

“AVALIAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO E DE FATORES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO EM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO.”

Antônio Fernando Melo Filho

Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Co-Orientador: Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Fortaleza – Ceará

2010

“AVALIAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO E DE FATORES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO EM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO.”

Antônio Fernando Melo Filho

Dissertação apresentada à Fundação Antônio Prudente como pré-requisito para obtenção do título de Mestre em Oncologia.

Orientador: Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima

Co-Orientador: Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Fortaleza – Ceará

2010

FICHA CATALOGRÁFICA**Preparada pela Biblioteca da Escola Cearense de Oncologia**

Melo Filho, Antônio Fernando.

Avaliação por imunoistoquímica da expressão de fatores de crescimento e de fatores relacionados à inflamação em câncer de mama triplo-negativo. / Antônio Fernando Melo Filho – Fortaleza, 2010.

150p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente e Escola Cearense de Oncologia – ECO. Programa de Pós - Graduação Interinstitucional (MINTER) em oncologia. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientador: Prof. Dr. Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima

Co-Orientador: Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro

Descritores: 1. MAMA/patologia. 2. NEOPLASIAS DA MAMA/genética. 3. IMUNOISTOQUIMICA/métodos. 4. TRIPLO NEGATIVO.

ANTÔNIO FERNANDO MELO FILHO

AVALIAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA DA EXPRESSÃO DE FATORES DE CRESCIMENTO E DE FATORES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO EM CÂNCER DE MAMA TRIPLO-NEGATIVO.

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado e Doutorado MINTER/DINTER da Fundação Antônio Prudente como requisito para a obtenção do título de Mestre.

Aprovada em: 25 de outubro de 2010.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. José Vassallo
Fundação Antônio Prudente - FAP

Prof. Dr. Paulo Roberto Carvalho de Almeida
Universidade Federal do Ceará - UFC

Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro
Fundação Antônio Prudente - FAP

Prof. Dr. Vladmir Cláudio Cordeiro de Lima
Fundação Antônio Prudente - FAP

Prof. Dr. Marcos Venício Alves Lima
Instituto do Câncer do Ceará - ICC

DEDICATÓRIA

A todas as mulheres vítimas desta doença tão heterogênea , o câncer de mama, a qual precisamos conhecer melhor, para melhor tratá-las, em especial às anônimas que participaram com o material de seus espécimes tumorais para este estudo.

DEDICATÓRIAS ESPECIAIS

A meu pai Fernando Melo, tão precocemente levado pelo câncer gástrico, ausente deste momento tão importante.

Ao Alexandre, irmão, que partiu levado pela violência no carnaval de 1989.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

A Deus pela existência, pela saúde, pela disposição para realizar este trabalho de pesquisa e esta dissertação.

À Família representada por minha esposa, Inês, os filhos, Fernando Neto, Iamê e Yasmin, pelo apoio e a compreensão nas horas deles tomadas para execução deste projeto.

À família no sentido mais amplo representada por minha mãe Thereza – exemplo para todos, e irmãos João Alfredo, Flávio, portadores de título de mestres, e Ticiania, portadora de título de doutora, que me estimularam a acompanhá-los nesta titulação.

À família no sentido ainda mais amplo, os sogros Luiz Aguiar e Juscileide pelo estímulo recebido.

AGRADECIMENTOS

Ao Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará, pela iniciativa de ter realizado o programa Minter/Dinter em parceria com o Hospital A. C. Camargo, em especial ao Dr. Sérgio Ferreira Juaçaba – Diretor Geral do ICC e ao Prof. Manfredo Lins – Diretor da Escola Cearense de Oncologia (ECO).

Ao Hospital A. C. Camargo, por ter visão de descentralização realizando a parceria com o Instituto do Câncer do Ceará, possibilitando esta pesquisa dentre outras.

Ao orientador, Dr. Vladimir Cláudio Cordeiro de Lima, por seu rigor científico e estímulo.

Ao Co-orientador, Prof. Dr. Ronaldo de Albuquerque Ribeiro, pelo estímulo, disponibilidade e amizade.

Ao Coordenador da Pós-Graduação do Hospital A. C. Camargo, Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, por seu estímulo e empenho pessoal na realização dos exames de imunistoquímica.

À Dra. Maria do Perpétuo Socorro Saldanha e equipe do Laboratório de Patologia Prof. Livino Pinheiro do Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará, pela colaboração na revisão e realização de exames de imunistoquímica.

Ao Prof. Dr. Marcos Venicio Alves Lima, diretor de ensino da ECO, por seu estímulo e colaboração na montagem da ficha da pesquisa.

Ao Prof. Dr. Valdeci Ferreira, cuja atuação foi fundamental na implantação do projeto Minter/Dinter.

À Wallita Linhares e Luciana Costa, secretárias da Escola Cearense de Oncologia – ECO, do Instituto do Câncer do Ceará, pela organização e disponibilidade nas atividades didáticas deste mestrado.

À Cynthia Brasil, bibliotecária do Instituto do Câncer do Ceará, por sua disponibilidade na organização das referências e confecção da ficha catalográfica, e ainda Jucileide Andrade e Aline Costa, secretária e estagiária desta biblioteca respectivamente.

À Suely Francisco, bibliotecária do Hospital A. C. Camargo, pela disponibilidade, atenção, quando solicitado de forma presencial ou à distância.

A Dr. Rafael Malagoli, Sueli Nonogaki e Carlos Ferreira Nascimento, do laboratório de patologia experimental da Fundação Antonio Prudente do Hospital A. C. Camargo, que realizaram importante papel na confecção do bloco de TMA, titulação e preparação do material para revisão e análise dos marcadores.

A Sr^a Ana Maria Kuninari coordenadora da Pós-Graduação da Fundação Antonio Prudente pela ajuda quando solicitada.

Às residentes do Serviço de Mastologia Dras. Heloisa Magalhães e Glauca Cordeiro pela colaboração em diversas fases deste estudo.

Aos acadêmicos do Programa de Educação Tutorial da Faculdade de Medicina – Universidade Federal do Ceará – PET, Danni Chagas, Everton Rodrigues e Caio Gonçalves.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Esquema do desenvolvimento da célula mamária a partir da célula tronco, sua diferenciação e os diversos perfis moleculares.....	6
Figura 2	Esquema mostrando a célula mamária com destaque para epitélio luminal, células mioepiteliais, citoqueratinas de alto e baixo peso molecular.	13
Figura 3	Esquema mostrando possível sobreposição fenotípica entre os diferentes perfis.....	17
Figura 4	Fluxograma de inclusão e exclusão dos casos de carcinoma de mama participantes do estudo	27
Figura 5	<i>Tissue microarrayer</i> apropriado (<i>Beecher Instruments Micro Array Technology, NJ, EUA</i>) – Laboratório Experimental Fundação Antonio Prudente São Paulo	29
Figura 6-a	Bloco de TMA contendo amostra utilizada do presente estudo (frente e verso).....	30
Figura 6-b	Lâmina corada por HE contendo amostras utilizadas neste estudo.....	30

LISTA DE QUADRO

Quadro 1	Relação de anticorpos utilizados, clone utilizado, titulação, fabricante e país.....	33
-----------------	--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Características clínico-demográficas e patológicas da amostra de tumores triplo-negativos.....	46
Tabela 2	Análise comparativa de diversas associações de marcadores considerados basais para definição de tumores triplo-negativos basais.....	47
Tabela 3	Características clínico-demográficas das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativo comparando os fenótipos basal e não-basal.....	48
Tabela 4	Marcadores basais nos tumores mamários triplo-negativos comparando so fenótipos baasal e não basal.....	49
Tabela 5	Marcadores relacionados à ploriferação e à inflamação nos tumores mamários triplo-negativos comparando so fenótipos baasal e não basal.....	50
Tabela 6	Características patológicas e de tratamento das pacientes de toda a amostra e seus tumores agrupadas quanto ao fenótipo basal ou não-basal.....	57
Tabela 7	Avaliação da resposta clínica ao tratamento neoadjuvante de pacientes portadores de tumores triplo-negativos de mama, comparando os perfis basal e não-basal.....	62
Tabela 8	Resposta patológica ao tratamento neoadjuvantes de pacientes portadores de tumores triplo-negativos de mama, submetidas a quimioterapia neo-adjuvante comparando os perfis basal e não-basal.....	63
Tabela 9	Análise do padrão de recidiva nos tumores mamários triplo-negativos e nos subgrupos basal e não-basal.....	64
Tabela 10	Análise multivariada da sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos – Regressão de Cox.....	83

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Sobrevida livre de doença de pacientes portadoras de tumores basais e não-basais. A sobrevida foi medida do término do tratamento inicial até o surgimento da primeira recidiva (intervalo livre de doença) e as curvas calculadas pelo método de Kaplan-Meier.....	66
Gráfico 2	Sobrevida global das pacientes portadoras de tumores de mama triplo negativo comparando os subgrupos basal e não-basal. A sobrevida medida da data do diagnóstico até a morte por qualquer causa e as curvas calculadas pelo método de Kaplan-Meier.....	67
Gráfico 3	Sobrevida global das pacientes portadoras de tumores triplo-negativos, comparando os subgrupos basal e não-basal, em paciente com idade inferior a 50 anos. A sobrevida foi medida da data do diagnóstico até a morte por qualquer causa. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank.....	68
Gráfico 4	Sobrevida das pacientes portadoras de tumores triplo-negativos com idade superior 50 anos de idade, comparando os subgrupos basal e não-basal. A sobrevida foi medida da data do diagnóstico até a morte por qualquer causa. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank.....	69
Gráfico 5	Impacto do estadiamento clínico agrupado ([EC1+EC2] x [ECIII + ECIV]), na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	70
Gráfico 6	Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função do perfil imunoistoquímico e de variáveis clínicas e patológicas.....	70
Gráfico 7	Impacto do status axilar ([N-] x [N+]), na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	71
Gráfico 8	Impacto do estadiamento patológico agrupado ([EP1+EP2] x EP3), na sobrevida global da pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	71

