes submetidas a tratamento cirúrgico no A. C. Camargo Cancer Center entre 01/01/2000 a 31/12/2011. Destas pacientes, 291 foram selecionadas:

- 214 pacientes jovens (idade $\leq$ 35 anos);
- 77 pacientes de meia idade (36 a 65 anos).

Com o objetivo de investigar estas pacientes jovens, conduzimos um estudo transversal, retrospectivo sobre o câncer de mama operável nestas pacientes comparadas à pacientes de meia-idade, com o diagnóstico de câncer de mama invasivo da mesma instituição. As pacientes foram selecionadas de acordo com a viabilidade de dados clínicos e blocos de parafina.

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (Código de Ética-CEP: 1635/11). (Anexo 1)

3.2 PACIENTES

Foram revisados os prontuários médicos de pacientes diagnosticadas com carcinoma mamário invasivo, com idade menor ou igual a 35 anos, com seu diagnóstico realizado na própria instituição ou com revisão de laudo

histopatológico incluindo dados sobre estadiamento (SOBIN et al. 2012). Os prontuários deveriam conter dados sobre o tratamento cirúrgico, radioterápico, quimioterápico e hormonioterápico que se fizeram necessários e que foram empregados conforme os protocolos vigentes em cada fase de tratamento. Estas pacientes foram comparadas com o grupo de meia idade, consideradas entre 36-65 anos, que apresentaram diagnóstico histopatológico de câncer de mama invasivo e subtipos moleculares caracterizados por imunohistoquímica semelhantes aos das pacientes jovens. Foram excluídas do estudo, mulheres com carcinoma ductal *in situ* ou carcinoma lobular.

3.3 COLETA DE DADOS CLÍNICOS, PATOLÓGICOS E DE IMUNOHISTOQUÍMICA

Foram avaliados dados clínicos que contemplassem a situação hormonal da paciente, *status* menstrual com designação do tipo de fluxo menstrual e uso ou não de anticoncepcionais hormonais tanto via oral, injetável, transdérmica, via vaginal ou ainda, intrauterinos com suas respectivas dosagens e período de tratamento hormonal realizado.

Nesta avaliação inicial, verificou-se ainda o número de gestações, incluindo gestações a termo, abortamentos e avaliação do perfil lactacional, com a frequência e por quanto tempo perdurou cada amamentação.

Após o levantamento desses dados clínicos, foi realizado o estadiamento clínico das pacientes através dos resultados dos exames

subsidiários, que incluem: biópsia comprobatória da malignidade, através da avaliação histopatológica, por meio de punção aspirativa com agulha grossa (*core-biopsy*) ou a vácuo (mamotomia) guiada pela ultrassonografia mamária ou pela mamografia; avaliação dos sítios de possíveis metástases, como no pulmão, através de raio x de tórax ou tomografia computadorizada, dependendo da gravidade do caso; avaliação do fígado, através de ultrassonografia abdominal; avaliação pélvica para serem descartadas as metástases (para ovário, Krukemberg) com implantes viscerais e peritoneais através da realização de ultrassonografia ou tomografia computadorizada pélvica/transvaginal. Foram realizados os exames laboratoriais para avaliação da função hepática e pré-operatórios, seguidos de eletrocardiograma e avaliação com anestesiológista, para liberação do tratamento cirúrgico, e esses dados foram também compilados para este estudo.

Através da avaliação macroscópica, foi observado o tamanho do tumor ao diagnóstico em comparação com as medidas clínica, mamográfica e ultrassonográfica e também, quando disponível, ressonância magnética. Foram avaliados o tipo histológico, grau histológico e nuclear, acometimento linfonodal com avaliação das metástases que pudessem estar presentes (Elston, Elis, 1998).

Na avaliação imunohistoquímica foram dosados e estudados marcadores equivalentes para a definição dos subtipos moleculares do câncer de mama: receptores hormonais: estrógeno (RE) e progesterona (RP); fator de crescimento epidérmico (cerbB2/HER2), índice de proliferação

celular através do antígeno nuclear Ki67 (que está expresso em células em proliferação).

Considerando as recentes evidências que suportam a idéia de que uma pequena população de células neoplásicas, denominadas células-tronco tumorais, é responsável tanto pela iniciação tumoral como pelo crescimento e progressão tumoral, as quais são identificadas por uma série de marcadores, a presença de células-tronco cancerosas nos tumores foi avaliada pela positividade dos marcadores para CD44 (CD44⁺) e negatividade do CD24 (CD24⁻), presença de ALDH1 (ALDH1⁺) e presença do marcador mesenquimal CD90 (CD90⁺) através de imunohistoquímica e os resultados foram comparados entre tumores de pacientes jovens e de meia-idade.

Em síntese, os prontuários foram avaliados para obtenção de dados referentes às variáveis: idade, tamanho do tumor, estadiamento clínico (SOBIN et al. 2012), grau histológico do tumor (Elston, Elis, 1998), comprometimento linfonodal axilar, presença de metástases a distância, tratamentos realizados (quadrantectomia ou mastectomia, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) e evolução clínica, obedecendo os protocolos vigentes.

3.4 MÉTODO DE AVALIAÇÃO ANATOMOPATOLÓGICA

As lâminas obtidas a partir de amostras do tumor previamente fixadas em formalina e incluídas em bloco de parafina foram revisadas por dois

patologistas colaboradores deste trabalho (VPA e CAVDT) para avaliação da concordância dos laudos. Todas as reações imunohistoquímica foram realizadas no Departamento de Patologia do A.C. Camargo Cancer Center. Com o cuidado de evitar interpretações ambíguas, as leituras das lâminas foram realizadas num único dia.

Áreas representativas contendo fragmentos do tumor foram identificadas para a montagem do TMA (*tissue microarray*) conforme descrito a seguir.

3.5 CONSTRUÇÃO E ANÁLISE DOS MICROARRANJOS TECIDUAIS (*TISSUE MICROARRAYS*, TMA)

Foram construídos microarranjos teciduais (*tissue microarrays*, TMA) com amostras provenientes dos casos eleitos para o estudo. A partir do corte original corado por HE, as áreas de tumor viável, ou mais representativas, foram selecionadas e marcadas com caneta. Estas áreas apresentaram a equivalência no bloco de parafina original, identificado como bloco doador. A partir deste ponto, as áreas selecionadas foram transferidas para o bloco receptor através do uso do *Tissue Microarrayer* (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, MD, USA). Foram confeccionados os blocos de TMA com cilindros de 1,0 mm contendo material viável para análise para cada tumor.

A partir desse bloco, foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtomia mecânica na espessura

de 4µm, previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics Inc., Hackensack, NJ, USA). As lâminas contendo os cortes histológicos foram banhadas em parafina para evitar a oxidação. Para controle da representatividade do material foram confeccionadas lâminas coradas por HE nos níveis 1, 25, 50, 75 e 100. Em seguida, as lâminas obtidas foram submetidas à técnica imunohistoquímica para cada marcador. A técnica utilizada seguiu os passos tradicionais e rotineiros do laboratório de Patologia do A. C. Camargo Cancer Center.

3.6 ESTUDO IMUNOHISTOQUÍMICO

Dos blocos de TMA, foram feitos 20 cortes de 4µ de espessura, em lâmina de vidro preparada com silano (3-aminopropyltriethoxysilane, SIGMA) para realização de exame imunoistoquímico. Foram pesquisados os antígenos descritos no Quadro 1. As reações imunohistoquímicas realizadas seguiram as orientações dos fabricantes, assim como suas diluições.

Os casos foram posicionados em 3 blocos de TMA, em filas e colunas e identificados pela inserção de amostras de tireoide ou fígado na primeira posição.

O escore de ALLRED et al. (1998), foi utilizado para definir a positividade para receptores de estrógeno e progesterona (ER e PR). Pelo método de Allred avaliaram dois parâmetros:

- 1) **intensidade** da coloração (graduada de 0 a 3), e
- 2) **percentual** de células positivas:

0= nenhuma célula,

1= < 1/100,

2= 1/100 a 1/10,

3= 1/10 a 1/3,

4= 1/3 a 2/3 e

5= > 2/3.

Os escores de cada categoria são somados, obtendo-se o escore final, variando de 0 a 8. São considerados positivos os escores maiores ou iguais a 3 para os receptores ER e PR.

Quanto aos marcadores de membrana como HER2, foi empregado um escore semi-quantitativo e definidas como marcações negativas a imunorreatividade 0 a 1+, como positivas as marcações moderada, 2+, e marcação intensa como 3+ (Herceptest).

Para as variáveis CD44, CD24 e ALDH1, foram usados os critérios definidos por RICARDO et al. (2011) e DE BROT et al. (2012).

Segundo a definição por RICARDO et al (2011), a coloração com CD44 e CD24 foi detectada principalmente na membrana de células tumorais e a pontuação foi considerada como segue:

- 1) Pontuação 0 = 0 a 10% de células tumorais positivas;
- 2) Pontuação 1+ = 10 a 25% de células tumorais positivas;
- 3) Pontuação 2+ = 25 a 50% de células tumorais positivas;
- 4) Pontuação 3+ = Mais de 50% das células tumorais positivas.

Para CD24, os casos foram divididos em negativos/baixa marcação (0 / baixa), quando considerado 0 ou 1+, ou em casos positivos, quando

classificados como 2+ ou 3+. Coloração imunohistoquímica de ALDH1 foi classificado como positivo quando mais de 1% das células tumorais demonstraram positividade citoplasmática clara, ou seja, a expressão estromal de ALDH1 foi classificada em duas categorias: nenhuma/fraca, ou moderada/forte.

Segundo a avaliação de DE BROT et al. (2012), “a expressão de ALDH1 no estroma tumoral foi classificada como ausente, fraca (<25% de coloração citoplasmática em células estromais), moderada (25%-75% de coloração citoplasmática em células estromais), ou forte (>75% de coloração citoplasmática em células estromais)”.

Quadro 1 - Antígenos utilizados na análise imunohistoquímica

Anticorpos primários	Clone	Diluição	Fabricante, País
Receptor de estrógeno	SP1	1:400	Neomarkers, Fremont, CA, USA
Receptor de progesterona	PgR636	1:500	Dako, Dinamarca
HER2	Policlonal	1:2000	Dako, Dinamarca
Ki67	clone MIB1	1:400	DAKO, Dinamarca
CD 44	DF1485	1:200	Leica, Newcastle
CD 24	SN3	1:50	Neomarkers, Fremont, CA, USA
CD 90	EPR3133	1:100	Abcam, Cambridge, UK
ALDH1	EP1933Y		Abcam, Cambridge, MA, USA

3.7 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas do presente estudo mulheres com carcinoma ductal *in situ* ou carcinoma lobular invasivo *ou in situ*, mulheres que apresentassem história de câncer na família e pacientes cujo heredograma estivesse disponível para a determinação da probabilidade da presença de mutação de BRCA1/2 de acordo com o programa Boadiceia para o conhecimento de câncer de mama hereditário. Pacientes com alto risco da presença destas mutações foram excluídos, blocos de parafina com quantidade de material exíguo que estavam no banco de tumores e mulheres com ausência de dados que pudessem contribuir para este estudo.

4 RESULTADOS

4.1 AMOSTRAS

No período do estudo, o total de pacientes diagnosticadas com câncer de mama entre os anos de 2001-2011 no Hospital A C Camargo foi de 7.374 casos e a seleção conforme a idade (menor ou igual a 35 (jovens) e de 35-65 anos (meia idade)), foi padronizada.

Após a avaliação dos critérios de inclusão e exclusão, foram selecionadas no primeiro momento, 291 pacientes com carcinoma mamário nesta instituição. A **Figura 1** representa o número das pacientes selecionadas para o presente estudo.

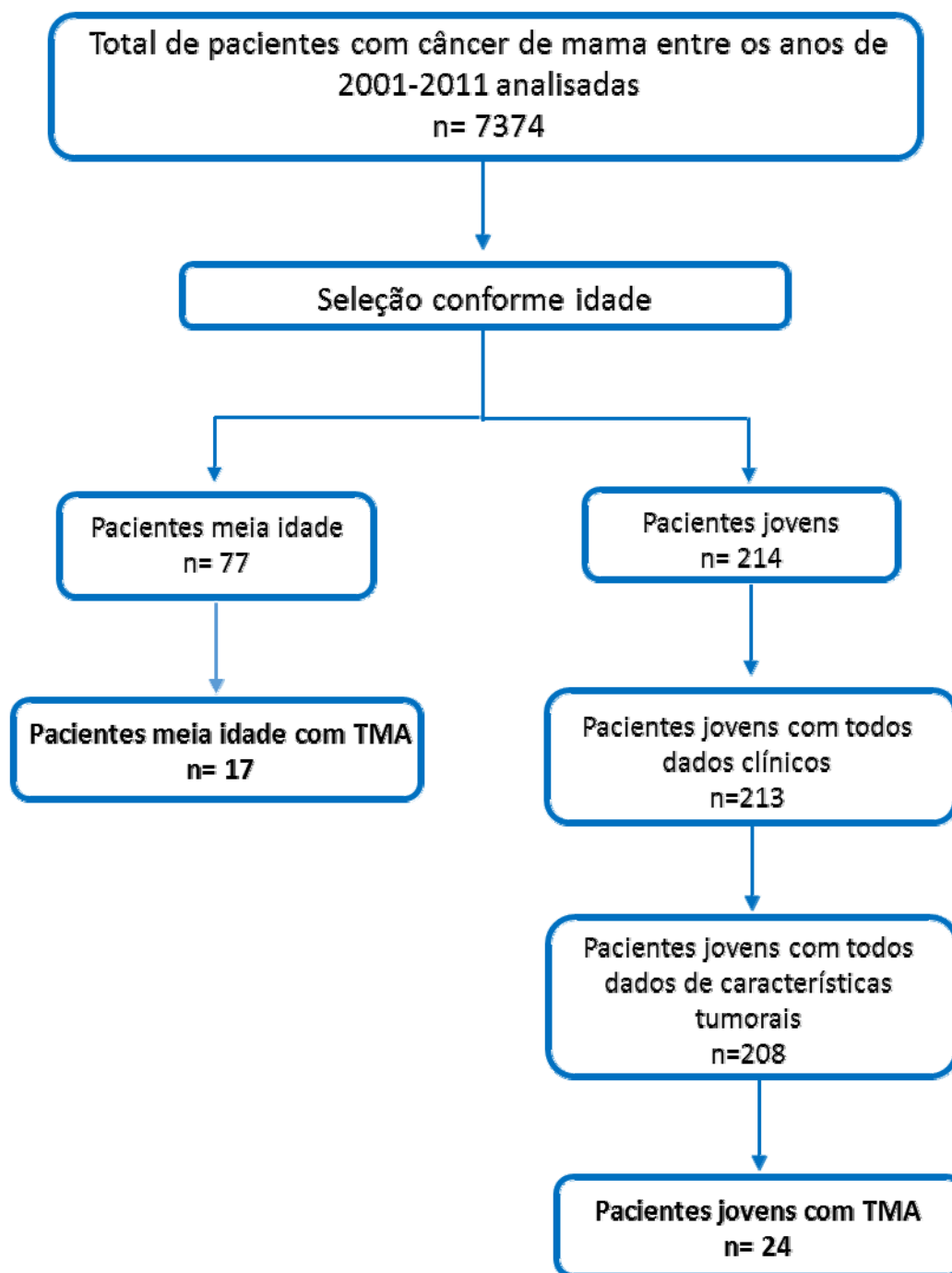


Figura 1 - Fluxograma de inclusão das pacientes e divisão dos grupos para análise.