Gráfico 9	Impacto do tamanho tumoral patológico agrupado ([pT1 + pT2] x [pT3 + pT4]), na sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	72
Gráfico 10	Impacto da realização cirurgia na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	72
Gráfico 11	Impacto do tipo de cirurgia, (mastectomia x cirurgia conservadora), na sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	73
Gráfico12	Impacto da realização de quimioterapia neoadjuvante na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	73
Gráfico 13	Impacto da resposta clínica (presença x ausência de resposta) da QTneo em pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	74
Gráfico 14	Impacto da realização de quimioterapia adjuvante na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos.....	75
Gráfico 15	Impacto da evolução (ausência de recidiva x recidiva loco-regional x recidiva sistêmica), na sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	75
Gráfico 16	Impacto da expressão de EGF na sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	76
Gráfico 17	Impacto da expressão de PDGRA na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.....	76
Gráfico 18	Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função do perfil imunistoquímico e da variável cor.....	77
Gráfico 19	Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função da presença de metástase ao diagnóstico.....	78
Gráfico 20	Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função da imunoexpressão de PDGF.....	79
Gráfico 21	Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função da imunoexpressão de VEGFR.....	80
Gráfico 22	Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função da imunoexpressão de NOS2.....	81

- Gráfico 23** Análise multi-variada – Regressão de Coxi, sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos..... 82
- Gráfico 24** Análise multi-variada – Regressão de Coxi, sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos, controlando os perfis basal e não-basal..... 82

LISTA DE ABREVIATURAS

AA	Ácido aracdônico
AC	Esquema de quimioterapia o qual utiliza adriamicina e ciclofosfamida
ACT	Esquema de quimioterapia o qual utiliza adriamicina, ciclofosfamida e paclitaxel (taxol)
AMPK	<i>AMP activated protein kinase</i>
cDna	Ácido Desoxiribonucleico complementar, do inglês <i>complementary Deoxyribonucleic acid</i>
CK5	Citoqueratina 5
CK14	Citoqueratina 14
CK17	Citoqueratina 17
c-kit	CD117 ou receptor do SDF1 (<i>stromal derived factor 1</i>)
COX2	Ciclo-oxigenase 2
EC	Fator de Crescimento Epidérmico
EGF	Estadiamento clínico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
ERBB2	Receptor 2 da família HER (<i>human epidermal growth factor receptor</i>)
ERE	Elementos de resposta ao estrógeno
FGF2	Fator de crescimento derivado de fibroblastos
FGFR2	Receptor de fator de crescimento derivado de fibroblastos
GN	Grau nuclear
HE	Hematoxilina-Eosina
IC	Intervalo de confiança
ILD	Intervalo livre de doença
II1B	Interleucina 1 Beta
Ki-67	kiel – cidade alemã onde foi desenvolvida 67 o clone original (Proteína Nuclear relacionada a proliferação celular)
NO	Óxido Nítrico
NOS2	Óxido Nítrico Sintase 2
P63	proteína de 63KD
PARP	<i>Poly ADP-Ribosis polimerase</i>

PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas
PDGFRA	Receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas alfa
PDGFRB	Receptor de Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas beta
Qt-neo	Quimioterapia neoadjuvante
RE	Receptor de estrógeno
RT-PCR	Reação de cadeia da polimerase pós transcrição reversa, do inglês <i>Reverse transcription polymerase chain reaction</i>
SBR	Scarf Bloom Richardson
TLR9	<i>Toll-like</i> Receptor 9
TMA	Triplo-negativo
TN	<i>Tissue micro array</i>
VEGFA	Fator de Crescimento do Endotélio Vascular A
VEGFR	Receptor de Fator de Crescimento do Endotélio Vascular

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de Mama.....	1
1.2	Classificação histológica dos tumores de mama.....	2
1.3	Classificação molecular do câncer de mama.....	3
1.3.1	Perfis de expressão gênica em tumores de mama.....	3
1.4	Papel da imunistoquímica na classificação dos tumores de mama.....	7
1.5	Tumores de mama triplo-negativos.....	9
1.6	Tumores de mama basais.....	13
1.7	Fatores de crescimento, mediadores da inflamação e câncer de mama	18
2	OBJETIVOS.....	24
2.1	Objetivo Geral	24
2.2	Objetivo Específico.....	24
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	25
3.1	Casuística.....	25
3.2	Coleta de dados.....	28
3.3	Confecção de bloco para TMA (<i>Tissue Microarray</i>) e preparo das lâminas.....	28
3.4	Caracterização dos tumores triplo-negativos.....	34
3.5	Identificação de tumores triplo-negativos basais e não basais.....	36
3.6	Imunistoquímica de marcadores relacionados a fatores de crescimento e à inflamação.....	37
3.7	Imunomarcção para fatores de crescimento.....	37

3.8	Imunomarcção para fatores associados à inflamação.....	39
3.9	Coleta de Dados.....	40
3.10	Análise estatística.....	40
4	RESULTADOS.....	42
4.1	Características clínico-demográficas e patológicas.....	42
4.2	Classificação dos tumores triplo-negativos basais.....	44
4.3	Fatores relacionados à proliferação celular.....	51
4.4	Marcadores relacionados à inflamação.....	53
4.5	Análise de dados demográficos.....	55
5	DISCUSSÃO.....	84
6	CONCLUSÕES.....	113
7	PERSPECTIVAS.....	115
	REFERÊNCIAS	116

ANEXOS

Anexo I	Ficha de coleta de dados.....	142
Anexo II	Tabela <i>TMA</i>	144
Anexo III	Prancha de microfotografias	145

RESUMO

MELO FILHO, AF. **Avaliação por imunoistoquímica da expressão de fatores de crescimento e de fatores relacionados à inflamação em câncer de mama triplo-negativo.** [Dissertação de mestrado Curso de Pós-Graduação em Oncologia da Fundação Antonio Prudente (Minter/Dinter Hospital AC Camargo/Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará – ICC)]. Orientador: Dr. Vladmir Claudio Cordeiro de Lima. Co-Orientador: Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

O câncer de mama é uma doença heterogênea, sendo considerado um problema de saúde pública, ocupando o segundo lugar em incidência em todo o mundo, com um milhão de novos casos diagnosticados, levando a óbito 400.000 mulheres anualmente. Após incorporação clínica da avaliação dos receptores hormonais, bem como do estudo da amplificação do Receptor de Crescimento Epidérmico 2 - ERBB2, os tumores classificados por triplo-negativo (TN), por seu peculiar padrão de agressividade passaram a despertar maior interesse. Dentre os TN tornaram-se necessárias a definição e a diferenciação dos subtipos basal e não-basal. No presente trabalho foi realizado estudo imunoistoquímico, após confecção de *tissue microarray* (TMA) de 74 amostras de tumores TN oriundas do Instituto do Câncer do Ceará - ICC, e seguindo critérios mais aceitos pela literatura, classificados em basais e não-basais. Foram estudados e comparados os seguintes marcadores: Receptor de crescimento epidérmico (EGFR), Citoqueratina5 (CK5), Citoqueratina14 (CK14), p63, Fator de crescimento epidérmico (EGF), Fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), Receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), Receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRB), Fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF), Receptor de fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR), Fator de crescimento de fibroblastos (FGF2), Receptor de fator de crescimento de fibroblastos (FGFR2), Ciclo-oxigenase2 (COX2), Óxido nítrico sintase2 (NOS2), Interleucina 1beta (IL-1 β) e *Toll like receptor9* (TLR9). Foi encontrada significância estatística ($p < 0,05$) quando confrontados os dois subgrupos (basal x não-basal) e a imunomarcagem de PDGF e PDGFRA, os quais foram encontrados com maior frequência no subgrupo basal. Foi encontrada significância estatística ($p < 0,05$) no estudo comparativo da COX2, com maior frequência de imunomarcagem nos tumores basais. A NOS2 também apresentou significância estatística ($p < 0,05$), porém sua positividade esteve relacionada ao fenótipo não-basal. Foram avaliados também diversos variáveis como idade, raça, estadiamento clínico, estadiamento patológico, tratamento realizado (cirurgia, quimioterapia, radioterapia), e resposta clínica e patológica ao tratamento neoadjuvante, sem que se tenha encontrado diferenças estatísticas ao se comparar os dois subgrupos. Igualmente, o Intervalo livre de doença nestes subgrupos não foi estatisticamente diferente. Ao ser ajustada por idade, as pacientes até 50 anos, portadoras de tumores basais, diferente daquelas acima de 50 anos, apresentaram, na análise das curvas de Kaplan-Meier, uma pior sobrevida quando comparadas com aquelas portadoras de tumores não-basais. Ficou evidenciada a pior sobrevida das pacientes jovens portadoras de tumores basais. Foi encontrada pior sobrevida nas pacientes que apresentaram imunomarcagem positiva para p63 e VEGFR. Os dados aqui apresentados sugerem um potencial papel para PDGF e PDGFRA na caracterização dos tumores TN basais, e como potenciais alvos terapêuticos.

Descritores: Mama/patologia; Neoplasias da mama; Imunoistoquímica; Triplo negativo.

SUMMARY

FILHO, A.FM **Immunohistochemical evaluation of growth factors and inflammation-related factors in triple-negative breast cancer.** Master's thesis by, Postgraduate Course in Oncology at Fundação Antonio Prudente (Minter/Dinter Hospital AC Camargo/Hospital do Câncer, Instituto do Câncer do Ceará, ICC). Advisor: Dr. Vladmir Claudio Cordeiro de Lima. Co-advisor: Dr. Ronaldo Albuquerque Ribeiro.

Breast cancer is a heterogeneous disorder. A public health concern, it is the second most common type of cancer in the world, with a million new cases diagnosed and 400,000 deaths annually. Since the evaluation of hormonal receptors and Human epidermal factor receptor – HER2 (ERBB2) amplification became routine clinical practice, more attention has been given to the occurrence of triple-negative tumors due to their particular aggressiveness. Triple-negative tumors may be differentiated into basal and non-basal. In this study a tissue microarray of 74 samples of triple-negative tumors from the Ceará Cancer Hospital were submitted to standard immunohistochemistry for identification of the basal and non-basal subtypes. The markers Epidermal growth factor receptor (EGFR), Cytokeratin 5 (CK5), Cytokeratin (CK14), p63, Epidermal growth factor (EGF), Platelet-derived growth factor (PDGF), Platelet derived growth factor receptor alfa (PDGFRA), Platelet derived growth receptor factor beta (PDGFRB), Vascular endothelial growth factor (VEGF), Vascular endothelial growth factor receptor (VEGFR), Fibroblastic growth factor 2 (FGF2), Fibroblastic growth factor receptor 2 (FGFR2), Cyclooxygenase-2 (COX2), Nitric oxid synthase 2 (NOS2), Interleukin-1 beta (IL-1 β) and Toll like receptor 9 (TLR9) were quantified and compared. The subgroups (basal vs. non-basal) differed significantly ($p < 0.05$). The markers PDGF, PDGFRA and COX2 were significantly more frequently observed among basal tumors ($p < 0.05$), while NOS2 was significantly more common among non-basal tumors ($p < 0.05$). No statistically significant differences were observed between the subgroups with regard to the parameters of age, race, clinical stage, pathological stage, treatment received (surgery, chemo- or radiotherapy), disease-free interval and clinical or pathological response to neo-adjuvant treatment. The survival of patients under 50 years of age was shorter for basal than for non-basal tumors. Young patients with basal tumors had the shortest survival in the sample. The presence of the markers p63 and VEGFR was associated with shorter survival. Our results indicate a potential role for PDGF and PDGFRA in the identification of triple-negative tumors of the basal type and as potential therapeutic targets.

Descriptors: Breast/pathology; Breast neoplasms; Immunohistochemistry; Triple negative;

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama

O câncer de mama ocupa o segundo lugar em incidência em todo o mundo, com um milhão de casos novos diagnosticados por ano, e leva à morte 400.000 mulheres anualmente (GLUZ et al., 2009), tornando-se assim um grande problema de saúde pública. Sua incidência varia de país para país, com diferenças mais marcantes entre países desenvolvidos e em desenvolvimento. Segundo o Instituto Nacional do Câncer (NCI) dos Estados Unidos foram estimados 192.370 novos casos para o ano de 2009 e 40.170 mortes decorrentes de neoplasia de mama no mesmo período (http://www.cancer.org/downloads/STT/F861009_final%209-08-09.pdf – acesso em 04/01/10), mostrando um pequeno acréscimo no número de casos novos ao compararmos o ano de 2009 com 2008 (192.370 versus 182.460), com uma também discreta redução na mortalidade (40.170 versus 40.840). Ainda segundo Hayat e col (2004), o câncer de mama nos Estados Unidos corresponde a 18% das neoplasias malignas no sexo feminino.

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) – Ministério da Saúde, bienalmente divulga estimativas para novos casos de câncer, por localização da neoplasia, bem como por estados. Em 2009, o INCA divulgou as estimativas para o anos de 2010 para o Brasil, com a expectativa de 49.240 novos casos de câncer de mama, com uma taxa bruta de 49,27 por 100.000 mulheres, dos quais 17.540 casos nas capitais, com uma taxa bruta de 74,56/100.000 mulheres. No Ceará são esperados 1.660 novos casos, com uma taxa bruta de 37,29/100.00 mulheres, sendo 690 para a capital, com uma taxa bruta de 51,57/100.00 mulheres. Há uma heterogeneidade na distribuição dos casos de cancer de mama na nossa população, a estimativa em nosso país varia de 11,91/100.000 mulheres no Maranhão a 88,30/100.000 mulheres no estado do Rio de Janeiro, com estimativa global para o

país de 49,27/100.000 e 74,56/100.000 nas capitais brasileiras. O Ceará se encontra com uma estimativa intermediária conforme citado acima (INCA, 2010).

As taxas de mortalidade por câncer de mama estão declinando em alguns países da Europa e América do Norte, apesar do aumento em sua incidência. Em nosso país, entretanto, estas taxas continuam apresentando curva crescente (INCA, 2010).

1.2 Classificação histológica dos tumores de mama

Quase todas as neoplasias malignas da mama são adenocarcinomas, isto é, neoplasias de linhagem epitelial que reproduzem glândulas ou túbulos. São divididas inicialmente em dois grupos: *in situ*, carcinomas que em seu crescimento não ultrapassam a membrana basal; e carcinomas invasivos, que infiltram a lâmina própria até o estroma e que podem também metastatizar para linfonodos regionais ou para órgãos distantes. Os carcinomas também podem-se dividir, a grosso modo, com base em sua morfologia, em tipos ductal e lobular, embora se originem da mesma unidade terminal do lóbulo. Os carcinomas mamários mais freqüentes são os carcinomas ductais invasivos sem especificação, correspondente aproximadamente a 90% de todas as neoplasias de mama. Também são encontrados outros tipos de neoplasia de mama como: carcinoma lobular invasivo, além de variantes do carcinoma ductal como o carcinoma medular, carcinoma colóide, carcinoma tubular, carcinoma papilar invasivo, carcinoma metaplásico e ainda o carcinoma inflamatório. (ROSEN, 2009).

Por muito tempo os principais fatores prognósticos do câncer de mama foram apenas o tamanho tumoral (T) e o status axilar (N), porém hoje é inconcebível se tratar a neoplasia de mama sem o conhecimento do padrão de expressão dos receptores hormonais, ou seja receptores de estrógeno e de progesterona (RE e RP), bem como da análise da amplificação do oncogene *ERBB2* ou a imunoexpressão da proteína codificada por este oncogene, além de fatores já

incorporados à prática clínica como idade, invasão linfovascular, grau histológico e nuclear (ROSEN, 2009).

1.3 Classificação molecular do câncer de mama.

O surgimento de novas técnicas de biologia molecular tem permitido estudos mais acurados de análise da expressão gênica dos tumores de mama. Técnicas como hibridização *in situ* por fluorescência (FISH), hibridização cromogênica *in situ* (CISH), *microarray* (microarranjo de DNA) são exemplos da evolução tecnológica no campo do diagnóstico e da detecção de fatores prognósticos/preditivos. Grande avanço foi obtido com o desenvolvimento dos microarranjos de tecidos (*tissue microarray* - TMA), o qual utiliza cilindros de tecido retirados das amostras de interesse e que são introduzidos em um bloco de parafina receptor, o qual pode conter até 1.000 amostras diferentes. O TMA pode ser construído para ser utilizado em análises histológicas e imunoistoquímicas, bem como para hibridização *in situ* (FISH ou CISH). Com esta técnica pode-se avaliar um único gene ou produto gênico em um grande número de amostras tumorais, acelerando estudos que buscam associações entre variações moleculares e aspectos clínico-patológicos (CASALI et al., 2008).

1.3.1 Perfis de expressão gênica em tumores de mama

A avaliação do perfil da expressão gênica dos tumores de mama permitiu o desenvolvimento de produtos, hoje disponíveis comercialmente, para auxiliar o diagnóstico e a individualização do tratamento desta neoplasia.

Atualmente dispomos de três testes que estudam o perfil dos tumores de mama, Acreditamos que o mais divulgado destes seja o *Oncotype DX* (Genomic

Heath, Redwood City, Califórnia), desenvolvido por Paik et al. (2004), o qual analisa 21 genes através da técnica de Reação de cadeia da polimerase pós transcrição reversa (RT-PCR, do inglês *Reverse transcription polymerase chain reaction*), gerando um escore de 0 a 100 quanto ao risco de recidiva. Este método foi validado inicialmente para tumores nos estádios clínicos I e II, sem comprometimento linfonodal axilar e receptor de estrógeno positivo. Apresenta como grande vantagem a possibilidade de estudos retrospectivos, visto que pode ser realizado em blocos de tecidos incluídos em parafina (PAIK et al., 2004; PAIK et al., 2006).

VAN'T VEER e col. (2002) desenvolveram inicialmente na Noruega, sendo validado na Europa, o método conhecido por Mammaprint, o qual avalia a expressão de 70 genes em uma amostra de tecido fresco de tumor de mama ressecado cirurgicamente. Utilizando a técnica de microarranjo de cDNA fornece um índice de risco de recidiva à distância para cinco e dez anos. São elegíveis para uso do Mammaprint pacientes estadiadas como I ou II, com idade até 61 anos e axila negativa, podendo o status hormonal (estrógeno) ser positivo ou negativo. Mais recentemente, este teste foi validado também para tumores de pacientes que apresentam axila positiva (MARCHIONNI et al., 2008).

Outro método, conhecido por plataforma H/I, utiliza a razão entre a expressão de dois genes (*HOXB13* e *IL17BR*), avaliada por RT-PCR (*reverse transcriptase-polimerase chain reaction*) (MA et al., 2004). A expressão alta e isolada do gene *HOXB13* indica risco elevado de recorrência, enquanto a expressão elevada de *IL17BR* indica menor risco de recidiva. Podem ser avaliados por este método tumores com receptor de estrógeno positivo de pacientes com status linfonodal positivo ou negativo.

Além da heterogeneidade clínica e histopatológica, os carcinomas invasivos de mama também se apresentam de forma heterogênea quando classificados molecularmente. Atualmente são conhecidos cinco perfis genéticos para o câncer

invasivo de mama, os quais detalhamos a seguir (VAN'T VEER et al., 2002, SORLIE et al., 2003):

- Luminal A – apresenta forte expressão de receptores hormonais, de estrógeno e progesterona, e ausência de hiperexpressão de ERBB2, além de grau histológico baixo e baixa expressão de Ki67. É o subtipo de melhor prognóstico.
- Luminal B – receptores de estrógeno e progesterona positivos, porém em menor intensidade que no Luminal A e ausência da superexpressão de ERBB2. Apresentam grau histológico 2 ou 3 e Ki67 elevado, com prognóstico pior que o do luminal A. Alguns autores consideram os tumores que expressam receptores hormonais e Her2/neu como luminais B.
- HER-2 - apresentam hiperexpressão do oncogene ERBB2 associada à negatividade de receptores de estrógeno.
- Basalóide (Basal) – encontra-se classificado entre aqueles tipos como triplo-negativos, com ausência de ambos os receptores hormonais, estrógeno e progesterona, além da ausência de hiperexpressão de ERBB2. Apresenta expressão de queratinas de alto peso molecular como CK 5/6 e CK 17, bem como de vimentina. Há grande divergência na literatura quanto aos marcadores imunoistoquímicos necessários para que seja caracterizado um tumor no perfil basalóide (PEROU et al., 2000; VAN DE RIJN et al., 2002; VAN'T VEER et al., 2002; SØRLIE et al., 2003; NIELSEN et al., 2004; FULFORD et al., 2006; CASSALI et al., 2008; CHEANG et al., 2008;; OLIVEIRA e BERTOZZI, 2008; REIS-FILHO e TUTT, 2008). Encontram-se neste grupo a maioria das neoplasias com mutação do BRCA1 e os carcinomas metaplásicos. O carcinoma medular é o tipo, dentre estes, mais enigmático, cerca de 95% destes apresenta o perfil basalóide, uma morfologia agressiva, porém possuem prognóstico favorável (CARVALHO, 2007).
- *Normal-like* – não expressam receptores hormonais nem ERBB2 e não apresentam marcadores basais como citoqueratina de alto peso molecular.