4.2 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS DAS PACIENTES

A idade das pacientes ao diagnóstico de câncer de mama foi de 31 anos em média (desvio padrão, DP, de 3,2 anos) no grupo das jovens e de 49 anos em média (DP 14,9) no das pacientes de meia-idade, portanto com variação muito maior neste grupo. A diferença de idade foi significativa entre os dois grupos, de jovens e de meia-idade ($p < 0,001$; teste de Mann-Whitney).

A idade à menarca era informação disponível em 185 prontuários das jovens e 66 das pacientes de meia-idade neste estudo. A média de idade à menarca foi de 12,4 anos para as jovens (mediana de 12,0, DP de 1,6 anos) e de 11,8 anos para as de meia-idade (mediana de 11 anos, DP de 1,4), indicando que as mais velhas lembravam que tinham menstruado significativamente mais cedo ($p < 0,001$, teste de Mann-Whitney).

Faltavam informações sobre número de filhos para 13 pacientes, sendo 10 do grupo de jovens. O número de filhos foi significativamente diferente entre jovens e de meia-idade ($p = 0,001$, teste de Mann-Whitney), com média de menos de um filho por mulher entre as jovens (0,94 filho, DP de 1,02) e 3,0 filhos por paciente de meia-idade (DP 3,0). Ao se classificarem as pacientes pelo tamanho da prole, observou-se que a maioria (226, ou 83,1%) tinha até 2 filhos, e 46 (16,9%) tinham 3 filhos ou mais. Entre as que tinham 3 filhos ou mais, a maioria era mais velha (44,6%), caracterizando as mais velhas como

mães com número significativamente maior de filhos ($p = 0,001$, qui-quadrado de Pearson).

Como muitas mulheres, principalmente jovens, não tiveram filhos, a informação sobre a idade da paciente ao ter o primeiro filho estava disponível para 99 jovens e 20 mulheres de meia-idade. A idade-média ao ter o primeiro filho foi de 25,9 anos para as jovens (DP 4,5) e de 27,3 anos para as de meia-idade (DP de 10,8 anos), sem diferença significativa entre os dois grupos ($p = 0,57$, teste t de Student para amostras independentes).

Das 270 pacientes para as quais havia informação sobre status menopausal, 49 haviam já entrado na menopausa, todas do grupo de meia-idade, sendo que 13 mulheres com mais de 35 anos não haviam ainda entrado na menopausa. Ficou clara a diferença significativa entre os dois grupos quanto à entrada na menopausa ($p < 0,001$, teste de qui-quadrado).

4.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS PACIENTES AO DIAGNÓSTICO

Dentre as queixas que levaram as mulheres à busca pelo diagnóstico, o nódulo mamário ou tumor foi a mais comum. Havia o registro dessa informação para 77 pacientes do grupo das de meia-idade e 193 do grupo das jovens, e em quase todas as mais velhas a queixa principal era o tumor (76 pacientes), sendo que uma das pacientes de meia-idade tinha uma outra queixa não identificada. Entre as 193 jovens com essa informação 121 (62,7%) tinham o tumor como queixa, 16 jovens (8,3%) tinham dor e, em 42

casos (21,8%), o câncer de mama foi um achado de exame de imagem (provavelmente mamografia de rastreamento). A diferença entre os dois grupos quanto à queixa inicial foi significativa ($p < 0,001$, teste de qui-quadrado de Pearson).

Havia informações disponíveis sobre a duração da queixa para 166 pacientes jovens e 72 pacientes de meia-idade. Entre as jovens, a queixa já tinha 158,6 dias no momento do diagnóstico de câncer de mama (mediana de 105, DP de 159,9) e, entre as de meia-idade, somente 9,9 dias (mediana de 6, DP 15,7). A duração da queixa foi, portanto, significativamente menor entre as de meia-idade do que entre as jovens ($p < 0,001$; teste de Mann-Whitney), e com menor variação.

Para 206 pacientes jovens e 69 de meia-idade, havia informação no prontuário sobre o lado acometido. Considerando-se o total da amostra com essa informação (275 pacientes), havia 131 mulheres com a mama direita acometida e 144 com a esquerda, sem diferença significativa nem para o total da amostra nem para os grupos ($p = 0,099$, teste de qui-quadrado de Pearson), mostrando que a lateralidade não variou entre os grupos.

Do total da amostra, 155 doentes não tinham antecedentes familiares de câncer de mama, sendo 90 jovens e 65 de meia-idade. Somente uma paciente de meia-idade tinha antecedente de câncer de mama na família (parentes de primeiro e segundo grau, 1,5%); 58 jovens (30,9%) tinham antecedentes familiares de primeiro e segundo graus e 40 tinham outros familiares. Foi significativa a diferença entre os grupos quanto à presença de antecedente familiar de câncer de mama ($p < 0,001$, teste de qui-quadrado

de Pearson). Não houve diferença significativa entre o tipo de antecedente (se de primeiro e segundo grau ou outro; $p = 0,79$, teste de qui-quadrado de Pearson).

A localização do tumor na mama foi classificada nos prontuários como "central", "lesão sobreposta", "mamilo", "lesão periareolar", "retroareolar" ou por quadrantes. A maior parte das doentes (57,9%) tinha lesões no quadrante superior (QS), sendo 110 jovens (38,6%) e 55 de meia-idade (19,3%). A segunda maior localização no grupo das de meia-idade foi o quadrante inferior (QI), acometido em 13 casos (16,9%), e 44 jovens tinham lesão sobreposta (21,2%). Houve significância estatística na distribuição da localização das lesões ($p < 0,001$, teste de qui-quadrado de Pearson).

Das 285 pacientes, somente 11 (8 jovens e 3 de meia-idade) não foram operadas (3,9%). Entre as demais, a maioria foi submetida a mastectomia simples (36 doentes, todas jovens 12,6%), mastectomia radical modificada (104 doentes, 36,5%, sendo 51 jovens), ou quadrantectomia (55 doentes 19,3%, todas jovens). Entre as de meia-idade, foi mais comum a mastectomia radical (68,8%). A diferença entre jovens e pacientes de meia-idade quanto ao tipo de cirurgia foi significativa ($p < 0,001$, teste de qui-quadrado de Pearson).

O grau histológico (GH) do tumor estava disponível em 258 prontuários. A maior parte das doentes tinha grau II (115, ou 44,6%) ou III (127 ou 49,2%), sendo que 39,2% das jovens tinham grau III contra 16,3% das de meia-idade, indicando grau significativamente mais avançado, conforme mostra a **Tabela 1** ($p = 0,004$, teste de qui-quadrado de Pearson).

Tabela 1 - Distribuição das pacientes com carcinoma invasivo mamário conforme idade e grau histológico (GH) do tumor

		Grupo de idade		Total	
		Jovens	Meia idade		
		≤35 anos	36-65 anos		
GH	I	n	15	1	16
		% em GH	93,8%	6,3%	100,0%
		% em Grupo Idade	7,7%	1,6%	6,2%
		% do Total	5,8%	,4%	6,2%
	II	n	95	20	115
		% em GH	82,6%	17,4%	100,0%
		% em Grupo Idade	48,7%	31,7%	44,6%
		% do Total	36,8%	7,8%	44,6%
	III	n	85	42	127
		% em GH	66,9%	33,1%	100,0%
		% em Grupo Idade	43,6%	66,7%	49,2%
		% do Total	39,2%	16,3%	49,2%
Total	n	195	63	258	
	% em GH	75,6%	24,4%	100,0%	
	% em Grupo Idade	100,0%	100,0%	100,0%	
	% do Total	75,6%	24,4%	100,0%	

A informação sobre grau nuclear (GN) estava disponível para 273 casos, e a distribuição conforme grupos está exposta na **Tabela 2**, que mostra o Grau 3 como mais prevalente no grupo de mulheres mais jovens ($p < 0,01$, teste de qui-quadrado de Pearson). Porém a análise geral não mostrou diferença significativa entre os grupos quanto à distribuição do GN ($p = 0,074$).

Tabela 2 - Distribuição das pacientes com carcinoma invasivo mamário conforme idade e grau nuclear (GN)

		Grupo de idade		Total	
		Jovens	Meia idade		
		≤35 anos	36-65 anos		
GN	1	n	5	0	5
		% em GN	100,0%	0,0%	100,0%
		% em Grupo Idade	2,6%	0,0%	1,8%
		% do Total	1,8%	0,0%	1,8%
	2	n	60	33	93
		% em GN	64,5%	35,5%	100,0%
		% em Grupo Idade	30,6%	42,9%	34,1%
		% do Total	22,0%	12,1%	34,1%
	3	n	131	44	175
		% em GN	74,9%	25,1%	100,0%
		% em Grupo Idade	66,8%	57,1%	64,1%
		% do Total	48,0%	16,1%	64,1%
Total	n	196	77	273	
	% em GN	71,8%	28,2%	100,0%	
	% em Grupo Idade	100,0%	100,0%	100,0%	
	% do Total	71,8%	28,2%	100,0%	

O tamanho do tumor estava disponível para 249 pacientes. As jovens tinham tumores significativamente menores que as pacientes de meia-idade ($p < 0,001$, teste de Mann-Whitney): o tumor entre as jovens tinha 2,67 cm em média (mediana 2,25, DP 1,82 cm) e, entre as de meia-idade, 5,26 cm (mediana 4,9, DP 2,8 cm).

Nos prontuários estava registrado o número de linfonodos pesquisados e o número de linfonodos acometidos entre as doentes com câncer de mama. Havia esse registro disponível para 266 pacientes. Entre as jovens, foram pesquisados em média 17,0 linfonodos (DP 11,2) e, entre as de meia-idade 16,49 (DP 6,7), sem diferença entre os grupos ($p = 0,86$,

teste de Mann-Whitney). Para uma paciente, a informação sobre o número de linfonodos acometidos se perdeu (não foi registrada). Entre as jovens, havia menor número de linfonodos acometidos pela doença ($p = 0,015$, teste de Mann-Whitney) com uma média de 3,0 (DP 6,0) e, entre as de meia-idade, 4,6 (DP 6,8), também sem diferença significativa entre os grupos.

Das 285 doentes 224 foram submetidas a radioterapia (78,6%), sem predominância entre jovens ou de meia-idade ($p = 0,253$, teste de qui-quadrado de Pearson). Faltava o dado no prontuário sobre quimioterapia para somente uma doente. Das 285 restantes 222 (78,2%) foram submetidas ao tratamento quimioterápico, também sem diferença entre jovens e de meia-idade ($p = 0,218$, teste de qui-quadrado de Pearson). Os dados sobre hormonioterapia estavam disponíveis para 280 pacientes, das quais 47 (16,8%) fizeram o tratamento (nenhuma destas era jovem) e 128 (45,7%) tomaram tamoxifeno (100% destas eram do grupo das jovens). Foi significativa a diferença entre jovens e de meia-idade quanto ao uso da quimioterapia e tamoxifeno ($p < 0,001$, teste de qui-quadrado de Pearson).

Havia disponibilidade de dados sobre óbito para 283 pacientes, das quais 212 estavam vivas e 71 haviam falecido durante o tratamento no hospital. Porém, das 71 que foram a óbito, 47 (66,2%) eram do grupo das jovens. Como o grupo das jovens era maior que o das de meia-idade, a taxa de óbitos não se revelou significativamente maior entre elas ($p = 0,149$, teste de qui-quadrado de Pearson).

4.4 MARCADORES BIOLÓGICOS DOS TUMORES

Haviam dados sobre a positividade para o receptor de estrógeno (ER) para 265 pacientes. A distribuição está descrita na **Tabela 3** e a taxa de positividade foi a mesma para jovens e de meia-idade ($p = 0,275$, teste qui-quadrado de Pearson). Para o receptor de progesterona (PR), havia registros nos prontuários de 262 pacientes, conforme mostra a **Tabela 4**. Neste caso, houve diferença significativa entre os grupos ($p = 0,015$, teste qui-quadrado de Pearson), sendo que a positividade para PR foi mais pronunciada no grupo de pacientes jovens.

Tabela 3 - Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme a positividade para o receptor de estrógeno (ER)

		Grupo de idade		Total
		Jovens ≤35 anos	Meia idade 36-65 anos	
ER	Negativo	n	77	30
		% em ER	72,0%	28,0%
		% em Grupo Idade	38,5%	46,2%
		% do Total	29,1%	11,3%
	Positivo	n	123	35
		% em ER	77,8%	22,2%
		% em Grupo Idade	61,5%	53,8%
		% do Total	46,4%	13,2%
	Total	n	200	65
		% em ER	75,5%	24,5%
		% em Grupo Idade	100,0%	100,0%
		% do Total	75,5%	24,5%

Tabela 4 - Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme a positividade para o receptor de progesterona (PR)

		Grupo de idade		
		Jovens	Meia idade	
		≤35 anos	36-65 anos	Total
PR	n	92	41	133
Negativo	% em PR	69,2%	30,8%	100,0%
	% em Grupo Idade	46,5%	64,1%	50,8%
	% do Total	35,1%	15,6%	50,8%
Positivo	n	106	23	129
	% em PR	82,2%	17,8%	100,0%
	% em Grupo Idade	53,5%	35,9%	49,2%
	% do Total	40,5%	8,8%	49,2%
Total	n	198	64	262
	% em PR	75,6%	24,4%	100,0%
	% em Grupo Idade	100,0%	100,0%	100,0%
	% do Total	75,6%	24,4%	100,0%

Os prontuários das pacientes mostraram que o marcador HER-2 foi pesquisado em 224 casos. Conforme mostra a **Tabela 5**, a positividade para HER-2 foi mais frequente entre as jovens com câncer de mama ($p = 0,008$, teste qui-quadrado de Pearson).