Mais recentemente, Herschlowitz e col. (2007) e Prat e Perou (2009) descreveram um novo subtipo classificado como *claudin low*, que apresenta baixa expressão de genes envolvidos na junção e adesão celular como claudina 3, 4 e 7, ocludina e E-caderina. Estes tumores apresentam uma variável expressão de genes relacionados a marcadores basais. Os mesmos apresentam uma alta expressão de marcadores para linfócitos e células endoteliais, e ainda marcadores da transição epitélio-mesênquima, como *HRAS* e *TWIST1*, bem como para o tecido mesenquimal, como a vimentina.

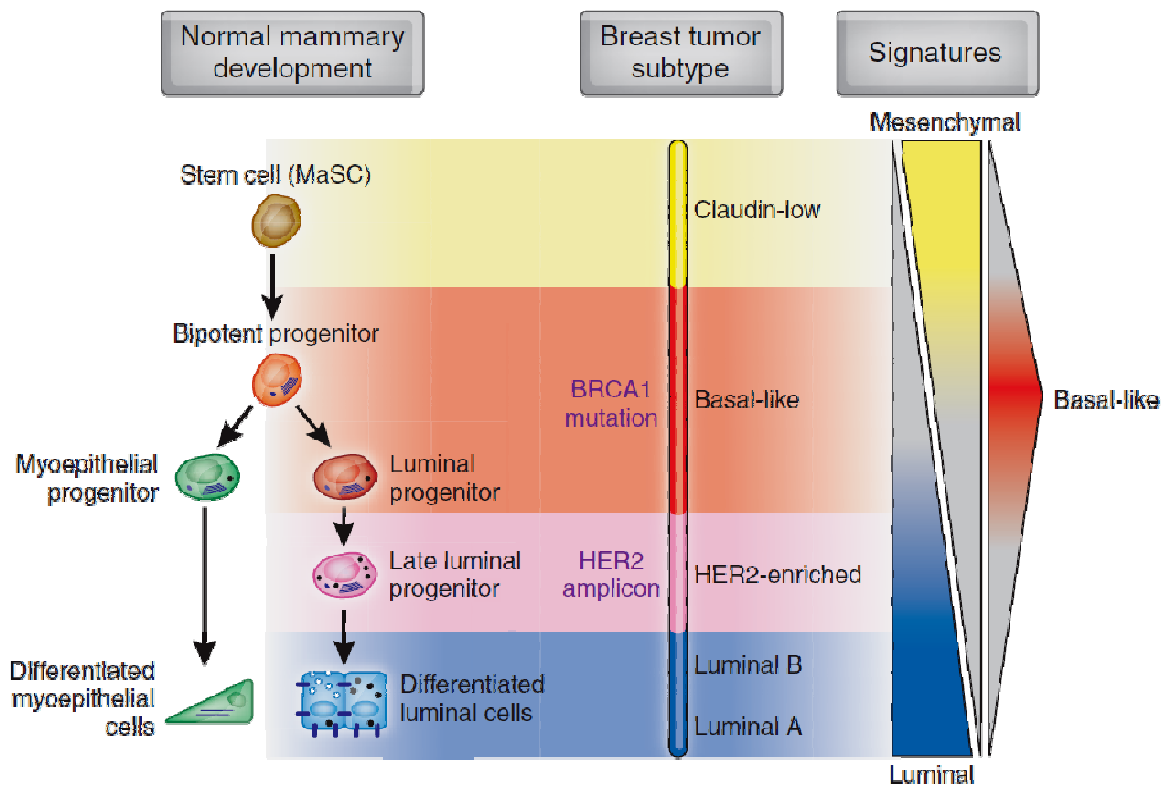


Figura 1: Esquema do desenvolvimento da célula mamária a partir da célula tronco, sua diferenciação e os diversos perfis moleculares.

Fonte: Prat e Perou, Nat Med 2009;842-4

A realização de testes, como *cDNA microarray* e *TMA*, ainda se encontra distante de nossa realidade, mesmo em centros de pesquisa, e principalmente na prática clínica. A realização de exames como *Oncotype DX* apresenta um alto custo financeiro, já o *Mammprint*, além do custo financeiro, apresenta a necessidade da sua realização em material fresco. Apesar de ser um campo envolvente e

estimulante, comprometendo grandes investimentos no desenvolvimento de plataformas e bibliotecas de genes, os estudos publicados carecem de reprodutibilidade e de controles de qualidade (REIS-FILHO e TUTT, 2008). É possível adaptarmos a taxonomia do câncer de mama e utilizar os termos da biologia molecular para classificar os tumores de mama em quatro ou cinco grupos conforme análise de imunohistoquímica, o que é acessível em nosso meio.

1.4 Papel da imunohistoquímica na classificação dos tumores de mama

É inegável o valor da avaliação do perfil da expressão gênica do câncer invasivo de mama, porém é necessário que se tenha conhecimento de suas limitações e da realidade brasileira, e não negar a importância da histopatologia convencional, bem como da imunohistoquímica. A assinatura gênica é um método que vem para somar, e não para substituir aqueles já incorporados à prática clínica. Raica e col. (2009), no título de seu artigo publicado recentemente, apresentam a seguinte interrogação: “Do diagnóstico patológico convencional à classificação molecular do carcinoma mamário: estamos preparados para a mudança?”. Para estes autores a definitiva incorporação da avaliação do perfil da expressão gênica à prática clínica far-se-á quando este método vier responder pelo menos três grandes questões: 1) a biologia de cada tipo de tumor difere entre si e da biologia do tecido normal?; 2) o perfil de expressão gênica pode com acurácia prever o resultado clínico para tumores morfológicamente semelhantes?; e 3) é possível prever a resposta a uma terapia específica em casos individuais?”

A expressão de receptores específicos para os hormônios sexuais esteróides (estrógeno e progesterona) pelas células tumorais dos carcinomas mamários representa um importante fator prognóstico e preditivo no câncer de mama (ORVIETTO e VIALE, 2002). O receptor de estrógeno (RE) é uma proteína de 66KD, ligante-dependente, em cuja seqüência são reconhecidos domínios separados com funções específicas, como domínio de ligação ao DNA, domínio de

transativação, domínio de dimerização e região de ligação ao hormônio. O estrógeno é um esteróide lipossolúvel capaz de atravessar as membranas celulares e atingir o núcleo onde irá ligar-se a um domínio específico de seu receptor. Após a sua ligação, ativam-se a transcrição de vários outros genes que contenham elementos de resposta ao estrógeno (ERE), que, por sua vez exercem a função de regulação e de diferenciação celular (ORVIETTO e VIALE, 2002). O RE é detectado em cerca de 60 a 80% das amostras de câncer de mama.

O receptor de progesterona (RP) é uma das moléculas cujo gene é transativado pelos receptores de estrógeno. A determinação dos receptores de progesterona foi incorporada à prática clínica porque sua expressão testemunha a funcionalidade do receptor de estrógeno. Quando ambos os receptores são analisados em conjunto, aumenta-se o poder preditivo sobre uma possível resposta à terapia endócrina. É sabido que as neoplasias de mama que expressam ambos os receptores (60% dos casos) apresentam taxa de resposta ao tratamento de cerca de 75%, ao passo que nas neoplasias negativas para ambos os receptores (cerca de 15%), a taxa de resposta é de aproximadamente 15%. É interessante observar que tumores que expressam apenas o receptor de progesterona apresentam melhor resposta quando comparado àqueles que expressam apenas o receptor de estrógeno (ALRED et al., 1998).

Ambos, RE e RP, são proteínas nucleares que podem ser medidas nas células intactas ou em extratos de tumores por muitas técnicas, sendo a imunohistoquímica (IHQ) a mais usada, por sua simplicidade e reprodutibilidade. Além disso, o método oferece a vantagem de não necessitar de amostras frescas, podendo ser realizada em material de arquivo emblocado em parafina. A IHQ pode ser empregada para reconhecer os RE e RP humanos e pode ser realizada em amostras pequenas, não sendo afetada por níveis de hormônios endógenos. Os dois parâmetros utilizados de marcação na imunohistoquímica são o número de células coradas (marcação nuclear), expresso em porcentagem, e a intensidade da reação, avaliada como negativa, fraca, moderada e forte. A sua expressão se correlaciona

diretamente com diferenciação, ploidia e índices proliferativos baixos e inversamente com a expressão de receptores de fatores de crescimento como o ERBB2 e EGFR (ORVIETTO e VIALE, 2002).

A utilização da pesquisa de receptores em neoplasias mamárias possui uma importante aplicação prática que é selecionar pacientes que terão maior benefício com a terapia endócrina, mas ainda é desconhecido por que cerca de 40 a 50% desses pacientes falham em obter uma resposta terapêutica adequada. A marcação quantitativa e a determinação simultânea de RP aumentam a capacidade preditiva. Tumores com alta expressão de RE ou positivos para RE e RP têm maior probabilidade de resposta terapêutica. (ELSTON e ELLIS, 1991; BATTIFORA et al., 1993).