Tabela 5 - Distribuição das pacientes com carcinoma **mamário invasivo** conforme a positividade para o receptor HER2 (*human epidermal receptor 2*)

		Grupo de idade		Total
		Jovens ≤35 anos	Meia idade 36-65 anos	
HER-2	Negativo	n	109	140
		% em HER-2	77,9%	100,0%
		% em Grupo Idade	58,6%	62,5%
		% do Total	48,7%	62,5%
	Positivo	n	77	84
		% em HER-2	91,7%	100,0%
		% em Grupo Idade	41,4%	37,5%
		% do Total	34,4%	37,5%
Total		n	186	224
		% em HER-2	83,0%	100,0%
		% em Grupo Idade	100,0%	100,0%
		% do Total	83,0%	100,0%

Por outro lado, o marcador do índice de proliferação celular Ki67 foi pesquisado em uma minoria das doentes, somente 95 dentre as 285 (33,3%). A **Tabela 6** mostra que a taxa de positividade para Ki67 foi significativamente mais pronunciada entre as jovens do que entre as pacientes de meia-idade ($p < 0,001$, teste de qui-quadrado de Pearson).

Tabela 6 - Distribuição das pacientes com carcinoma **mamário invasivo** conforme a positividade para Ki67

		Grupo de idade		Total
		Jovens ≤35 anos	Meia idade 36-65 anos	
Ki67	Negativo	n	3	33
		% em Ki67	8,3%	91,7%
		% em Grupo Idade	10,7%	49,3%
		% do Total	3,2%	34,7%
	Positivo	n	25	34
		% em Ki67	42,4%	57,6%
		% em Grupo Idade	89,3%	50,7%
		% do Total	26,3%	35,8%
Total		n	28	67
		% em Ki67	29,5%	70,5%
		% em Grupo Idade	100,0%	100,0%
		% do Total	29,5%	70,5%

4.5 PERFIS MOLECULARES DE PIOR PROGNÓSTICO PARA CÂNCER DE MAMA AVALIADOS

A partir da análise da positividade para ER, PR, HER-2 e Ki67, foi possível construir o perfil de risco para mau prognóstico de 237 pacientes (189 jovens, ou 79,7%, e 48 de pacientes de meia-idade, ou 20,3%). A **Tabela 7** descreve o número e percentual de pacientes cujos tumores foram classificadas como tendo o perfil "luminal A", "luminal B", "triplo-negativo" ou com super-expressão de HER-2 ("HER-2 OE"). Os carcinomas ER positivos constituíram-se no subtipo mais frequente em ambos os grupos (jovem e de meia idade). Somente 10,5% das pacientes foram classificadas como "HER-

2 OE". Não houve diferença significativa entre os dois grupos com relação aos quatro perfis ($p = 0,064$, teste de qui-quadrado de Pearson).

Tabela 7 - Distribuição das pacientes com carcinoma mamário invasivo conforme o perfil molecular baseado em marcadores imunohistoquímicos

		Grupo de idade			
		Jovens	Meia idade	Total	
		≤35 anos	36-65 anos		
Classificação molecular	Luminal A	n	66	22	88
		% em classificação	75,0%	25,0%	100,0%
		% em Grupo Idade	34,9%	45,8%	37,1%
		% do total	27,8%	9,3%	37,1%
	Luminal B	n	55	10	65
		% em classificação	84,6%	15,4%	100,0%
		% em Grupo Idade	29,1%	20,8%	27,4%
		% do total	23,2%	4,2%	27,4%
	Triplo-negativo	n	44	15	59
		% em classificação	74,6%	25,4%	100,0%
		% em Grupo Idade	23,3%	31,3%	24,9%
		% do total	18,6%	6,3%	24,9%
	"HER OE"	n	24	1	25
		% em classificação	96,0%	4,0%	100,0%
		% em Grupo Idade	12,7%	2,1%	10,5%
		% do total	10,1%	,4%	10,5%
Total	n	189	48	237	
	% em classificação	79,7%	20,3%	100,0%	
	% em Grupo Idade	100,0%	100,0%	100,0%	
	% do total	79,7%	20,3%	100,0%	

Em relação aos marcadores biológicos, sua positividade, perfis de mau prognóstico e risco para câncer de mama, a **Tabela 8** demonstra que as pacientes jovens apresentam grau histológico mais alto (2 e 3) quando comparados com as pacientes de meia-idade ($p < 0,004$), do mesmo modo as pacientes jovens apresentam antecedentes familiares de 1º e 2º graus significativamente mais frequentes ($p < 0,001$).

Tabela 8 - Comparação entre pacientes jovens (até 35 anos) e de meia-idade (≥ 36 anos) conforme positividade para marcadores biológicos para risco de câncer de mama e perfis de mau prognóstico

		Jovens ≤ 35 anos	Meia idade 36-65 anos	Valor de p
Tamanho do tumor (cm)		2,67 $\pm$ 1,82	5,26 $\pm$ 2,85	$p < 0,001$
GH	1	15 (93,8%)	1 (6,2%)	$p < 0,004$
	2	95 (82,6%)	20 (17,4%)	
	3	85 (66,9%)	42 (33,1%)	
GN	1	5 (100%)	0	$p = 0,074$
	2	60 (64,5%)	33 (35,5%)	
	3	131 (74,9%)	44 (25,1%)	
Linfonodos pesquisados		17,06 $\pm$ 11,2	16,49 $\pm$ 6,72	$p > 0,05$
Linfonodos acometidos		3 $\pm$ 6,1	4,63 $\pm$ 6,81	$p = 0,015$
Idade à menarca		12,48 $\pm$ 1,64	11,8 $\pm$ 1,47	$p < 0,001$
Antecedentes familiares	Não	90 (58,1%)	65 (41,9%)	$p < 0,001$
	1º 2º grau	58 (98,3%)	1 (1,7%)	
Mortas		47 (66,2%)	24 (33,8%)	$p = 0,149$
Vivas		159 (75%)	53 (25%)	

4.6 TISSUE MICROARRAY (TMA)

Avaliamos uma amostragem inicial de 285 pacientes (208 jovens e 77 de meia idade), e este estudo foi realizado com amostras de 42 casos (24 jovens e 18 de meia-idade) que foram incluídas em TMA para análise dos marcadores de células-tronco CD24, CD44, ALDH1 e CD90.

4.6.1 Características clínico-patológicas das pacientes do TMA

Entre as participantes com TMA disponível, a idade-média das jovens ao diagnóstico inicial foi de 33 anos (25-35 anos) e, das pacientes de meia-idade, foi de 57 anos (41-64 anos).

No grupo das pacientes jovens, 92% dos tumores eram luminais (21% Luminal A e 71% Luminal B), sendo apenas 2 casos (8%) triplo-negativos. Nas pacientes de meia-idade, os luminais representaram 88% dos casos (Luminal A 41% e Luminal B 47%) e apenas 1 caso (6%) de tumor triplo-negativo e 1 caso de HER2+. Quando analisada a diferença de cada um dos fenótipos entre os dois grupos de idade, não houve diferença estatisticamente significativa, sendo os dois grupos com maior número de tumores Luminais B, como demonstrado na **Tabela 9**.

Quando analisada a expressão do receptor de estrógeno (ER) na comparação dos dois grupos (jovens: 87,5% e meia-idade: 88% dos casos), não foi detectada diferença. O mesmo ocorreu na expressão do receptor de progesterona (RP), sendo 58% das pacientes jovens *versus* 70,5% das

pacientes do grupo de meia-idade com expressão deste receptor. Nos dois grupos, a maioria dos tumores não expressava HER2.

Tabela 9 - Marcadores de células-tronco, subtipos moleculares e outros biomarcadores distribuídos de acordo com a idade das pacientes

Parâmetros	Jovens ≤35 anos	Meia idade 36-65 anos	Valor de p
Fenótipo			
Luminal A	5 (21%)	7 (41%)	0,158
Luminal B	17 (71%)	8 (47%)	0,124
Triplo-negativo	2 (8%)	1 (6%)	0,767
Her2 positivo	0	1 (6%)	NA
RE			
Positivo	21 (87,5%)	15 (88%)	1,000
Negativo	3 (12,5%)	2 (12%)	
RP			
Positivo	10 (42%)	5 (29,5%)	0,103
Negativo	14 (58%)	12 (70,5%)	
Ki67			
Positivo	15 (62,5%)	12 (70,5%)	0,210
Negativo	0	0	
ND	9 (37,5%)	5 (29,5%)	
CD 24 Membrana			
Positivo	0	2 (12%)	0,166
Negativo	24 (100%)	15 (88%)	
CD24 Citoplasma			
Positivo	17 (71%)	15 (88%)	0,185
Negativo	7 (29%)	2 (12%)	
CD44 Membrana			
Positivo	7 (29%)	9 (53%)	0,124
Negativo	17 (71%)	8 (47%)	
CD44 Citoplasma			
Positivo	5 (21%)	7 (41%)	0,158
Negativo	19 (79%)	10 (59%)	
CD90 Células tumorais - Membrana			
Positivo	0	0	NA
Negativo	24 (100%)	17 (100%)	
CD90 Células tumorais - Citoplasma			
Positivo	4 (17%)	8 (47%)	0,024
Negativo	20 (83%)	9 (53%)	
CD90 Células estromais - Membrana			
Positivo	18 (75%)	13 (76,5%)	0,643
Negativo	6 (25%)	4 (23,5%)	
CD90 Células estromais - Citoplasma			
Positivo	0	0	NA
Negativo	24 (100%)	17 (100%)	

RE = receptor de estrógeno; RP = receptor de progesterona

ND = não demonstrado

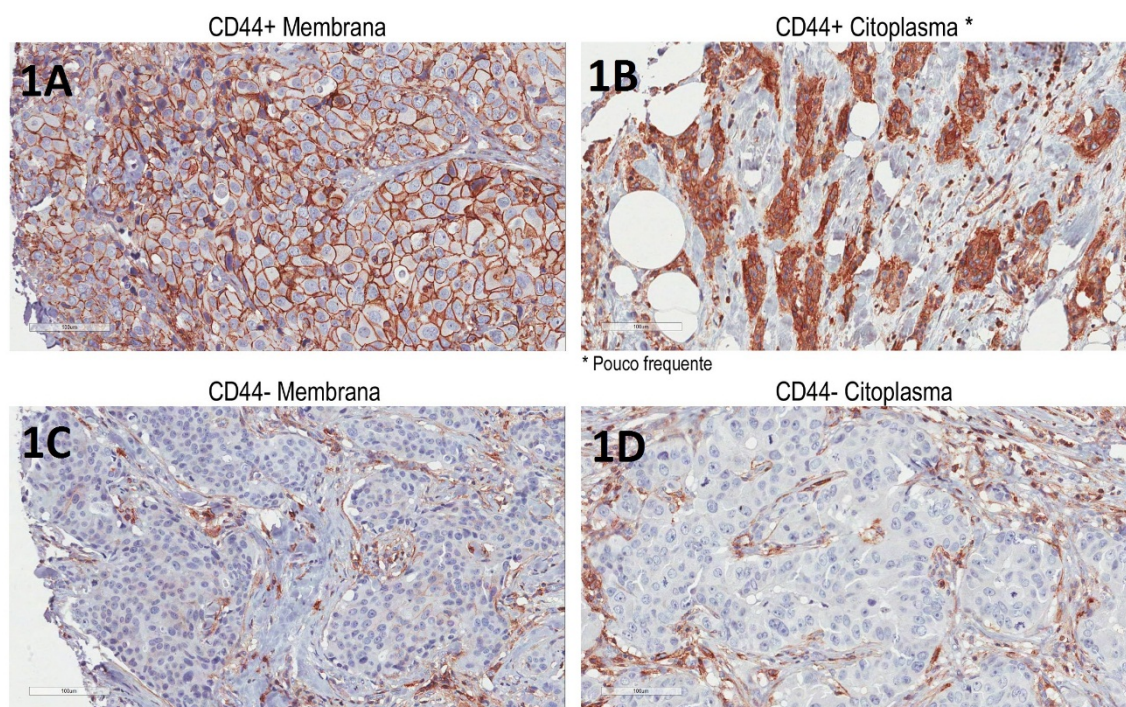
Foi observada alta positividade nos dois grupos de Ki67. No grupo das jovens, 37,5% das pacientes não tiveram a determinação de Ki67 e estão ocultas na **Tabela 9**. No caso das pacientes de meia-idade, essa porcentagem foi de 29,5%.

Conforme demonstrado na **Tabela 9**, na análise da expressão individual dos marcadores CD24, CD44 e CD90 foram observadas apenas diferenças significativas ($p = 0,024$) na expressão de CD90 no citoplasma de células tumorais, a qual foi positiva em maior frequência nos tumores das pacientes de meia-idade (47%) quando comparadas com as jovens (17%).

Como mostrado na **Tabela 9 e 10**, nos tumores de pacientes jovens, CD44 expressou-se positivamente na membrana em 7 casos (29% dos casos) e nos tumores de pacientes de meia-idade, em 9 casos (52% dos casos). No citoplasma, a expressão de CD44 foi positiva em 5 casos (21% dos casos) em pacientes jovens e em 7 (41% dos casos) das pacientes de meia-idade, porém não houve diferença estatisticamente significativa quando comparados os dois grupos de idade ($p = 0,124$ e $p = 0,158$, respectivamente). No núcleo não houve marcação de positividade. Imagens representativas da imunomarcacão do CD44 são mostradas na Figura 1A e 1B (positivos) e nas Figuras 1C e 1D (negativos).

Tabela 10 - Comparação entre a frequência do imunofenótipo CD44 na membrana e no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade

CD44	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)	Valor de p
Membrana	29%	52%	0,124
Citoplasma	21%	41%	0,158

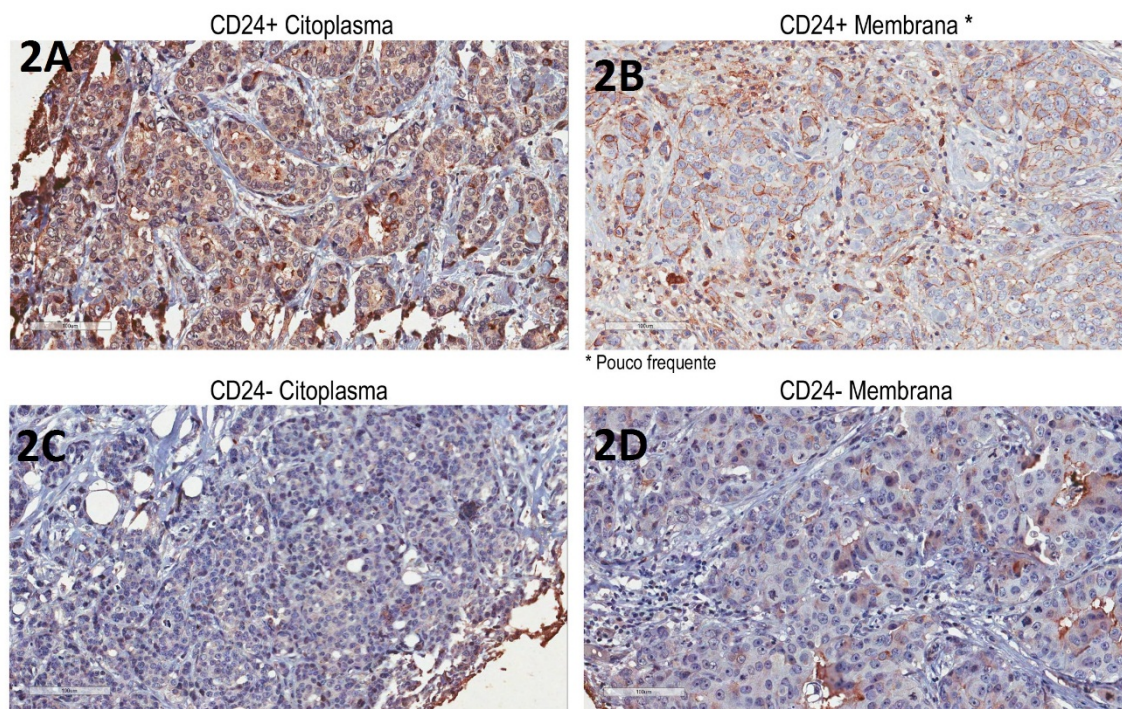


Figuras 1A e 1B. Marcação imunohistoquímica do CD44 positivo respectivamente na membrana e citoplasma de carcinomas luminais. **Figuras 1C e 1D.** Marcação do CD44 classificado como negativo na membrana e citoplasma de carcinomas luminais.

Conforme já mencionado por RICARDO et al. (2011), a marcação com CD24 foi detectada principalmente no citoplasma das células tumorais e a imunorreatividade foi classificada em: células com 0-10% de marcação foram consideradas negativas ou com baixa expressão, casos com marcação entre 10-25% foram consideradas positivas e rotuladas como 2+ e os tumores com positividade > 50% foram classificados como 3+. A frequência de positividade citoplasmática do CD24 de pacientes jovens foi de 70% dos casos, incluindo os casos 2+ e 3+. Em contraste, a marcação de CD24 na membrana de todos estes casos foi considerada como negativa bem como a marcação nuclear. Nos tumores das pacientes de meia-idade, observamos CD24 positivo no citoplasma em 88% e somente 11% dos tumores apresentaram marcação na membrana; no núcleo, esta foi predominantemente negativa (**Tabela 11**). Exemplos representativos do CD24 positivo ou negativo estão mostrados nas figuras 2A, 2B, 2C e 2D.

Tabela 11 - Comparação entre a frequência do imunofenótipo CD24 na membrana e no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade

CD24	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)	Valor de p
Membrana	0%	11%	0,166
Citoplasma	70%	88%	0,185



Figuras 2A e 2B. Exemplos representativos de amostras de câncer de mama marcados em análise imunohistoquímica para o CD24 positivo (2a, citoplasma; 2b, membrana).

Figuras 2C e 2D. Marcação negativa do CD24 respectivamente no citoplasma e membrana.

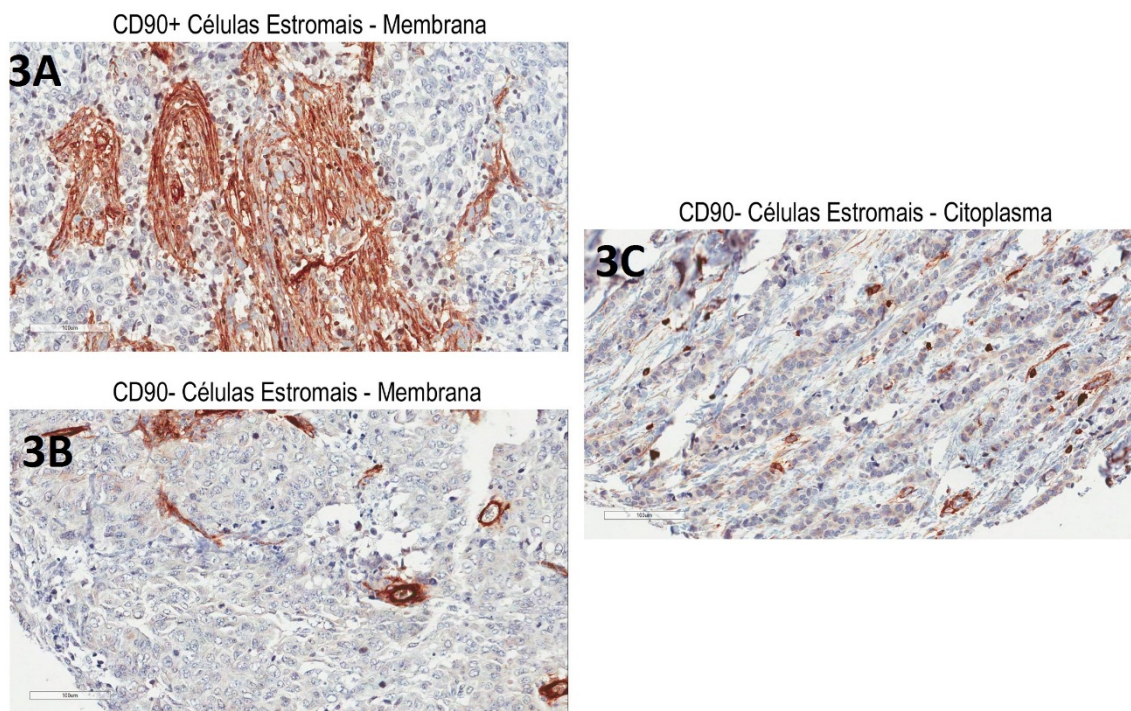
O CD90 foi avaliado tanto no componente epitelial dos tumores (Figuras 4A, 4B e 4C) como no estroma tumoral (Figuras 3A, 3B e 3C) e sua expressão foi observada na membrana e no citoplasma das células epiteliais tumorais. Nos tumores de pacientes jovens, o CD90 foi expresso na membrana das células estromais (75% dos casos) mas ausente no citoplasma. Nos tumores das pacientes de meia-idade, CD90 não foi expresso na membrana das células tumorais mas expressou-se no citoplasma das células tumorais em 47% dos casos e na membrana das

células estromais em 76% dos casos localizadas na periferia do tumor (Tabela 12).

Tabela 12 - Comparação entre a frequência do imunofenótipo CD90 na membrana e no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade

CD90	Células epiteliais			Células estromais		
	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)	Valor de p	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)	Valor de p
Membrana	0%	0%	NA	75%	76%	0,643
Citoplasma	16%	47%	0,024	0%	0%	NA

A análise comparativa da expressão do CD90 no citoplasma das células epiteliais tumorais indicou um aumento significativo ($p = 0,024$) da frequência de CD90 no citoplasma dos tumores de pacientes de meia idade (47%) *versus* tumores de pacientes jovens (16%). Figuras representativas 4A, 4B e 4C.



Figuras 3A, 3B, 3C. Exemplos representativos de espécimes de câncer de mama marcados em análise imunohistoquímica com CD90.

Figura 3A. Expressão fortemente positiva do CD90 na membrana das células estromais.

Figura 3B. Expressão negativa do CD90 na membrana das células estromais.

Figura 3C. Marcação fraca do CD90 no citoplasma das células estromais.

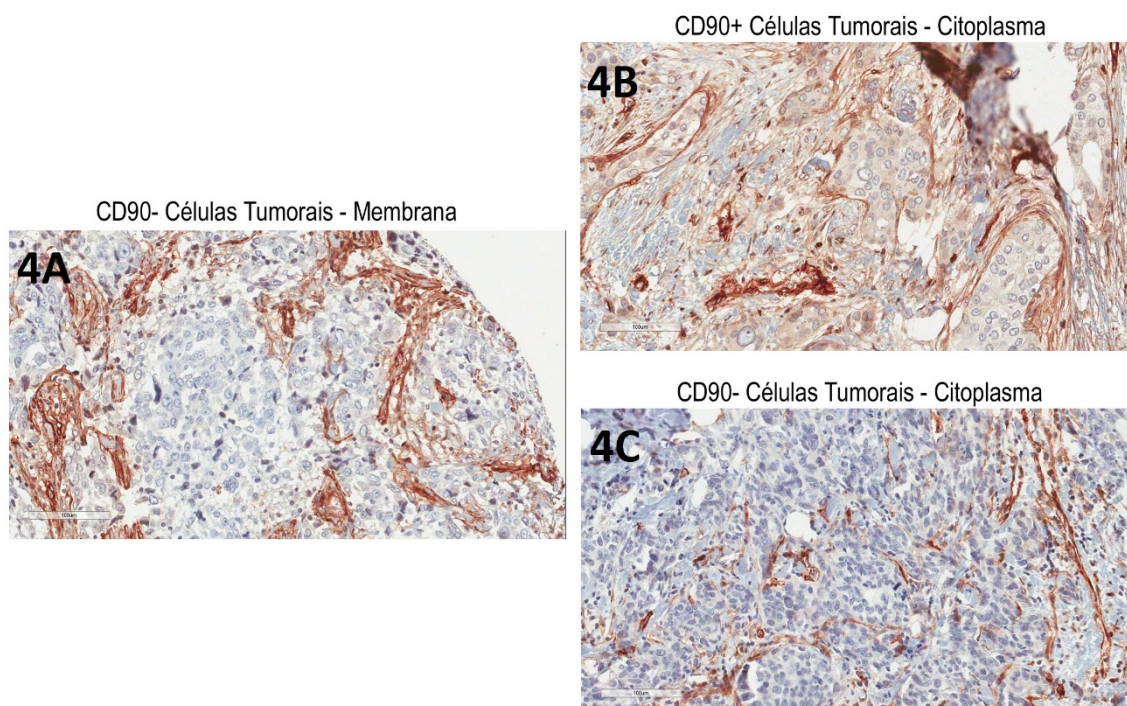


Figura 4A. Expressão do CD90 negativa nas células tumorais na membrana

Figura 4B. Expressão positiva no citoplasma.

Figura 4C. Expressão negativa no citoplasma das células tumorais.

Os parâmetros CD44 e CD24 expressos na membrana e citoplasma foram associados individualmente aos subtipos moleculares de câncer de mama e as características clínico-patológicas, conforme **Tabelas 13 a 16**. Em geral, não foram encontradas diferenças entre as frequências dos parâmetros clínico-patológicos analisados entre os dois grupos de pacientes classificados conforme a idade, porém verificamos que a expressão citoplasmática do CD24 associou-se significativamente à classificação T1 do tamanho do tumor em 73,25% dos casos das pacientes de meia-idade quando comparada a 29% nas pacientes jovens ($p = 0,035$) e também notamos uma tendência significativa ($p = 0,067$) quando comparados tumores classificados como T2, sendo estes mais frequente nas pacientes jovens (59%) quando comparados a pacientes de meia-idade (20%), como mostrado na **Tabela 13**. Não foi possível fazer qualquer associação da expressão de CD24 na membrana com características clínico-patológicas por falta de amostras que apresentassem esse imunofenótipo (**Tabela 14**).

Tabela 13 - Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD24 no citoplasma dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade

Parâmetros no citoplasma	Jovens CD24+ n = 17	Meia-idade CD24+ n = 15	Valor de p
Subgrupos			
Luminal A	4 (23,5%)	6 (40%)	0,316
Luminal B	12 (70,5%)	7 (46,5%)	
Triplo-negativo	1 (6%)	1 (6,75%)	
Her2 positivo	0	1 (6,75%)	
Tamanho			
T1	5 (29%)	11 (73,25%)	0,035
T2	10 (59%)	3 (20%)	0,067
T3	0	0	NA
Linfonodo			
N+	5 (29%)	7 (46,5%)	0,296
N0	11 (65%)	7 (46,5%)	
Metástase			
M0	15 (88%)	14 (93,25%)	1,000
M1	1 (6%)	0	
Grau nuclear			
I	1 (6%)	0	1,000
II	3 (17,5%)	3 (20%)	1,000
III	12 (70,5%)	12 (80%)	1,000
Ki67			
Positivo	10 (59%)	11 (73,25%)	0,388
Negativo	0	0	

Tabela 14 - Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD24 na membrana dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade

Parâmetros na membrana	Jovens CD24+ n = 0	Meia-idade CD24+ n = 2	Valor de p
Subgrupos			
Luminal A	0		NA
Luminal B	0	1	NA
Triplo-negativo	0		NA
Her2 positivo	0	1	NA
Tamanho			
T1	0	1	NA
T2	0		NA
T3	0		NA
Linfonodo			
N+	0		NA
N0	0	1	NA
Metástase			
M0	0	1	NA
M1	0		NA
Grau nuclear			
I	0		NA
II	0	1	NA
III	0	1	NA
Ki67			
Positivo	0	1	NA
Negativo	0		NA

Essa mesma associação foi feita com a expressão de CD44 no citoplasma e foi possível observar que houve diferença ($p = 0,015$) entre os dois grupos etários quando avaliado o tamanho do tumor. O tumor classificado como T1 foi mais frequente (71,5%) nas pacientes de meia-idade quando comparados com as pacientes jovens que não apresentaram nenhum tumor com essa classificação. Com as demais características, não

foi possível observar nenhuma diferença significativa (**Tabela 15**), assim como na comparação entre os dois grupos pela associação entre expressão de CD44 na membrana e características clínico-patológicas (**Tabela 16**).