O ERBB2, codificado pelo gene *HER2/neu*, é uma molécula presente na membrana celular que pertence à família dos receptores do fator de crescimento epidérmico. Encontra-se superexpresso em 15 a 30% dos cânceres de mama recém-diagnosticados, estando associado com um comportamento mais agressivo. Várias potenciais aplicações clínicas têm sido propostas para a avaliação da expressão de ERBB2, incluindo determinação de prognóstico em pacientes não tratadas, predição de benefícios com a terapia anti-HER2, em particular trastuzumabe e lapatinibe, predição de resistência a terapias endócrinas ou predição de resistência relativa a certos esquemas de quimioterapia, como CMF (ciclofosfamida, metotrexato e fluorouracil), e ainda predição de resposta a antraciclinas e paclitaxel (HARRIS et al., 2007).

1.5 Tumores de mama triplo-negativos

Existia certa confusão na literatura na definição de tumores triplo-negativos e tumores basalóides. REIS-FILHO e TUTT em artigo de revisão publicado em 2008

apresentam o seguinte questionamento: “*Triple-negative and basal-like breast cancer: synonyms?*”, mostrando a importância de se distinguir as duas entidades, com fins de diagnóstico, terapêutica, bem como para avaliação de resultados de estudos científicos. Outros autores (FERNANDES et al., 2009) passaram a expor em seus artigos a importância de não mais se confundir as duas entidades acima citadas.

Parece haver uma heterogeneidade na apresentação de dados referentes à frequência de tumores triplo-negativos, REIS-FILHO (2009) relatam que a incidência de tumores triplo-negativos varia de 10 a 17%, já SILVA et al., (2008) referem que a incidência de tumores basais varia de 2 a 18%.

Em estudo apresentado no *Saint Gallen 11th International Conference*, pesquisadores da Espanha (SANZ et al., 2009) encontraram, em um estudo com 345 pacientes portadoras de câncer de mama, 22 tumores classificados como triplo-negativo (6.4%). Já em Israel a frequência foi de 104 tumores triplo-negativos dentre 1.073 casos de tumor de mama (SHKLAR et al., 2009). Na Coreia do Sul, HUR et al. (2009), ao estudarem 1.325 tumores invasivos de mama, encontraram 213 tumores triplo-negativos (16,1%). RAICA et al. (2009) relatam, em experiência romena, uma frequência de 8 a 20% de carcinomas basalóides dentre os casos de câncer de mama, sendo mais frequente na mulheres pré-menopausadas. Em estudo tailandês LIN e colaboradores (2009) apresentam a frequência de 167 tumores triplo-negativos dentre 1.048 tumores de mama estudados no período de janeiro de 2002 a dezembro de 2006, correspondendo a 15,9%.

SASA e colaboradores (2007) relatam que a incidência de tumores basalóides dentre os triplo-negativos é de aproximadamente 50-60%. KURODA e colaboradores (2009) relatam que a maioria dos tumores triplo-negativos são basalóides, porém alguns destes não apresentam o perfil basal ao utilizar citoqueratinas 5, 14 e 17 e p63 para definir o perfil basal.

Diversos autores, ou mesmo quase a unanimidade dos autores, relatam que este perfil tumoral encontra-se mais frequentemente em pacientes jovens (REIS-FILHO et al., 2006; ANDERS e CAREY, 2008; CHEANG et al., 2008; KOBAYASHI, 2008; MILLIKAN et al, 2008; STEAD et al, 2009).,

Também de forma quase unânime é relatada a maior frequência de tumores triplo-negativos em mulheres de raça negra. STEAD e colaboradores (2009) relatam que independente da faixa etária da paciente, mulheres de raça negra apresentam três vezes mais tumores triplo-negativos que mulheres de outra etnia. Diversos outros autores relatam a maior incidência deste subtipo em mulheres com ascendência africana (REIS-FILHO et al., 2006; ANDERS e CAREY, 2008; KOBAYASHI, 2008; HUO et al., 2009).

Estudos clínicos têm mostrado um pior prognóstico para os tumores triplo-negativos e HER2 positivos (VAN DE RIJN et al., 2002; SØRLIE et al., 2003; ROUZIER et al., 2005; HICKS et al, 2006; OLIVEIRA e BERTOZZI, 2008; REIS-FILHO e TUTT, 2008; ROSEN, 2009).

Rakha e col. (2008) também relatam que os tumores basalóides apresentam uma maior frequência dos chamados tumores de intervalo, aqueles cujos diagnósticos acontecem nos intervalos entre a realização de mamografias anuais atribuindo esse achado à sua maior atividade proliferativa.

Os tumores triplo-negativos, conforme diversos autores (CHEANG et al, 2008; KOBAYASHI et al., 2008; NAM et al., 2008; RHEE et al., 2008; SASA et al., 2007), apresentam um elevado grau nuclear, bem como um elevado grau histológico de Scarff, Bloom e Richardson (SBR).

É sábio, também que os tumores triplo-negativos apresentam uma maior agressividade, um maior potencial metastático, um pior prognóstico, o que consequentemente leva a menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global (ANDERS & CAREY, 2008; CHEANG et al., 2008; LIN et al., 2009; CHEANG et al., 2008; RAKHA et al., 2008; RAKHA et al., 2009).

Os tumores classificados como triplo-negativos apresentam, em geral, um padrão de metastatização de preferência hematogênica, em especial para o sistema nervoso central (LIN et al, 2008), com uma menor frequência de disseminação linfática. Em estudo Japonês publicado por SASA e colaboradores (2007) é apresentada uma maior frequência de disseminação à distância em pacientes portadores de fenótipo basal. Estes autores analisaram 513 casos de câncer de mama em período de dois anos, destes 66 apresentavam axila positiva, nos quais ocorreram 13 casos de recidiva a distância, sendo 11, de um total 40 pacientes, com fenótipo basal, correspondendo a 27,5%, e apenas duas recidivas a distância em pacientes com fenótipo não-basal de um grupo de 26 pacientes com axila positiva e fenótipo não-basal, correspondendo a 7,7%. Freedman e colaboradores (2009), mostram que a recidiva locoregional na cirurgia conservadora para câncer de mama não apresenta maior incidência em pacientes portadoras de tumores triplo-negativos quando comparada a pacientes submetidas à cirurgia conservadora e portadoras de tumores não triplo-negativos.

Segundo NAM e colaboradores (2008), a frequência de metástases cerebrais é maior em portadores de tumores triplo-negativos. Este estudo coreano englobava 126 casos de metástases cerebrais, sendo 47 em pacientes portadores de tumores triplo-negativo, 37 em pacientes com perfil HER2+/RE negativo, 23 pacientes classificadas no perfil luminal A e 19 no luminal B.

1.6 Tumores de mama basais

Os tumores basalóides apresentam um padrão que se assemelha ao das células epiteliais basais da glândula mamária normal (MATOS et al., 2005; OLIVEIRA e BERTOZZI, 2008; ; REIS-FILHO & TUTT, 2008; RHEE et al., 2008), expressando os genes presentes nestas células (REIS-FILHO et al., 2006). Há diversas definições na literatura quanto às imunomarcações necessárias para se caracterizar um tumor com perfil basalóide (CASSALI et al., 2008; NIELSEN et al., 2004; OLIVEIRA & BERTOZZI, 2008; PEROU et al., 2000; Sørli et al., 2003; REIS-FILHO et al., 2006; VAN DE RIJN et al., 2002; VAN'T VEER et al., 2002). Do ponto de vista de expressão gênica os tumores basais expressam níveis mais elevados de citoqueratinas de alto peso molecular (CK5, CK6, CK14 e CK17), além de calponina, p63 ou P-caderina (PEROU et al., 2000).

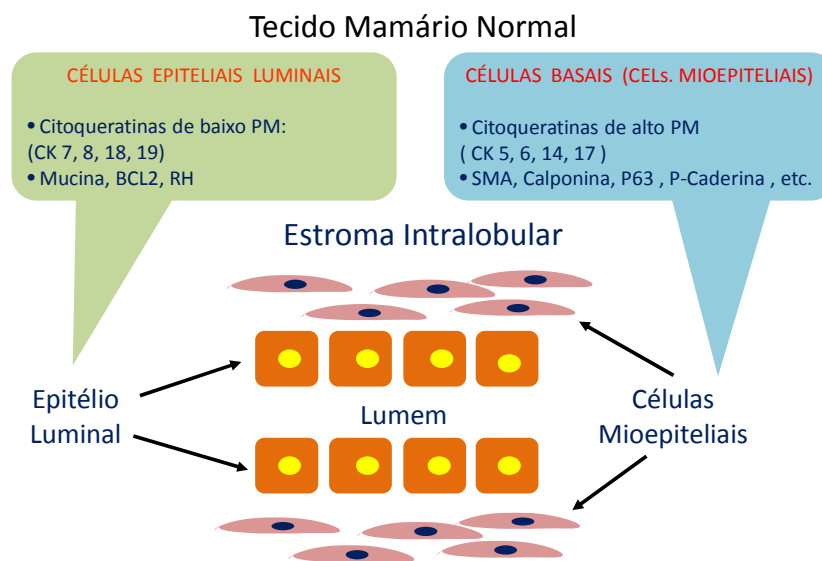


Figura 2: Esquema da glândula mamária com destaque para epitélio luminal, células mioepiteliais, citoqueratinas de alto e baixo peso molecular. Modificado de: Perou C, Nature 460; 747-752,2000 e J Mammary Gland Biol Neoplasia;1998: 3; 23-35.

É de grande importância o estudo multistitucional publicado por NIELSEN e colaboradores (2004), ao utilizarem a biblioteca gênica do estudo inicial de PEROU (2000), testaram por imunossitoquímica os seguintes marcadores basais: *ckit*, CK5/6 e EGFR. Estes autores encontraram positividade de apenas 28,5% para *ckit*, já para

CK5/6 e EGFR isoladamente foi de 61,9% para cada um dos marcadores. Quando avaliada a positividade para um destes dois marcadores foi encontrada sensibilidade de 76% e especificidade de 100% para a definição de tumor basalóide, utilizando com critério a positividade de CK5/6 e/ou EGFR.

Van de Rijn e col. (2002) publicaram um artigo em que correlacionam as citoqueratinas de alto peso molecular (CK5 e CK17) com um pior prognóstico, porém a CK17 mostrou-se difícil de avaliar por IHQ. Hicks e col. (2006), ao estudarem CK5/6, relacionaram a imunoeexpressão desta citoqueratina ao desenvolvimento de metástases cerebrais, portanto com um pior prognóstico.

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1) faz parte da família dos receptores HER, composta por mais três receptores (HER2, HER3 e HER4). O EGFR encontra-se imunoeexpresso em mais de 60% dos tumores basalóides (REIS-FILHO et al., 2008). Alguns autores (DOGU et al., 2009; NIELSEN et al., 2004) consideram a expressão do EGFR como um dos pré-requisitos na identificação dos tumores basalóides, ao contrário de outros pesquisadores que não a consideram essencial, embora reconheçam que a expressão deste marcador está tão largamente presente nos cânceres de mama basalóides, que combinado com outros marcadores reforça este perfil (PEROU et al., 2000; VAN DE RIJN et al., 2002; NIELSEN et al., 2004; HICKS et al., 2006; REIS-FILHO et al., 2006). Para Nielsen e col. (2004), portanto, a associação da expressão de EGFR com tumores basalóides poderia definir uma subpopulação que viria a ser beneficiada com o tratamento isolado com inibidores deste receptor, quer anticorpos (cetuximabe e panitumumabe), ou inibidores de sua tirosina-quinase (erlotinibe ou gefitinibe), ou ainda tratamentos combinando estes inibidores e quimioterapia padrão, expectativa esta que não chegou a ser confirmada, pois estudos recentes mostraram baixa atividade antitumoral por parte de erlotinibe e gefitinibe (DICKLER et al., 2008, 2009; MAYER et al., 2009).

Soares et al (2000), ao analisarem 86 amostras de carcinomas invasivos da mama, quanto à imunomarcção para TGF alfa e seu receptor EGFR encontraram positividade para EGFR em 34,2% dos tumores e em 46,1% dos casos, o mesmo era positivo nas células endoteliais próximas ao tumor. TGF alfa foi positivo em 72,1% dos casos, tanto nas células epiteliais, como nas células estromais adjacentes. A presença de EGFR nas células endoteliais se correlacionou com idade mais baixa das pacientes, bem como se observou uma associação do EGFR em células endoteliais e angiogênese nos tumores com tamanho inferior a 2,0 cm. Contrariamente, a expressão de TGF alfa nos tumores maiores não foi associada com a angiogênese. Para os autores, os resultados sugerem que EGFR nas células endoteliais pode ter um papel nos estágios da angiogênese do câncer de mama.

São diversos os marcadores das células basais como as citoqueratina 5, 6, 14, a vimentina, p63, P-caderina, como são muitas as publicações com diferentes critérios e combinações de marcadores para definir o perfil basal (NIELSEN et al., 2004; MATOS et al , 2005; MATKOVIC et al, 2008; NALWOGA et al., 2008; e SASA et al., 2007).

Ressaltamos a importância da publicação e aceitação na literatura, do critério apresentado por NIELSEN e colaboradores (2004), os quais consideram a positividade por imunomarcção de CK5/6 e/ou EGFR para definição de tumor de mama triplo-negativo basal. Estes autores utilizaram 21 amostras da biblioteca gênica do estudo inicial de PEROU e colaboradores (2000), e testaram a imunomarcção de CK5/6, EGFR e *ckit*. Referidos autores compararam os resultados encontrados no estudo genético com aqueles encontrados por imunistoquímica, em relação ao *ckit* foi encontrada concordância de apenas 26,5%, já o CK5/6 e o EGFR isoladamente apresentaram positividade em 61,9%, quando analisada a imunomarcção para um dos dois marcadores foi encontrada positividade de 90%, devido a este alto índice de concordância e sua grande aceitação na literatura, o critério de Nielsen (2004) foi escolhido para a definição de tumor triplo-negativo neste estudo ora apresentado.

A associação entre tumores com fenótipo basal e a mutação de *BRCA1* é relatada em diversas publicações. Lakhani e colaboradores em estudo publicado em 2005, analisaram marcadores para fenótipo basal CK14, CK5/6, CK17, EGFR e osteonectina, e evidenciaram uma maior frequência nas pacientes com câncer de mama triplo-negativo e portadoras de mutação do gene *BRCA1* do que naquelas pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo controle (não portadoras de mutação genética neste gene). Já ao avaliar a relação de marcadores basais e mutação do gene *BRCA2*, esta não foi significativa. Kobayashi (2008) também apresenta uma associação dos tumores basalóides com a presença de mutação do *BRCA1*, este autor relata a baixa incidência de mutação de *BRCA1* na população japonesa, porém é forte a associação do perfil basal com a mutação do *BRCA1*, bem como um pior prognóstico. O mesmo ainda apresenta a necessidade de maiores estudos no que se refere à metilação do gene *BRCA1*.

FERNANDES *et al*, (2009) em artigo de revisão citam que um estudo (SΦRLIE *et al* 2003) mostra forte correlação, ao analisar microarranjo de amostras tumorais de 18 pacientes com mutação de *BRCA1*, que 100% delas apresentaram expressão gênica basal. Os autores concluem ser impossível definir como causa ou consequência a sobreposição existente entre os grupos, demonstrada na figura 3.

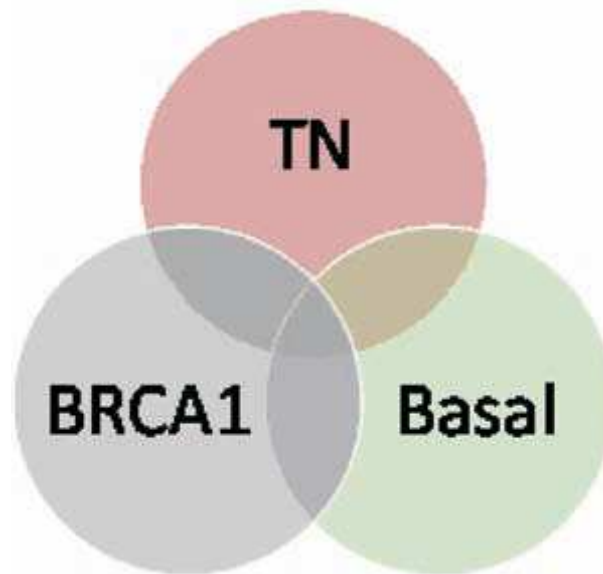


Figura 3 – Possível sobreposição entre os diferentes perfis. Fonte: Fernandes GS, Calabrisch A, Katz A. Câncer de mama triplo-negativo; aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos. Rev. Bras. Mastol. 2009;19:76-82.

Há escassez de dados na literatura nacional acerca da incidência de tumores basalóides ou mesmo triplo-negativos em nossa população, bem como de sua correlação com características demográficas. Foi descrita uma incidência de 19,1% de tumores triplo-negativos em nosso país, conforme o projeto Amazonas apresentado durante a Terceira Conferência Brasileira de Câncer de Mama – Enfoque em San Antonio 2008, realizada em São Paulo, em abril de 2009, promovido pelo Grupo Brasileiro de Estudos em Câncer de Mama (GBECAM). De Brot e colaboradores, em recente artigo publicado em 2009, descrevem 140 casos de tumores triplo-negativos oriundos da Universidade Federal de Minas Gerais e do Hospital A.C. Camargo, dos quais 75% são basais, apresentando maior agressividade e potencial de metástase sistêmica, especialmente para pulmões, cérebro e ossos. Ainda recentemente foi anunciado início de estudo pela Universidade Federal da Bahia, o qual se dispõe a estudar a frequência da doença na raça negra, levando em consideração a grande miscigenação da população baiana (NASCIMENTO, 2010). É necessária a realização de estudo, provavelmente multicêntrico, a fim de que se conheça a realidade do câncer de mama do ponto de vista molecular em nosso país, considerando as diferentes miscigenações, devido às diversas formas de colonização conforme as regiões.

1.7 Fatores de crescimento, mediadores da inflamação e câncer de mama

Vários fatores de crescimento solúveis e seus receptores participam da regulação e controle de mecanismos importantes na carcinogênese como proliferação celular apoptose, angiogênese, invasão, adesão celular, migração e resposta imune.

Nos últimos anos, muita atenção tem sido dedicada aos fatores pró-angiogênicos e seus receptores no contexto da estimulação e manutenção do crescimento tumoral. Neste cenário a família de fatores de crescimento do endotélio vascular (VEGFA, VEGFB, VEGFC e VEGFD) e seus receptores (VEFR1, VEGFR2 e VEGFR3) têm merecido destaque em pesquisas, bem como no desenvolvimento de terapias-alvo para diversos tumores malignos, incluindo o carcinoma invasivo de mama.

Está bem demonstrada, em estudo de fase III, a melhora na sobrevida geral dos pacientes portadores de câncer de cólon e de pulmão de células não-pequenas submetidos a esquemas quimioterápicos associados ao anticorpo anti-VEGFA (bevacizumabe). (HURWITZ et al, 2004; SANDLER et al, 2006). Adicionalmente, tem-se observado aumento significativo da resposta objetiva quando o bevacizumabe é adicionado à quimioterapia com paclitaxel (MILLER et al., 2007) ou capecitabina (MILLER et al., 2005) em pacientes portadoras de câncer de mama metastático.

Outros dois fatores pró-angiogênicos envolvidos no crescimento tumoral são o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e o fator de crescimento do fibroblasto (FGF2). Da mesma forma seus receptores (PDGFRA e FGFR2) têm sido pesquisados como potenciais alvos terapêuticos, inclusive para o câncer de mama (LINDERHOLM et al., 2003 e CARVALHO et al., 2005).