Tabela 15 - Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD44 no citoplasma dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade

Parâmetros citoplasma	Jovens CD44+ n = 5	Meia-idade CD44+ n = 7	Valor de p
Subgrupos			
Luminal A	1 (20%)	2 (28,5%)	0,576
Luminal B	3 (60%)	5 (71,5%)	1,000
Triplo-negativo	1 (20%)	0	NA
Her2 positivo	0	0	NA
Tamanho			
T1	0	5 (71,5%)	0,015
T2	4 (80%)	2 (28,5%)	0,072
T3	0	0	NA
Linfonodo			
N+	1 (20%)	3 (43%)	1,000
N0	3 (60%)	4 (57%)	
Metástase			
M0	4 (80%)	7 (100%)	NA
M1	0	0	
Grau nuclear			
I	0	0	NA
II	1 (20%)	1 (14%)	1,000
III	4 (80%)	6 (86%)	1,000
Ki67			
Positivo	3 (60%)	7	0,152
Negativo	0	0	

Tabela 16 - Comparação entre características clínico-patológicas e a expressão individual do imunofenótipo CD44 na membrana dos tumores de pacientes jovens e de meia idade

Parâmetros membrana	Jovens CD44+ n = 7	Meia-idade CD44+ n = 9	Valor de p
Subgrupos			
Luminal A	2 (28,5%)	5 (55%)	0,358
Luminal B	5 (71,5%)	2 (22%)	0,126
Triplo-negativo	0	1 (11%)	NA
Her2 positivo	0	1 (11%)	NA
Tamanho			
T1	2 (28,5%)	6 (66%)	0,315
T2	4 (57%)	2 (22%)	0,302
T3	0	0	NA
Linfonodo			
N+	1 (14%)	4 (44,5%)	0,301
N0	5 (71,5%)	4 (44,5%)	
Metástase			
M0	6 (86%)	8 (89%)	NA
M1	0	0	
Grau nuclear			
I	1 (14%)	0	0,400
II	2 (28,5%)	2 (22%)	1,000
III	3 (43%)	7 (78%)	0,329
Ki67			
Positivo	3 (43%)	5 (55,5%)	1,000
Negativo	0	4 (44,5%)	

Foi avaliada também a coexpressão de CD44 e CD24 na membrana e citoplasma das células dos tumores nos dois grupos de idade, considerando 4 possíveis fenótipos: CD44⁺CD24⁺, CD44⁻CD24⁻, CD44⁺CD24⁻ e CD44⁻CD24⁺. Conforme demonstrado na Tabela 17, o fenótipo mais frequentemente presente no citoplasma de células epiteliais tumorais de pacientes jovens foi CD44⁻CD24⁺ (50%), seguido por CD44⁻CD24⁻ (29%) e CD44⁺CD24⁺ (21%), esse grupo de idade não apresentou o fenótipo

CD44⁺CD24⁻. Já o fenótipo prevalente apresentado no citoplasma das células epiteliais de tumores de pacientes de meia-idade foi o CD44⁻CD24⁺ (53%), seguido por CD44⁺CD24⁺ (35%), CD44⁺CD24⁻ e CD44⁻CD24⁻ (6% cada um). Entre os dois grupos, não foi observada nenhuma diferença significativa (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Comparação entre a frequência dos imunofenótipos CD44/CD24 no citoplasma de pacientes jovens e de meia-idade

Citoplasma	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)	Valor de p
CD44-CD24-	29%	6%	0,110
CD44+CD24+	21%	35%	0,303
CD44+CD24-	0%	6%	0,415
CD44-CD24+	50%	53%	0,853

Na comparação dos quatro possíveis fenótipos entre os dois grupos de idade, foi observada apenas uma tendência ($p = 0,058$) maior das células tumorais de pacientes jovens de apresentarem na membrana, o fenótipo CD44⁻CD24⁻ (71%) em comparação às células dos tumores de pacientes de meia-idade (41%). No grupo de pacientes jovens, foi observada a ausência de expressão dos fenótipos CD44⁺CD24⁺ e CD44⁻CD24⁺ e 29% das células apresentaram o fenótipo CD44⁺CD24⁻ na membrana celular. No grupo de meia-idade, foi observada expressão de CD44⁺CD24⁻ em 47% dos casos, seguidos pelos fenótipos CD44⁺CD24⁺ e CD44⁻CD24⁺ em 6% dos casos cada um, conforme demonstrado na **Tabela 18**.

Tabela 18 - Comparação entre a frequência dos imunofenótipos CD44/CD24 na membrana de pacientes jovens e de meia-idade

Membrana	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)	Valor de p
CD44-CD24-	71%	41%	0,058
CD44+CD24+	0%	6%	0,415
CD44+CD24-	29%	47%	0,241
CD44-CD24+	0%	6%	0,415

Quando essa coexpressão de cada possível fenótipo (CD44⁺CD24⁺, CD44⁻CD24⁻, CD44⁺CD24⁻ e CD44⁻CD24⁺) no citoplasma foi associada com as características clínico-patológicas e comparadas entre os grupos de idade, foi observada diferença significativa relacionada com a classificação T1 (p = 0,006), sendo que não houve nenhum tumor de paciente jovem nessa classificação, comparado com 83,5% dos casos de pacientes de meia-idade. O T2 também pôde ser diferenciado entre os grupos (p = 0,036), apresentando-se em 80% dos casos de pacientes jovens *versus* 16,5% das pacientes de meia-idade. No fenótipo CD44⁻CD24⁺, foi observada tendência (p = 0,056) maior dos tumores de pacientes jovens apresentarem um tumor de fenótipo molecular luminal B (75%) quando comparado com os tumores de pacientes de meia-idade (33,5%). Os fenótipos CD44⁻CD24⁻ e CD44⁺CD24⁻ não foram comparados devido a pequena quantidade de amostras representativas, como demonstrado na **Tabela 19**. Os casos que não tiveram suas características determinadas foram ocultados de todas as tabelas.

Tabela 19 - Comparação da associação de características clínico-patológicas e a expressão dos imunofenótipos CD44/CD24, positiva (pos) ou negativa (neg) no citoplasma dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade

Parâmetros citoplasma	Jovens A. pos/pos n = 5	Meia-idade A. pos/pos n = 6	p	Jovens B. neg/neg n = 7	Meia-idade B. neg/neg n = 1	p	Jovens C. neg/pos n = 12	Meia-idade C. neg/pos n = 9	p	Jovens D. pos/neg n = 0	Meia-idade D. pos/neg n = 1	p
Subgrupos												
Luminal A	1 (20%)	2 (33,5%)	1,000	1 (14,3%)	1	0,250	3 (25%)	4 (44,5%)	0,397	0	0	NA
Luminal B	3 (60%)	4 (66,5%)	1,000	5 (71,4%)	0	0,375	9 (75%)	3 (33,5%)	0,056	0	1	NA
Triplo-negativo	1 (20%)	0	NA	1 (14,3%)	0	NA	0	1 (11%)	NA	0	0	NA
Her2 positivo	0	0	NA	0	0	NA	0	1 (11%)	NA	0	0	NA
Tamanho												
T1	0	5 (83,5%)	0,006	2 (28,5%)	0	1,000	5 (41,5%)	5 (55,5%)	0,670	0	0	NA
T2	4 (80%)	1 (16,5%)	0,036	2 (28,5%)	1	0,375	6 (50%)	3 (33,5%)	0,445	0	1	NA
T3	0	0	NA	1 (14,3%)	0	1,000	0	0	NA	0	0	NA
Linfonodo												
N+	1 (20%)	3 (50%)	0,571	1 (14,3%)	0	1,000	4 (33,5%%)	4 (44,5%)		0	0	NA
N0	3 (60%)	3 (50%)		4 (57,2%)	1		8 (66,5%)	4 (44,5%)	0,468	0	1	NA
Metástase												
M0	4 (80%)	6 (100%)	NA	5 (71,4%)	1	NA	11 (91,5%)	8 (89%)		0	1	NA
M1	0	0		0	0		1 (8,5%)	0	1,000	0	0	NA
Grau nuclear												
I	0	0	NA	0	0	NA	1 (8,5%)		1,000			
II	1 (20%)	1 (16,5%)	1,000	3 (85,8%)	1	1,000	2 (16,5%)	2 (22%)	1,000	0	0	NA
III	4 (80%)	5 (83,5%)	1,000	3 (85,8%)	0	1,000	8 (66,5%)	7 (78%)	1,000	0	1	NA
Ki67												
Positivo	3 (60%)	6 (100%)	0,182	5 (71,4%)	0	0,375	7 (58,5%)	5 (55,5%)	0,899	0	1	NA

Na membrana celular, os fenótipos CD44⁺CD24⁺ e CD44⁻CD24⁺ não foram avaliados por pequena quantidade de amostra.

Nos demais fenótipos, não foram observadas nenhuma diferença na comparação dos dois grupos de idade pela associação dos fenótipos com as características clínico-patológicas, conforme mostrado na **Tabela 20**. De acordo com a tabela 18 os fenótipos CD44⁺/CD24⁺ e CD44⁻/CD24⁺ não foram expressos ou tiveram frequência muito baixa, e portanto, não foram apresentados nesta tabela.

Tabela 20 - Comparação da associação de características clínico-patológicas e a expressão dos imunofenótipos CD44/CD24, positiva (pos) ou negativa (neg) na membrana dos tumores de pacientes jovens e de meia-idade

Parâmetros membrana	Jovens A. pos/pos n = 0	Meia-idade A. pos/pos n = 1	p	Jovens B. neg/neg n = 17	Meia-idade B. neg/neg n = 7	p	Jovens C. neg/pos n = 0	Meia-idade C. neg/pos n = 1	p	Jovens D. pos/neg n = 7	Meia-idade D. pos/neg n = 8	p
Subgrupos												
Luminal A	0	0	NA	3 (17,5%)	2 (28,5%)	0,549	0	0	NA	2 (28,5%)	5 (62,5%)	0,315
Luminal B	0	0	NA	12 (70,5%)	5 (71,5%)	1,000	0	1	NA	5 (71,5%)	2 (25%)	0,132
Triplo-negativo	0	0	NA	2 (12%)	0	NA	0	0	NA	0	1 (12,5%)	NA
Her2 positivo	0	1	NA	0	0	NA	0	0	NA	0	0	NA
Tamanho												
T1	0	0	NA	5 (29%)	3 (43%)	0,647	0	1	NA	2 (28,5%)	6 (75%)	0,132
T2	0	0	NA	8 (47%)	4 (57%)	0,653	0	0	NA	4 (57%)	2 (25%)	0,315
T3	0	0	NA	1 (6%)	0	NA	0	0	NA	0	0	NA
T4	0	0	NA	1 (6%)	0	NA	0	0	NA	0	0	NA
ND	0	1	NA	2 (12%)	0	NA	0	0	NA	1 (14,5%)	0	NA
Linfonodo												
N+	0	0	NA	5 (29%)	3 (43%)	1,000	0	0	NA	1 (14,5%)	4 (50%)	
N0	0	0	NA	10 (59%)	4 (57%)		0	1	NA	5 (71%)	4 (50%)	0,301
Metástase												
M0	0	0	NA	14 (82%)	7 (100%)	1,000	0	1	NA	6 (85,5%)	8 (100%)	
M1	0	0	NA	1 (6%)	0		0	0	NA	0	0	NA
Grau nuclear												
I	0	0	NA		0	NA	0	0	NA	1 (14,5%)	0	0,429
II	0	0	NA	4 (23,5%)	1 (14%)	1,000	0	1	NA	2 (28%)	2 (25%)	1,000
III	0	1	NA	12 (70,5%)	6 (86%)	1,000	0	0	NA	3(43%)	6 (75%)	0,580
Ki67												
Positivo	0	0	NA	12 (71%)	6 (86%)	0,629	0	1	NA	3 (43%)	5 (62,5%)	
Negativo	0	0	NA	0	0		0	0	NA	0	0	0,619

A associação entre o fenótipo CD44⁺CD24⁺ e positividade de CD90 foi observada apenas no citoplasma de células epiteliais tumorais das pacientes de meia-idade (17,5% dos casos) e na membrana das células estromais (6% dos casos) das mesmas pacientes; além disso, esse grupo apresentou associação de expressão de CD90 com outros fenótipos, como o CD44⁻CD24⁻ (6%) e CD44⁻CD24⁺ (23,5%) no citoplasma de células epiteliais tumorais (**Tabela 21**). Já na membrana de células estromais desse mesmo grupo, houve associação dos fenótipos CD44⁻CD24⁻ (35%) e CD44⁺CD24⁻ (35%) com a positividade de CD90 (**Tabela 22**). CD44⁺CD24⁻ define um fenótipo mesenquimal e aguardávamos uma associação entre o CD90, com positividade para este último. No citoplasma das células tumorais, este fenótipo CD44⁺CD24⁻CD90⁺ não foi expresso nem nos tumores de pacientes jovens nem nos das mulheres de meia-idade, embora, na membrana das células estromais, o fenótipo tenha sido expresso respectivamente em 21% e 35% das jovens e meia idade.

Tabela 21 - Comparação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ no citoplasma de células tumorais em pacientes jovens e de meia-idade

Citoplasma - células tumorais	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)
CD44-CD24-CD90+	12,50%	6%
CD44+CD24+CD90+	0	17,50%
CD44+CD24-CD90+	0	0
CD44-CD24+CD90+	4%	23,50%

Tabela 22 - Comparação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ na membrana de células estromais em pacientes jovens e de meia-idade

Membrana - células estromais	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)
CD44 ⁻ CD24 ⁻ CD90 ⁺	54%	35%
CD44 ⁺ CD24 ⁺ CD90 ⁺	0	6%
CD44 ⁺ CD24 ⁻ CD90 ⁺	21%	35%
CD44 ⁻ CD24 ⁺ CD90 ⁺	0	0

No citoplasma das células estromais e na membrana das células tumorais, não houve associações da expressão positiva do CD90 com nenhum fenótipo em nenhum dos dois grupos (**Tabelas 23 e 24**). As pacientes jovens apresentaram associação da expressão positiva do CD90 com outros fenótipos, como o CD44⁻CD24⁻ (12,5%) e CD44⁻CD24⁺ (4%) no citoplasma de células tumorais (**Tabela 21**) e na membrana de células estromais, a expressão positiva de CD90 foi associada com CD44⁻CD24⁻ em 54% dos casos e CD44⁺CD24⁻ em 21% dos casos desse grupo de pacientes jovens (**Tabela 22**).

Tabela 23 - Comparação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ no citoplasma de células estromais em pacientes jovens e de meia-idade

Citoplasma - células estromais	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)
CD44 ⁻ CD24 ⁻ CD90 ⁺	0	0
CD44 ⁺ CD24 ⁺ CD90 ⁺	0	0
CD44 ⁺ CD24 ⁻ CD90 ⁺	0	0
CD44 ⁻ CD24 ⁺ CD90 ⁺	0	0

Tabela 24 - Associação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ na membrana de células tumorais em pacientes jovens e de meia-idade

Membrana - células tumorais	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)
CD44-CD24-CD90+	0	0
CD44+CD24+CD90+	0	0
CD44+CD24-CD90+	0	0
CD44-CD24+CD90+	0	0

Recidiva, metástase e ocorrência de óbito de todas as pacientes foram analisados, foi possível observar que, nas pacientes jovens, houve 5 casos de recidiva (1 deles tumor luminal A, 3 luminal B e 1 triplo-negativo) e 1 caso de metástase (luminal A), enquanto nas de meia-idade, foram registrados 1 caso de recidiva (HER2OE), 1 de metástase (luminal B) e 1 de óbito (luminal B), conforme **Tabela 25**.