As cicloxigenases (COX) são enzimas presentes no citoplasma dos mais diversos tipos celulares, estando ligadas ao retículo endoplasmático. São responsáveis pela síntese de prostaglandinas (PG), a partir do ácido araquidônico (AA), molécula derivada de fosfolípidios da membrana celular por ação de fosfolipases (RANG et al., 2001). A COX age sobre o AA produzindo inicialmente PGG₂, por ação de uma peróxido-sintetase e em seguida converte esta em PGH₂ por ação de uma peroxidase. Da PGH₂ surgem derivados específicos (PGI₂, TXA₂, PGD₂, PGE₂ e PGF₂- α), a partir de enzimas específicas, em células específicas (KATZUNG, 1998). Existem duas formas bem caracterizadas de COX: a COX1 e a COX2. Recentemente foi descrito um terceiro tipo de COX, a COX3, sendo a mesma uma variante da COX1 (CHANDRASEKHARAN et al., 2002). A COX1 representa a forma constitutiva, participando da manutenção do estado fisiológico celular, produzindo baixos níveis de prostaglandinas. A COX2 é a forma induzida, liberada por células inflamatórias em resposta a estímulos inflamatórios como fatores de crescimento e citocinas, sobretudo o fator de crescimento fibroblástico básico (FGF ou FGF2) e o fator de necrose tumoral alfa (TNFA) (RANG et al., 2001). Além de seu papel no processo inflamatório, nos últimos anos a COX2 tem chamado a atenção como importante fator carcinogênico. O gene para COX2 é hoje uma promissora fonte de estudos na elucidação de mecanismos envolvidos na biologia do câncer. Ao promover a síntese de PG, sobretudo PGE₂, a COX2 estimula os seguintes efeitos carcinogênicos: proliferação celular; invasividade, angiogênese e inibição da apoptose.

Na mama, em um modelo de carcinogênese, foi encontrado efeito mutagênico de radicais livres de nitrogênio e oxigênio induzidos por COX2 (HARRIS et al., 1999). A PGE₂ tem efeito mitogênico em células epiteliais mamárias normais (ROSE et al., 1994). A PGE₂ parece responsável também, no modelo citado, por um efeito parácrino ao agir sobre o tecido adiposo adjacente ao epitélio ductal mamário e induzir a expressão da aromatase, enzima responsável pela síntese de estrógeno, importante agente de promoção tumoral na mama (SHOU et al., 1996). A perda ou alteração na expressão de proteínas de adesão intercelular como as cateninas (ZHOU et al., 2002) ou a preservação ou aumento da adesão célula-matriz mediada pelas integrinas são aspectos fundamentais no processo de infiltração e

metastatização de células neoplásicas. Estudos sobre uma possível associação entre a expressão de COX2 e proteínas envolvidas com a adesão intercelular existem, mas são raros e incipientes (TSUJII et al. 1997; JIANG et al., 2001).

A angiogênese é um importante mecanismo no crescimento e infiltração local de tumores, além de favorecer a formação de metástases. A produção de fatores angiogênicos a partir de COX2 tem sido descrita em diversos tipos de neoplasias (TSUJII et al., 1998). COX2, através da PGE2, favorece a produção de fatores de crescimento como FGF2 e fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA), secretados pelas células tumorais (CHENG et al., 1998). O FGF2 leva à proliferação de tecido conjuntivo e vasos (FRIESEL e MACIAG, 1995). O VEGFA age sobre células endoteliais, estimulando sua proliferação e a formação de novos vasos. Além do VEGFA, outros fatores angiogênicos têm sido relatados em associação com alta expressão de COX2, como o fator de permeabilidade vascular (VPF) (BROWN et al., 1997) e o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF) (HARRIS et al. 1999). Em modelos animais, utilizando córneas, drogas antiinflamatórias não-esteroidais (DAINES), de conhecido efeito inibitório sobre COX2, inibem a angiogênese induzida por fatores de crescimento (DANIEL et al., 1999), achados que favorecem a importante ação angiogênica da enzima.

A inibição da apoptose pela COX2, via PGs, que ocorre em muitas lesões malignas e pré-malignas, favorece o crescimento neoplásico, ao permitir que células mutantes sobrevivam e assim se reproduzam mais (MASFERRER et al., 2000).

Estudos revelaram que COX2 ao promover catabolismo do ácido araquidônico, diminui o efeito pró-apoptótico deste (WU et al., 2001) Além disso, COX2 e PG induzem o gene *bcl-2* (CHEN et al., 2005).

No câncer de mama a expressão de COX2 e PG está aumentada, parecendo ocorrer tanto ação mutagênica quanto mitogênica (LIU e ROSE, 1996). Em modelo proposto de carcinogênese, foi encontrado efeito mutagênico a partir de radicais livres de nitrogênio e oxigênio, induzidos por COX2, e ação mitogênica, pela estimulação estrogênica associada (HARRIS et al., 1999). Estudos pré-clínicos em ratas mostraram reduções moderadas a acentuadas de tumores induzidos nestas após o uso de DAINES (HARRIS et al., 2000).

O óxido nítrico (NO) é um radical diatômico que exerce uma variedade grande de funções regulatórias *in vivo*. Esta molécula sinalizadora participa de numerosos processos fisiológicos e fisiopatológicos como vasodilatador, neurotransmissor, imunomodulador e molécula efetora-antimicrobiana (GELLER et al., 1998). O NO é sintetizado a partir do aminoácido L-arginina pelas NO-sintases, constitutivas, endotelial (NOS3) e neuronal (NOS1), e induzida (NOS2) (MONCADA et al., 1991).

Os efeitos do NO em neoplasias podem ser tanto de promoção tumoral, como de supressão tumoral. Altas concentrações de NO podem ser citotóxicas, enquanto baixas concentrações podem mesmo proteger alguns tipos celulares de danos induzidos por estímulos químicos e radiação, e da apoptose (MONCADA et al., 1991).

Durante o início do crescimento tumoral, células *natural killer* e macrófagos matam células tumorais por um mecanismo dependente de NO. Por outro lado, o NO pode também suprimir as defesas antitumorais, promover angiogênese tumoral e aumento do fluxo sanguíneo na neovasculatura tumoral, aumentando o crescimento, invasividade e metastatização (MONCADA et al., 1991).

No câncer primário de mama, imunoreatividade para NOS2 relativamente alta tem sido observada em células estromais, parecendo haver inclusive uma correlação entre esta imunoreatividade e o grau do tumor (THONSEN et al., 1995). Em outro estudo foi observada imunexpressão de NOS2 predominantemente em células tumorais, havendo uma correlação com a presença de linfonodos axilares comprometidos (VAKKALA et al., 2000). Posteriormente, foi demonstrado que células do câncer de mama, em adição às células do estroma, expressam NOS2 e são capazes de produzir NO. Os carcinomas com células tumorais e células estromais positivas para NOS2 apresentam altos índices apoptóticos e vascularização aumentada, sugerindo que NOS2 contribui para promoção de apoptose e angiogênese no câncer de mama (VAKKALA et al., 2000). Associação entre maior número de células NOS2 positivas e doença metastática também foi observada, tendo sido atribuída ao estímulo da angiogênese, resultando numa maior densidade de vasos e, conseqüentemente, uma maior probabilidade de invasão de células tumorais (VAKKALA et al., 2000).

A família *Toll like receptor* (TLR) é formada por proteínas ligadas à imunidade inata e à TLR9, podendo ser encontrada em tumores de próstata e pulmão, além do carcinoma de mama, através de IHQ (JUKKOLA-VUORINEN et al., 2009). Jukkola-Vuorinen e colaboradores, em artigo recente (2009), relatam uma freqüência de expressão deste marcador em aproximadamente 98% em neoplasias mamárias, quando apenas cinco dentre 141 espécimes estudadas foram negativas. Não há diferença entre a freqüência de TLR9 quando se compara o carcinoma ductal com o carcinoma lobular, porém, verificam-se maiores níveis de imunomarcção nos tumores mucinosos que nos tumores tubulares. O mecanismo pelo qual os receptores de estrógeno alfa regulam a expressão de TLR9 ainda não são claros e necessitam de mais estudos.

Tumores com comprometimento axilar apresentam níveis de TLR9 levemente elevados, quando comparadas com aqueles tumores que são classificados como N0. É estatisticamente significativa a correlação inversa entre

TLR9 e níveis de RE. Os níveis deste receptor estão levemente elevados em tumores de mama triplo-negativos em comparação com os tumores que apresentam a combinação dos três marcadores (RE, RP e ERBB2) ou duplo-positivos (RE e RP positivos), porém isto não apresenta significância estatística. Se as células neoplásicas realmente utilizam a via mediada por TLR9 para a invasão, o bloqueio desta via, como por exemplo, pela cloroquina, deve ser testado, bem como inibidores sintéticos da TLR9 como uma arma da imunoterapia.

Os tumores triplo-negativos, segundo diversos autores (CARVALHO, 2008; CHEANG et al., 2008; HAFFTY et al., 2006; LIN et al., 2009; NAM et al., 2008; RAKHA et al., 2008; RAKHA et al., 2009; REIS-FILHO e TUTT, 2008; RHEE et al., 2008) apresentam maior agressividade em relação aos demais tumores de mama.

O melhor conhecimento do perfil molecular dos tumores mamários, através de ligantes, seus respectivos receptores, sua correlação com o perfil molecular em estudo, no caso, o triplo-negativo, é um importante passo para o desenvolvimento de terapia alvo específico para esta agressiva forma de câncer mamário.

Novos horizontes são necessários na pesquisa de novas linhas de tratamento para o câncer de mama triplo-negativo, considerando a ausência de resposta aos tratamentos considerados reconhecidamente efetivos. Desta forma, é entendimento da literatura que este tipo de câncer de mama tem um pior comportamento e não responde a tratamentos como hormonioterapia ou terapia-alvo com trastuzumabe, precisa ser melhor conhecido. É necessário um melhor conhecimento sobre sua quimiossensibilidade a drogas específicas, bem como avaliar melhor o papel desempenhado por fatores relacionados à inflamação e dos fatores de crescimento citados anteriormente, para o melhor entendimento desta neoplasia e o eventual desenvolvimento de novas formas de terapia-alvo. Além disso, é de grande importância que se investigue o curso clínico e comportamento biológico destes tumores numa amostra de indivíduos brasileiros.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a expressão de fatores de crescimento e de marcadores de inflamação por imunohistoquímica em carcinomas mamários triplo-negativos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Estudar a frequência e as características demográficas de pacientes portadoras de carcinomas de mama triplo-negativos dentre todos os casos de câncer de mama, tratados no Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2006.
- b) Avaliar a imunexpressão de fatores de crescimento e seus receptores (EGFR, EGF, PDGF, PFGFRA, VEGFA, VGFR2, FGF2, FGFR2) e de fatores relacionados à inflamação (COX2, NOS2, IL1, TLR-9) em câncer de mama triplo-negativo.
- c) Investigar o padrão de distribuição demográfica e de metastatização dos tumores triplo-negativos comparando os subgrupos basal e não- basal.
- d) Avaliar a sobrevida de pacientes portadoras de tumores de mama triplo-negativos diferenciando entre os subgrupos de pacientes portadores de tumores basal e não-basal.
- e) Correlacionar o padrão de expressão dos marcadores acima descritos com a sobrevida de todos os portadores de câncer de mama triplo-negativo e seus subgrupos (basal e não-basal).