Tabela 25 - Dados de sobrevida das pacientes

	Jovens (n = 24)	Meia-idade (n = 17)
Recidiva	5	1
Metástase	1	1
Óbito	0	1

Esses dados foram associados com cada fenótipo de coexpressão de CD44 e CD24 (**Tabela 26**) e foi possível observar que, nas jovens, todos os casos de recidivas e o caso de metástase ocorreram em pacientes que apresentavam células tumorais de fenótipo CD44⁻CD24⁻ na membrana. Já no citoplasma dessas pacientes, o fenótipo que mais se mostrou evidente

para recidiva e metástase foi o CD44⁻CD24⁺ seguido pelo CD44⁻CD24⁻. No grupo de pacientes de meia-idade, foi observada recidiva nos tumores de fenótipo CD44⁺CD24⁺ na membrana e metástase e óbito no grupo CD44⁻CD24⁻. Nesse mesmo grupo, o fenótipo CD44⁻CD24⁺ no citoplasma apresentou-se presente no caso de recidiva, metástase e óbito, conforme

Tabela 26.

Tabela 26 - Dados de sobrevida associados com fenótipos de coexpressão de CD44/CD24 nos dois grupos de idade

	Jovens CD44+ CD24+	Meia- idade CD44+ CD24+	Jovens CD44- CD24-	Meia- idade CD44- CD24-	Jovens CD44+ CD24-	Meia- idade CD44+ CD24-	Jovens CD44- CD24+	Meia- idade CD44- CD24+
Sobrevida (M)								
Recidiva	0	1	5	0	0	0	0	0
Metástase	0	0	1	1	0	0	0	0
Óbito	0	0	0	1	0	0	0	0
Sobrevida (C)								
Recidiva	0	0	2	0	0	0	3	1
Metástase	0	0	0	0	0	0	1	1
Óbito	0	0	0	0	0	0	0	1

(M) = membrana; (C) = citoplasma

A expressão de ALDH1 foi a menos frequente entre os marcadores examinados nos 24 casos de pacientes com idade entre 36-65 anos e 18 casos de pacientes com idade ≤ 35 anos que compunham o TMA. Nos tumores de pacientes de meia idade todos os casos foram negativos e nas pacientes mais jovens só uma pequena porcentagem (2,2%) foi positiva. Um exemplo de ALDH1 positivo está apresentado na figura 5A

ALDH 1 positivo nas células neoplásicas 1000X

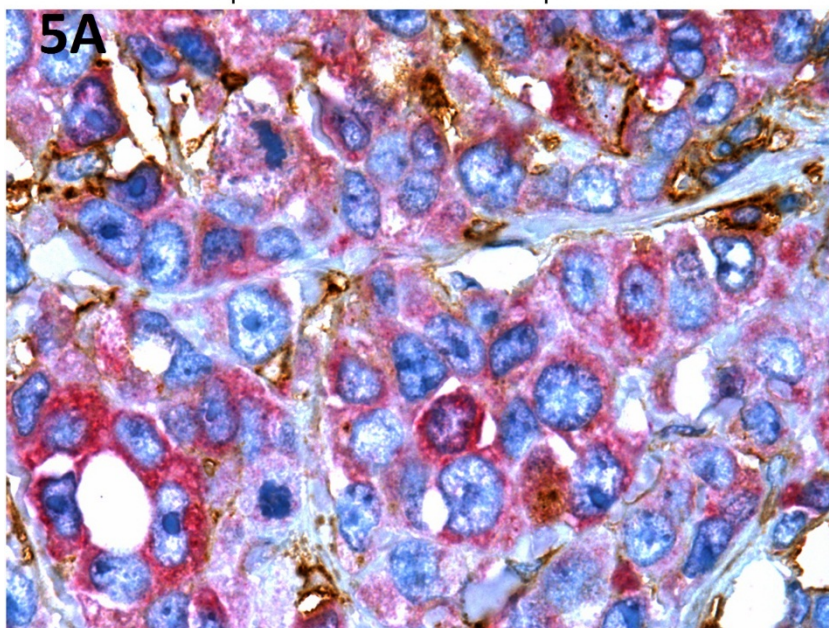


Figura 5A - Marcação imunohistoquímica citoplasmática do ALDH1 em amostra positiva de câncer de mama, marcado com coloração marrom, juntamente com a grande população de células tumorais negativas coradas em azul.

Os dados gerais de cada paciente estão descritos na **Tabela 27**.

Tabela 27 - Informações gerais das pacientes jovens

Pac.	Idade	Grupo	Fenótipo molecular	ER	PR	HER2	Ki67	Tamanho do tumor	Linfonodos	Metástase	Grau nuclear	CD24 M	CD24 C	CD44 M	CD44 C	CD90 TM	CD90 EM	CD90 TC	CD90 EC
1	34	Jovem	Triplo-negativo	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	NA	NA	NA	3	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
2	33	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T3	0	0	2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.
3	33	Jovem	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	NA	NA	NA	NA		Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.
4	32	Jovem	Triplo-negativo	Neg.	Neg.	Neg.	NA	T2	0	NA	3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
5	30	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	T2	0	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
6	33	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	T2	1	0	NA	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
7	34	Jovem	Luminal B	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	T1	0	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
8	35	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T2	0	0	2	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
9	27	Jovem	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	NA	T4	2	1	2	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
10	34	Jovem	Luminal B	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	T1	0	0	2	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
11	34	Jovem	Luminal B	Pos.	Neg.	Neg.	NA	T2	0	0	3	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
12	35	Jovem	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	NA	T2	2	0	2	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
13	33	Jovem	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	NA	T2	0	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
14	35	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	NA	NA	NA	3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
15	35	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T2	1	0	2	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
16	34	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	T1	1	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
17	31	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T2	0	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
18	34	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	T2	0	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
19	35	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	NA	T1	3	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
20	35	Jovem	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	NA	T1	0	0	3	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
21	30	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	T2	0	0	3	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
22	34	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	NA	T1	0	0	1	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
23	31	Jovem	Luminal B	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	T1	0	0	3	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
24	34	Jovem	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T2	0	0	3	Neg.	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.

continua

cont/ Tabela 27

Pac.	Idade	Grupo	Fenótipo molecular	ER	PR	HER2	Ki67	Tamanho do tumor	Linfonodos	Metástase	Grau nuclear	CD24 M	CD24 C	CD44 M	CD44 C	CD90 TM	CD90 EM	CD90 TC	CD90 EC
25	54	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T1	0	0	3	Neg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
26	57	Meia-idade	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T1	1	0	3	Neg	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
27	64	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T1	0	0	3	Neg	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
28	55	Meia-idade	Luminal A	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	T1	1	0	3	Neg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
29	54	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T2	1	0	3	Neg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
30	59	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	T2	2	0	3	Neg	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
31	59	Meia-idade	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	NA	T1	0	0	2	Neg	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
32	64	Meia-idade	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	NA	T2	0	0	2	Neg	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
33	41	Meia-idade	Triplo-negativo	Neg.	Neg.	Neg.	NA	T2	0	0	3	Neg	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
34	61	Meia-idade	Her2 OE	Neg.	Neg.	Pos.	NA	NA	NA	NA	3	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
35	58	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T2	0	0	3	Neg	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
36	57	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T2	1	0	3	Neg	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.
37	59	Meia-idade	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	T1	1	0	3	Neg	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Neg.
38	63	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	T1	0	0	2	Pos.	Pos.	Neg.	Pos.	NA	NA	NA	NA
39	55	Meia-idade	Luminal B	Pos.	Pos.	Pos.	Pos.	T1	0	0	3	Neg	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Pos.	Neg.	Neg.
40	59	Meia-idade	Luminal A	Pos.	Neg	Neg	Pos.	T1	0	0	3	Neg	Pos.	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Neg.	Neg.
41	58	Meia-idade	Luminal A	Pos.	Pos.	Neg	NA	T1	1	0	2	Neg	Pos.	Pos.	Neg.	Neg.	Pos.	Pos.	Neg.

Pac = Paciente; Pos = positivo; Neg = negativo; CD24 M = CD24 membrana; CD24 C = CD24 citoplasma; CD44 M = CD44 membrana; CD44 C = CD44 citoplasma; CD90 TM = CD90 tumoral membrana; CD90 EM = CD90 estromal membrana; CD90 TC = CD90 tumoral citoplasma; CD90 EC = CD90 estromal citoplasma

4.7 SÍNTESE DOS RESULTADOS

4.7.1 Casuística

A análise apresentada constitui uma revisão de 208 pacientes com idade ≤ 35 anos e 77 pacientes de meia-idade diagnosticadas com câncer de mama e tratadas em uma única instituição. Comparamos as diferenças entre essas duas populações de pacientes. Nossos resultados indicaram que as pacientes jovens apresentaram características clínico-patológicas mais agressivas, incluindo grau tumoral mais elevado e positividade para Ki67 mais frequente.

4.7.2 Comparação de biomarcadores e subtipos moleculares (usando resultados imunohistoquímicos como marcadores substitutivos) entre os dois grupos de idade

Quando comparados biomarcadores e subtipos de pacientes classificadas como jovens de idade ≤ 35 anos com o grupo de pacientes de meia-idade com idade entre 50-65 anos, foi possível verificar que, na nossa casuística, não houve diferenças significativas na expressão de ER, PR, HER2 e Ki67. Além disso, não houve diferença na distribuição dos subtipos (Luminal A e B), embora a frequência do luminal B tenha mostrado uma tendência a ser maior nos tumores das jovens quando comparados as de meia-idade, triplo-negativo e HER2OE.

4.7.3 Comparação entre a frequência dos imunofenótipos de pacientes jovens e de meia-idade

Quando a comparação dos dois grupos etários foi realizada com os imunofenótipos, observou-se uma diferença apenas na expressão do CD90 no citoplasma de células epiteliais tumorais, que teve maior expressão no grupo de meia-idade.

4.7.4 Associação entre características clínico-patológicas e a expressão individual dos imunofenótipos CD44 e CD24 nos tumores de pacientes jovens

Quando os imunofenótipos foram relacionados com as características em cada grupo e comparados, concluímos que houve apenas diferença nos tamanhos dos tumores, sendo T1 mais frequente no grupo de pacientes jovens e T2 mais frequente no grupo de pacientes de meia-idade. As demais características não se mostraram diferentes entre os dois grupos.

4.7.5 Comparação entre a frequência dos imunofenótipos CD44/CD24 pacientes jovens e de meia-idade e associação de características clínico-patológicas

Dos 4 fenótipos possíveis, apenas o CD44⁺CD24⁺ diferenciou os grupos, sendo mais frequente nas pacientes jovens quando comparados com as de meia-idade.

Assim como na análise dos fenótipos individuais, na associação feita com características clínico-patológicas, foram observadas diferenças apenas

relacionadas com o tamanho do tumor. No fenótipo CD44⁺CD24⁺ expressos no citoplasma, as pacientes de meia-idade demonstraram mais casos em T1 enquanto as pacientes jovens apresentavam mais casos em T2.

4.7.6 Associação entre os marcadores CD44/CD24/CD90+ na membrana de células tumorais em pacientes jovens e de meia-idade

No citoplasma de células estromais e na membrana de células tumorais, não houve a expressão de CD90. O fenótipo classificado como marcador de célula-tronco (CD44⁺CD24⁻) junto com a expressão de CD90 mostrou-se presente apenas na membrana de células estromais nos dois grupos de idade em quantidades semelhantes.

4.7.7 Sobrevida

A quantidade de casos de recidiva, metástase e óbito foi baixa, portanto a associação com os fenótipos não trouxe uma conclusão definitiva.

5 DISCUSSÃO

Células-tronco em câncer apresentam características semelhantes a células-tronco de tecidos adultos normais, tais como a capacidade de autorrenovação através de sua divisão celular assimétrica, produzindo uma célula-tronco tumorigênica e uma célula não tumorigênica destinada à diferenciação terminal. Este conceito implica que essas células-tronco no câncer encontram-se hierarquicamente organizadas de uma maneira muito similar as células do tecido normal, a progênie de uma célula tronco normal resulta em uma população de células fenotipicamente diferentes com potencial proliferativo limitado que compõem a massa tumoral (SCHMITT et al. 2012).

No entanto, estas células diferenciadas não formam tumores quando transplantadas em xenoenxertos de recipientes compatíveis e, somente uma pequena porcentagem de células-tronco pode transferir características neoplásicas. Portanto, de acordo com esta teoria, o câncer depende de uma pequena população de células-tronco para seu crescimento e expansão. Os marcadores de células-tronco mais estudados são as proteínas transmembrânicas CD44 e CD24.

Uma subpopulação de células tumorais que coexpressam CD44+ e CD24 negativo/*low* foi inicialmente identificada por AL-HAJJ et al. (2003), apresentando grande probabilidade de gerar tumores em um modelo animal mesmo quando implantadas em pequeno número. Essas células se

distinguem da população não tumorigênica que não expressa a composição CD44⁺CD24⁻. CD24 é uma pequena proteína da família das mucinas, altamente glicosilada e ligada a membrana celular e está envolvida em proliferação e interações célula-célula. A proteína CD44 é uma glicoproteína e um receptor transmembrana do ácido hialurônico, um componente de matriz extracelular. Tumores expressando o fenótipo CD44⁺CD24⁻ foram associados previamente com o subtipo molecular basal e prognóstico pobre (HONETH et al. 2008; RICARDO et al. 2011). No nosso estudo, o fenótipo CD44⁺CD24⁻ expressou-se na membrana em 29% dos tumores de pacientes jovens e em 47% das pacientes de meia-idade, mas não se associou às características clínico-patológicas agressivas. Alguns estudos verificaram que o fenótipo CD44⁺CD24⁻ não estava associado com outros parâmetros de agressividade (ABRAHAM et al. 2005; MYLONA et al. 2008), mas o fenótipo CD44⁻CD24⁻ definiu um grupo de pacientes com mau prognóstico e associação com alto grau histológico (GIATROMANOLAKI et al. 2011) e o fenótipo CD44⁻CD24⁺ associou-se a um desfecho desfavorável (MYLONA et al. 2008).

O fenótipo CD44⁻CD24⁺, descrito como sendo enriquecido em tumores luminais (SCHMITT et al. 2012), apresentou-se negativo na membrana das células tumorais de pacientes jovens na nossa casuística; no citoplasma, expressou-se em 50% das células dessas mesmas pacientes. Uma mudança na localização do CD24 encontrado em tumores bem diferenciados para imunoexpressão citoplasmática poderia refletir uma transição de células epiteliais tumorais a um fenótipo mais invasivo

(OLIVEIRA-COSTA et al. 2011) e este fenótipo $CD44^-CD24^+$ já foi associado a um desfecho desfavorável (MYLONA et al. 2008).

Portanto, outros fenótipos advindos da associação CD44 e CD24 podem ser úteis na identificação de subgrupos de pacientes com câncer de mama com comportamentos clínicos diferentes. Determinamos a frequência de tumores com os marcadores de células-tronco ($CD44^+CD24^-$): no citoplasma, foram expressos em 29% dos tumores de pacientes jovens e o fenótipo $CD44^-CD24^+$ expresso em 50% dos casos. GIATROMANOLAKI et al. (2011) sugeriram que a ausência do CD44 promove invasão caracterizando agressividade.

Nas pacientes de meia-idade, o fenótipo $CD44^-CD24^-$ expressou-se em apenas 6% dos casos. Nossos resultados demonstraram uma variação na expressão do fenótipo $CD44^-CD24^-$ no citoplasma que diferenciou os grupos, sendo mais frequente em tumores de pacientes jovens, embora sem alcançar significância estatística ($p = 0,110$).

Os tumores luminais representam o subtipo molecular de câncer de mama mais comumente diagnosticado. Em geral apresentam um prognóstico mais favorável comparados nos outros subtipos, mas ocasionalmente mostram resistência à terapia hormonal ou quimioterapia e permanecem um problema (HIGGINS e STEARNS 2009).

No presente estudo, a presença de células-tronco identificadas pelo fenótipo $CD44^+CD24^-$ de membrana associou-se positivamente com o subtipo luminal B, um fenótipo molecular que aparece com maior frequência nos tumores de pacientes jovens (71.5%) quando comparados às pacientes

mais velhas (25%), embora sem atingir significância estatística ($p = 0,132$). O subtipo luminal B associa-se usualmente a um pior prognóstico, indicando uma possível contribuição das células-tronco à agressividade dos tumores de pacientes jovens.

Considerando o prognóstico pior dos tumores luminais B quando comparados aos luminais A, a presença do fenótipo CD44+CD24⁻ poderia ser considerada um preditor de mau prognóstico, especialmente no subtipo luminal B das pacientes jovens. Um estudo anterior de TSANG et al. (2012) já havia verificado esta associação com o câncer de mama luminal B, analisando uma coorte de mulheres jovens com câncer de mama sem estratificação por idade. Os autores sugeriram a possível contribuição das células-tronco à agressividade desse grupo de tumores luminais.

Vários outros marcadores foram propostos, incluindo aldeído-desidrogenase-1 (ALDH1), que se mostrou associada a quimiorresistência e pior prognóstico (GINESTIER et al. 2007; ZHOU et al. 2010; TAN et al. 2013). ALDH1 pertence a uma família de enzimas citosólicas envolvidas na oxidação de aldeídos intracelulares, conferindo resistência a agentes alquilantes e protegendo células-tronco contra insultos oxidativos e oxida retinaldeído a ácido retinoico durante a diferenciação de células-tronco rudimentares (BALICKI 2007) controlando sua proliferação (HUANG et al. 2009).

A expressão de ALDH1 e seu efeito prognóstico dependente da idade foi sugerida por MIEOG et al. (2012) e uma alta expressão de ALDH1 foi observada em pacientes jovens < 35 anos por TAN et al. 2013. Adicionalmente, positividade de ALDH1 foi descrita como associada ao

subtipo *basal-like* e HER-2 (TSANG et al. 2012). A correlação com idade não foi encontrada por DE BROT et al. (2012) analisando pacientes com tumores triplo-negativos, bem como a correlação entre ALDH1 e marcadores basais ou marcadores clínico-patológicos de mau prognóstico. Na nossa casuística, todas as 24 pacientes de meia-idade tiveram resultados negativos e nas pacientes jovens (17), somente 4 apresentaram positividade forte, conforme visualizado na **Figura 5A, nos Anexos**, ou seja, a expressão de ALDH1 foi verificada no citoplasma de poucas células epiteliais tumorais, embora uma expressão fortemente positiva tenha sido notada em alguns casos. Uma possível explicação poderia estar no fato de que a maioria dos nossos casos foi classificada como pertencendo aos fenótipos moleculares luminais A e B. De fato, o subtipo luminal A mostrou a mais baixa positividade de ALDH1 (8.6%) de que outros subtipos, conforme visto também na literatura (TSUKABE et al. 2013).

Vários estudos recentes sugeriram uma correlação entre células-tronco e a transição epitélio-mesenquimal (EMT) (MANI et al. 2008), embora outros tenham sugerido que células-tronco e EMT seriam mutualmente exclusivas (TSUJI et al. 2008). O fenótipo CD44⁺CD24⁻ identificou células-tronco mesenquimais conforme LIU et al. (2013). No presente trabalho, comparamos as expressões simultâneas dos diferentes fenótipos CD44/CD24 e com a positividade do CD90 nos tumores dos diferentes grupos estudados e verificamos que tanto em tumores de pacientes jovens como de meia-idade, não apresentavam casos com expressão simultânea do fenótipo CD44⁺CD24⁻ e CD90⁺ na membrana celular e no citoplasma das

células tumorais, indicando que esses marcadores são expressos em populações distintas. Na membrana das células estromais, porém, encontramos que 21% dos tumores das pacientes jovens e 35% das pacientes de meia-idade expressam simultaneamente os diferentes marcadores mesenquimais. O marcador CD90⁺ caracteriza células mesenquimais estromais multipotentes (DOMINICI et al. 2006) e foi previamente associado à proliferação e ao grau de malignidade em linhagens de câncer de mama em cultura isoladas de tumores primários (LOBBA et al. 2012). DONNENBERG et al. (2010) demonstraram que carcinomas de mama contêm uma pequena população de células CD44⁺CD90⁺ localizada na periferia, adjacente ao estroma CD90⁺. Em câncer de próstata, um aumento da expressão do CD90 associou-se à presença de fibroblastos associados ao tumor no microambiente e poderia servir como um biomarcador de câncer (PASCAL et al. 2009, TRUE et al. 2010). Células estromais que expressam simultaneamente os três marcadores (CD44⁺CD24⁻CD90⁺) poderiam indicar a existência de uma subpopulação de fibroblastos associados aos tumores luminais, capazes de favorecer um comportamento mais agressivo desses tumores.

6 CONCLUSÃO

Em geral, os cânceres de mama luminais apresentam um prognóstico mais favorável. Todavia, algumas vezes estes tumores apresentam resistência para o tratamento hormonal convencional. Os cânceres de mama CD44+CD24-, observado nas pacientes jovens, também foram associados positivamente com câncer de luminal B, de pior prognóstico. A possível contribuição deste estudo para esses cânceres luminais, mais agressivos foi avaliada quando comparados os grupos de mulheres jovens e de meia-idade, pois nossas pacientes eram preferencialmente portadoras de cânceres de mama subtipo luminal e nas pacientes jovens, luminal B.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clin Cancer Res** 2005; 11:1154-9.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2003; 100:3983-8.

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. **Mod Pathol** 1998; 11:155-68.

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. **J Clin Oncol** 2008; 26:3324-30.

Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the surveillance, epidemiology, and end results database. **Breast Cancer Res Treat** 2002; 76:27-36.

Asselin-Labat ML, Vaillant F, Sheridan JM, et al. Control of mammary stem cell function by steroid hormone signalling. **Nature** 2010; 465:798-802.

Balicki D. Moving forward in human mammary stem cell biology and breast cancer prognostication using ALDH1. **Cell Stem Cell** 2007; 1:485-7.

Bastos EP, Brentani H, Pereira CA, et al. A set of miRNAs, their gene and protein targets and stromal genes distinguish early from late onset er positive breast cancer. **PLoS One** 2016; 11:e0154325.

Benz CC. Impact of aging on the biology of breast cancer. **Crit Rev Oncol Hematol** 2008; 66:65-74.

Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. **Oncol Rep** 2012; 27:28-38.

Bozorgi A, Khazaei M, Khazaei MR. New findings on breast cancer stem cells: a review. **J Breast Cancer** 2015; 18:303-12.

Cancello G, Maisonneuve P, Rotmensz V, et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. **Ann Oncol** 2010; 21:1974-81.

Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. **Cell** 2006; 124:1111-5.

Colleoni M, Rotmensz N, Robertson C, et al. Very young women (<35 years) with operable breast cancer: features of disease at presentation. **Ann Oncol** 2002; 13:273-9.

Darwish AD, Helal AM, Aly El-Din NH, Solaiman LL, Amin A. Breast cancer in women aging 35 years old and younger: The Egyptian National Cancer Institute (NCI) experience. **Breast** 2017; 31:1-8.

De Brot M, Rocha RM, Soares FA, Gobbi H. Prognostic impact of the cancer stem cell related markers ALDH1 and EZH2 in triple negative and basal-like breast cancers. **Pathology** 2012; 44:303-12.

Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. **Cytotherapy** 2006; 8:315-7.

Donnenberg VS, Donnenberg AD, Zimmerlin L, et al. Localization of CD44 and CD90 positive cells to the invasive front of breast tumors. **Cytometry B Clin Cytom** 2010; 78:287-301.

El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, et al. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. **BMC Cancer** 2006; 6:194.

Elkum N, Dermime S, Ajarim D, et al. Being 40 or younger is an independent risk factor for relapse in operable breast cancer patients: the Saudi Arabia experience. **BMC Cancer** 2007; 7:222.

Elston, Elis, 1998 - *Tumors of the breast*. In Fletcher C, (ed) Diagnostic histopathology of tumors, 2nd, New York.

Fackenthal JD, Olopade OI. Breast cancer risk associated with BRCA1 and BRCA2 in diverse populations. **Nat Rev Cancer** 2007; 7:937-48.

Fernandopulle SM, Cher-Siangang P, Tan PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. **Pathology** 2006; 38:219-22.

Fillmore CM, Gupta PB, Rudnick JA, et al. Estrogen expands breast cancer stem-like cells through paracrine FGF/Tbx3 signaling. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:21737-42.

Gajdos C, Tartter PI, Bleiweiss IJ, Bodian C, Brower ST. Stage 0 to stage III breast cancer in young women. **J Am Coll Surg** 2000; 190:523-9.

Genestie C, Zafrani B, Asselain B, et al. Comparison of the prognostic value of Scarff-Bloom-Richardson and Nottingham histological grades in a series of 825 cases of breast cancer: major importance of the mitotic count as a component of both grading systems. **Anticancer Res** 1998; 18:571-6.

Gentilini O, Botteri E, Rotmensz N, et al. Breast-conserving surgery in 201 very young patients (<35 years). **Breast** 2010; 19:55-8.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. **Med Oncol** 2011; 28:745-52.

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; 1:555-67.

Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, et al. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. **Cancer** 2005; 102:2466-72.

Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. **Science** 1977; 197:461-3.

Han JG, Jiang YD, Zhang CH, et al. Clinicopathologic characteristics and prognosis of young patients with breast cancer. **Breast** 2011; 20:370-2.

Han W, Kang SY; Korean Breast Cancer Society. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 119:193-200.

Hanahan D, Weinberg RA. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell** 2011; 144:646-74.

Higgins MJ, Stearns V. Understanding resistance to tamoxifen in hormone receptor-positive breast cancer. **Clin Chem** 2009; 55:1453-5.

Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. **Breast Cancer Res** 2008; 10:R53.

Huang EH, Hynes MJ, Zhang T, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a marker for normal and malignant human colonic stem cells (SC) and tracks SC overpopulation during colon tumorigenesis. **Cancer Res** 2009; 69:3382-9.

Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, et al. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. **Nature** 2010; 465:803-7.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. **J Clin Invest** 2009; 119:1420-8.

Kataoka A, Iwamoto T, Tokunaga E, et al. Young adult breast cancer patients have a poor prognosis independent of prognostic clinicopathological factors: a study from the Japanese Breast Cancer Registry. **Breast Cancer Res Treat** 2016; 60:163-72.

Kim EK, Noh WC, Han W, Noh DY. Prognostic significance of young age (<35 years) by subtype based on ER, PR, and HER2 status in breast cancer: a nationwide registry-based study. **World J Surg** 2011; 35:1244-53.

Laloo F, Varley J, Moran A, et al. BRCA1, BRCA2 and TP53 mutations in very early-onset breast cancer with associated risks to relatives. **Eur J Cancer** 2006; 42:1143-50.

Liu R, Wang X, Chen GY, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. **N Engl J Med** 2007; 356:217-26.

Liu S, Cong Y, Wang D, et al. Breast cancer stem cells transition between epithelial and mesenchymal states reflective of their normal counterparts. **Stem Cell Reports** 2013; 2:78-91.

Lobba AR, Forni MF, Carreira AC, Sogayar MC. Differential expression of CD90 and CD14 stem cell markers in malignant breast cancer cell lines. **Cytometry A** 2012; 81:1084-91.

Mandel K, Yang Y, Schambach A, Glage S, Otte A, Hass R. Mesenchymal stem cells directly interact with breast cancer cells and promote tumor cell growth in vitro and in vivo. **Stem Cells Dev** 2013; 22:3114-27.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, et al. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. **Cell** 2008; 133:704-15.

Mieog JS, de Kruijf EM, Bastiaannet E, et al. Age determines the prognostic role of the cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase-1 in breast cancer. **BMC Cancer** 2012; 12:42.

Morel AP, Lièvre M, Thomas C, Hinkal G, Ansieau S, Puisieux A. Generation of breast cancer stem cells through epithelial-mesenchymal transition. **PLoS One** 2008; 3:e2888.

Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. **Hum Pathol** 2008; 39:1096-102.

Oliveira-Costa JP, Zanetti JS, Silveira GG, et al. Differential expression of HIF-1 α in CD44+CD24-/low breast ductal carcinomas. **Diagn Pathol** 2011; 6:73.

Ortega Jacome GP, Koifman RJ, Rego Monteiro GT, Koifman S. Environmental exposure and breast cancer among young women in Rio de Janeiro, Brazil. **J Toxicol Environ Health A** 2010; 73:858-65.

Pascal LE, Goo YA, Vêncio RZ, et al. Gene expression down-regulation in CD90+ prostate tumor-associated stromal cells involves potential organ-specific genes. **BMC Cancer** 2009; 9:317.

Pattabiraman DR, Weinberg RA. Tackling the cancer stem cells - what challenges do they pose? **Nat Rev Drug Discov** 2014; 13:497-512.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. **Nat Rev Cancer** 2009; 9:265-73.

Quan ML, Paszat LF, Fernandes KA, et al. The effect of surgery type on survival and recurrence in very young women with breast cancer. **J Surg Oncol** 2017; 115:122-30.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature** 2001; 414:105-11.

Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **J Clin Pathol** 2011; 64:937-46.

Schmitt F, Ricardo S, Vieira AF, Dionísio MR, Paredes J. Cancer stem cell markers in breast neoplasias: their relevance and distribution in distinct molecular subtypes. **Virchows Arch** 2012; 460:545-53.

Sidoni A, Cavaliere A, Bellezza G, Scheibel M, Bucciarelli E. Breast cancer in young women: clinicopathological features and biological specificity. **Breast** 2003; 12:247-50.

Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. **Nat Rev Cancer** 2003; 3:832-44.

Sobin LH, Gospodarowicz MK, Wittekind C. **TNM Classificação dos tumores malignos**. [tradução de A L M Eisenberg]. 7ª ed. Rio de Janeiro: INCA; 2012. Tumores da mama; p.187-200.

Tan EY, Thike AA; Breast Surgical Team at Outram, Tan PH. ALDH1 expression is enriched in breast cancers arising in young women but does not predict outcome. **Br J Cancer** 2013; 109:109-13.

Thuerlimann B. International consensus meeting on the treatment of primary breast cancer 2001, St. Gallen, Switzerland. **Breast Cancer** 2001; 8:294-7.

True LD, Zhang H, Ye M, et al. CD90/THY1 is overexpressed in prostate cancer-associated fibroblasts and could serve as a cancer biomarker. **Mod Pathol** 2010; 23:1346-56.

Tsang JY, Huang YH, Luo MH, et al. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2012; 136:407-17.

Tsuji T, Ibaraji S, Shima K, et al. Epithelial-mesenchymal transition induced by growth suppressor p12CDK2-AP1 promotes tumor cell local invasion but suppresses distant colony growth. **Cancer Res** 2008; 68:10377-86.

Tsukabe M, Shimazu K, Morimoto K, et al. Clinicopathological analysis of breast ductal carcinoma in situ with ALDH1-positive cancer stem cells. **Oncology** 2013; 85:248-56.

Uhrhammer N, Abdelouahab A, Lafarge L, Feillel V, Ben Dib A, Bignon YJ. BRCA1 mutations in Algerian breast cancer patients: high frequency in young, sporadic cases. **Int J Med Sci** 2008; 5:197-202.

Unlu O, Kiyak D, Caka C, et al. Risk factors and histopathological features of breast cancer among women with different menopausal status and age at diagnosis. **J BUON** 2017; 22:184-191.

Yildirim E, Dalgiç T, Berberoğlu U. Prognostic significance of young age in breast cancer. **J Surg Oncol** 2000; 74:267-72.

Zhou L, Jiang Y, Yan T, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. **Breast Cancer Res Treat** 2010; 122:795-801.

Anexo 1 - Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 26 de setembro de 2012.

A
Dra. Maria Mitzi Brentani.

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1635/11
“Associação de marcadores de células-tronco e do seu microambiente com características clínicas, patológicas e imunoistoquímicas dos carcinomas mamários em mulheres muito jovens (</igual a 35 anos)”.

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 25/09/2012, tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

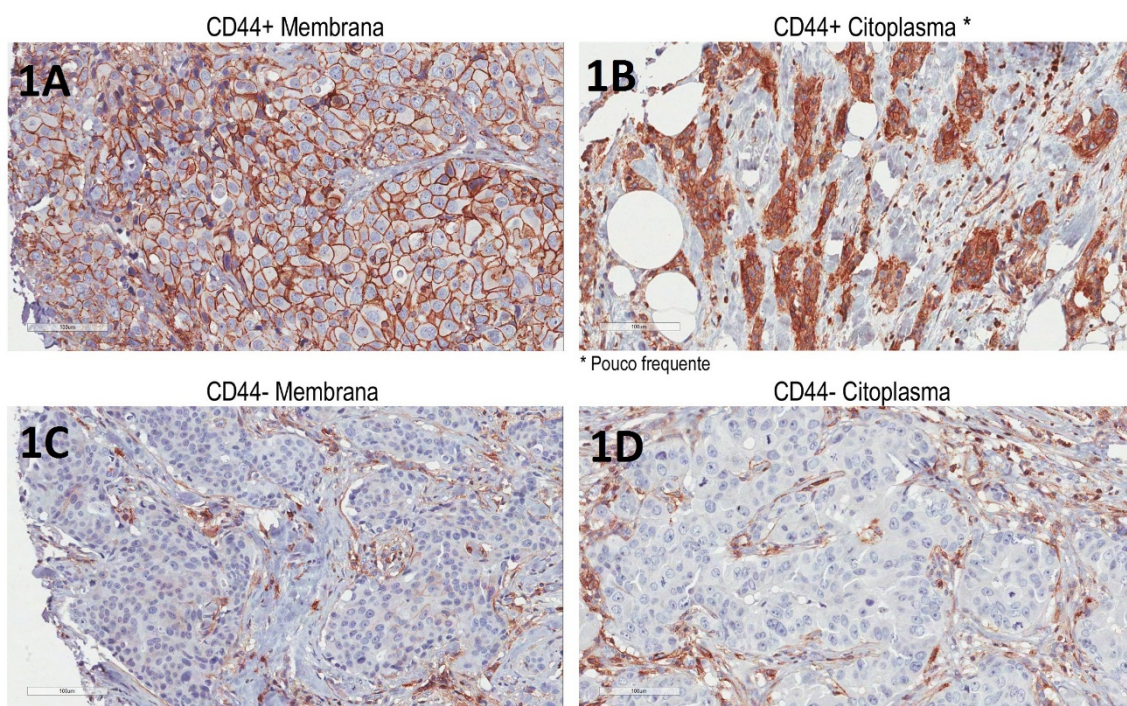
- Carta informando que o projeto em referência, inicialmente submetido com a Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo como instituição proponente agora será desenvolvido no Hospital AC Camargo, tomando esta instituição como proponente do mesmo;
- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos com as devidas alterações, constando o Hospital AC Camargo como instituição proponente.

Atenciosamente,

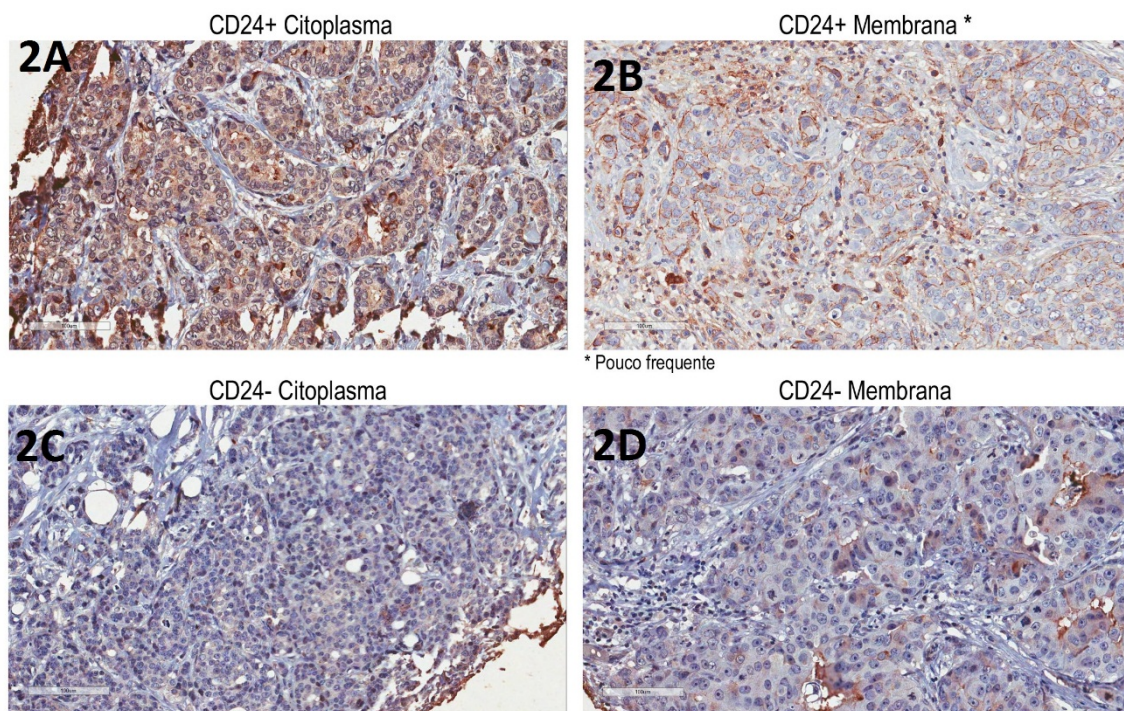

Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Anexo 2 - Figuras

Figuras 1A e 1B. Marcação imunohistoquímica do CD44 positivo respectivamente na membrana e citoplasma de carcinomas luminais. **Figuras 1C e 1D.** Marcação do CD44 classificado como negativo na membrana e citoplasma de carcinomas luminais.



Figuras 2A e 2B. Exemplos representativos de amostras de câncer de mama marcados em análise imunohistoquímica para o CD24 positivo (2a, citoplasma; 2b, membrana). **Figuras 2C e 2D.** Marcação negativa do CD24 respectivamente no citoplasma e membrana.



Figuras 3A, 3B, 3C. Exemplos representativos de espécimes de câncer de mama marcados em análise imunohistoquímica com CD90.

Figura 3A. Expressão fortemente positiva do CD90 na membrana das células estromais.

Figura 3B. Expressão negativa do CD90 na membrana das células estromais.

Figura 3C. Marcação fraca do CD90 no citoplasma das células estromais.

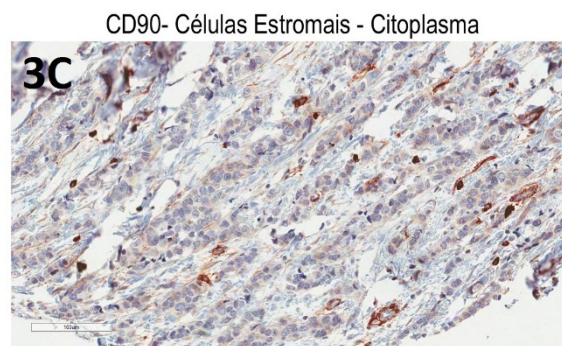
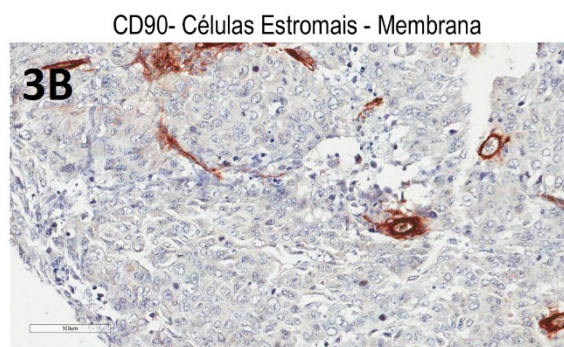
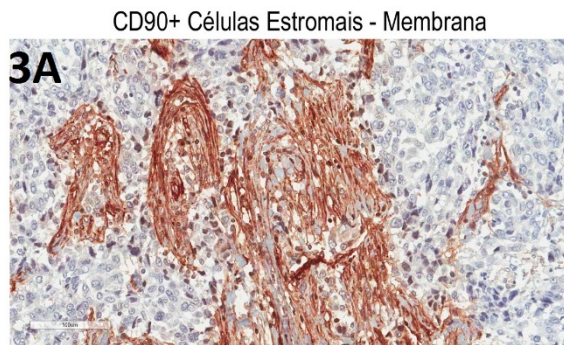


Figura 4A. Expressão do CD90 negativa nas células tumorais na membrana

Figura 4B. Expressão positiva no citoplasma.

Figura 4C. Expressão negativa no citoplasma das células tumorais.

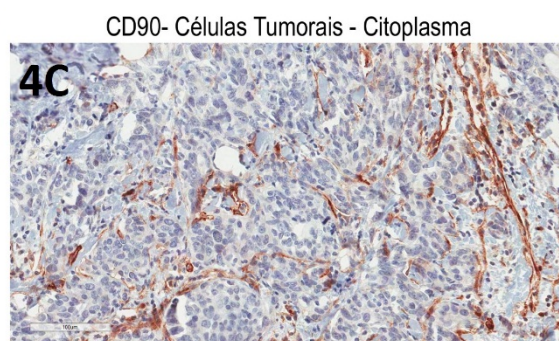
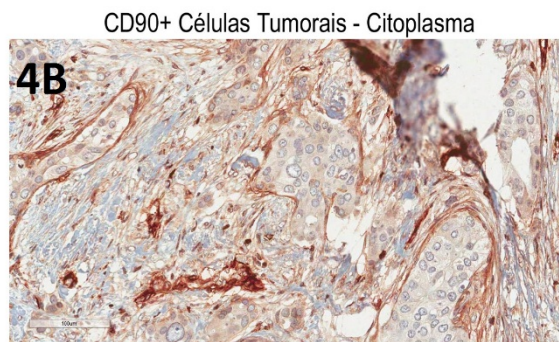
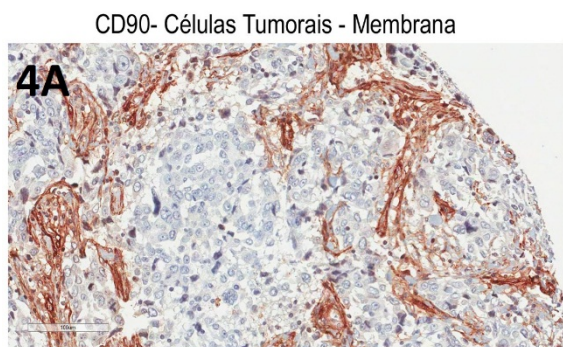


Figura 5A. Marcação imunohistoquímica citoplasmática do ALDH1 em amostra positiva de câncer de mama, marcado com coloração marrom (células estromais positivas), juntamente com a grande população de células tumorais marcadas em azul.

ALDH 1 positivo nas células neoplásicas 1000X