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Casuística

A população deste estudo é o conjunto de todos os casos de neoplasia maligna de mama no sexo feminino, submetidos à avaliação imunoistoquímica para receptor de estrógeno (RE), receptor de progesterona (RP) e ERBB2, registrados nos arquivos de Laboratório Prof. Livino Pinheiro, do Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará, no período de janeiro de 2000 a dezembro de 2006, sendo ao todo avaliados 5.625 laudos de imunoistoquímica. Como, nessa época, raramente se fazia no hospital imunoistoquímica de imediato para esses três marcadores, inicialmente apenas o RE, foram selecionados 683 casos que apresentaram imunorreação negativa para pelo menos um desses marcadores.

Foram encontrados 127 pacientes com painel imunohistoquímico triplo-negativo previamente definido. Dentre eles, 27 pacientes não tinham material histológico disponível no laboratório do ICC, sendo, portanto, excluídos. Dos 100 restantes, 62 foram submetidos à avaliação do material pelo método de microarranjo tecidual (TMA), no Hospital AC Camargo. Após a análise, 10 pacientes foram ainda excluídos: um por tratar-se de um caso de melanoma associado, outro por ter sido submetido a tratamento com tamoxifeno, 6 porque apresentavam positividade para ERBB2 e 2 pacientes não possuíam dados demográficos no prontuário. Restaram 52 pacientes deste grupo inicial de tumores triplo-negativos que foram então incluídos no estudo.

Cento e vinte e um pacientes tinham RE e RP negativos e não haviam sido submetidos à análise de ERBB2. Após realização do exame, 21 pacientes foram excluídos por apresentar positividade do ERBB2 e 60 pacientes foram excluídos por não haver blocos de parafina disponíveis no ICC. Entre os 40 restantes, 5 foram enviados ao TMA, e destes, 3 foram excluídos por tratar-se de ERBB2 positivo.

Apenas 2 pacientes deste grupo inicial de RE e RP negativos foram, então, incluídos no estudo.

Duzentos e doze pacientes tinham apenas o RE negativo, sem avaliação de RP ou ERBB2. Dentre eles, 118 tinham material histológico indisponível no Instituto do Câncer e, em uma paciente, o exame RE negativo foi obtido após resposta patológica completa, sendo desconsiderado. Dos 93 pacientes restantes, 25 foram submetidos à avaliação de RP e ERBB2, sendo 17 deles triplo negativos, dos quais 15 foram enviados ao TMA. Após análise no TMA destes 15 pacientes, 4 foram excluídos: 2 pacientes fizeram tratamento com tamoxifeno, 2 tinham na verdade ERBB2 positivo, restando 11 pacientes incluídos no estudo. Outras quinze amostras de pacientes do grupo RE negativo inicial foram enviadas ao TMA antes de avaliar RP e ERBB2 no ICC; destes, 7 eram ERBB2 positivo, um paciente ERBB2 inconclusivo e 2 foram submetidos a tratamento com tamoxifeno, restando 5 pacientes aptos ao presente estudo.

Dos duzentos e dezoito pacientes restantes da amostra inicial de 683, que apresentavam no laudo imunostiquímico para RE ou RP positividade focal, foi possível revisar e enviar para o TMA o material de apenas quatro pacientes. Essas quatro amostras foram confirmadas como triplo-negativas sendo, então, incluídas no presente estudo. O planejamento inicial era revisar todos os casos diagnosticados como positividade focal, considerando que, à luz dos conhecimentos atuais, essa classificação não é mais utilizada. Não houve, entretanto, tempo hábil para fazê-lo.

Cinco pacientes que estavam inclusos no grupo enviado à análise no TMA foram excluídos, um por apresentar carcinoma ductal in situ, um outro por apresentar tumor filodes, um terceiro portador de doença de Paget e outros dois por apresentarem outras neoplasias como: carcinoma espinocelular e adenocarcinoma gástrico.

Ao todo, 106 pacientes foram submetidos à análise e validação através do TMA, restando 74 pacientes aptas para inclusão no estudo, vide figura 4, o que obviamente não representa a incidência real de tumores triplo-negativos nesta instituição.

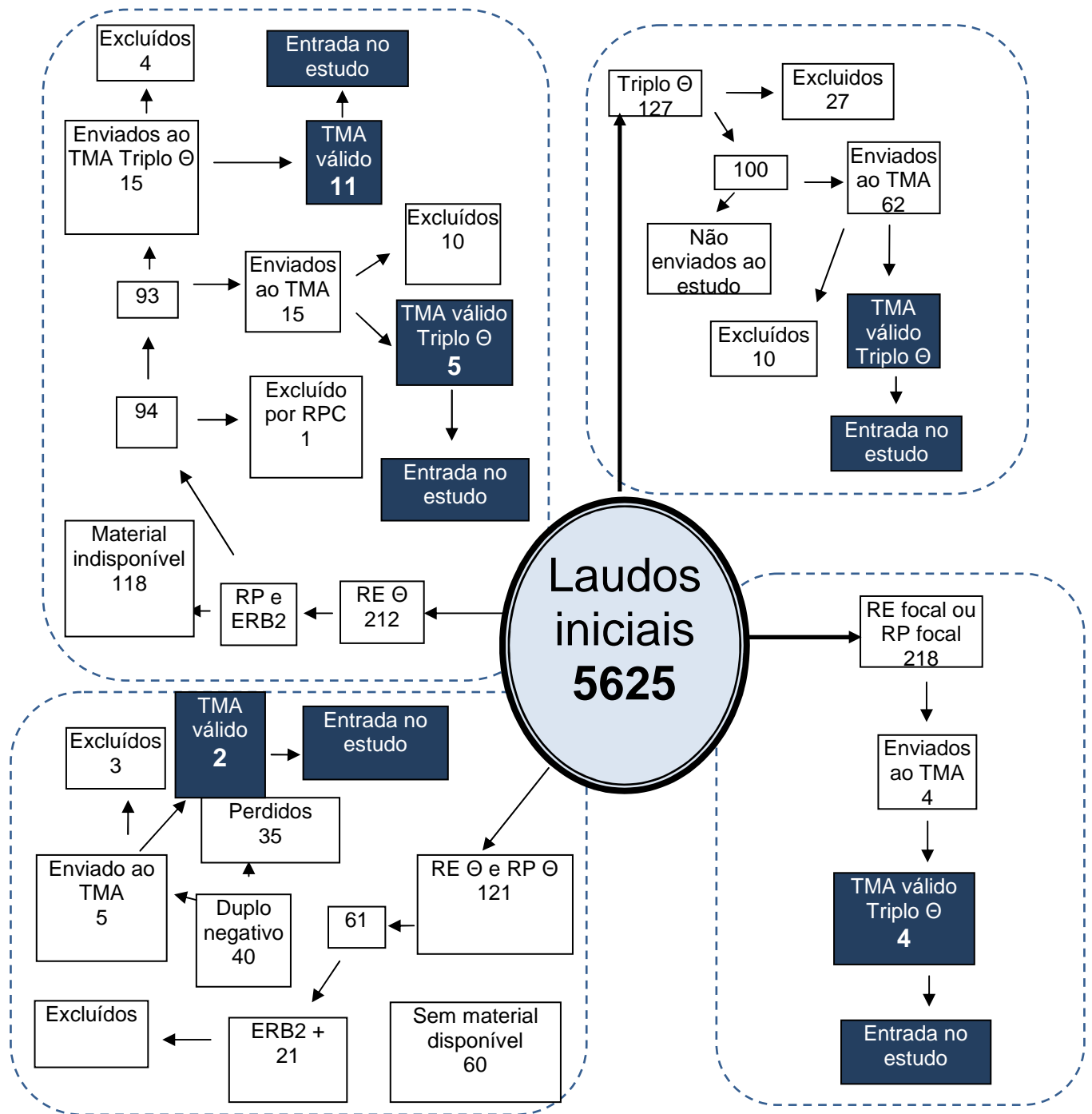


Figura 4: Fluxograma de inclusão e exclusão dos casos de carcinoma de mama participantes do estudo

3.2 Coleta de dados

Foi confeccionada ficha para coleta de dados, contendo dados referentes à paciente, como idade, raça, histórico familiar de câncer de mama e/ou ovário, características morfológicas do tumor (tipo histológico, grau de diferenciação de Scarf, Bloom e Richardson, grau nuclear de evolução, e ainda invasão linfática e/ou vascular), estadiamento clínico e patológico, tratamentos (cirúrgico, radioterápico, quimioterápico neo-adjuvante e adjuvante), intervalo livre de doença, sítios de recidiva/metástase e sobrevida (vide anexo I), e realizada a coleta de dados nos prontuários sob guarda do serviço de arquivo médico e estatística – Same do Hospital do Câncer – ICC.

3.3 Confeção de bloco para TMA (*Tissue Microarray*) e preparo das lâminas

Após a confirmação histológica do diagnóstico de carcinoma ductal infiltrante da mama, procedeu-se a seleção de áreas representativas de 74 casos, nas lâminas coradas por HE. Para seleção das áreas a serem amostradas foi escolhido um corte de cada caso. A seguir, foi feita marcação da melhor área na lâmina e de sua área correspondente no respectivo bloco de parafina, os chamados blocos doadores. Retirou-se um cilindro 1 mm de diâmetro de cada bloco doador, que foi, por sua vez, transferido para um outro bloco de parafina chamado bloco receptor, empregando-se um *tissue microarrayer* apropriado (Beecher Instruments Micro Array Technology, NJ, EUA). Foi desta forma, confeccionado um único bloco de parafina – microarranjo tecidual (*Tissue microarray* - TMA), o qual continha amostras de todos os casos inicialmente selecionados. Vide Figura 5

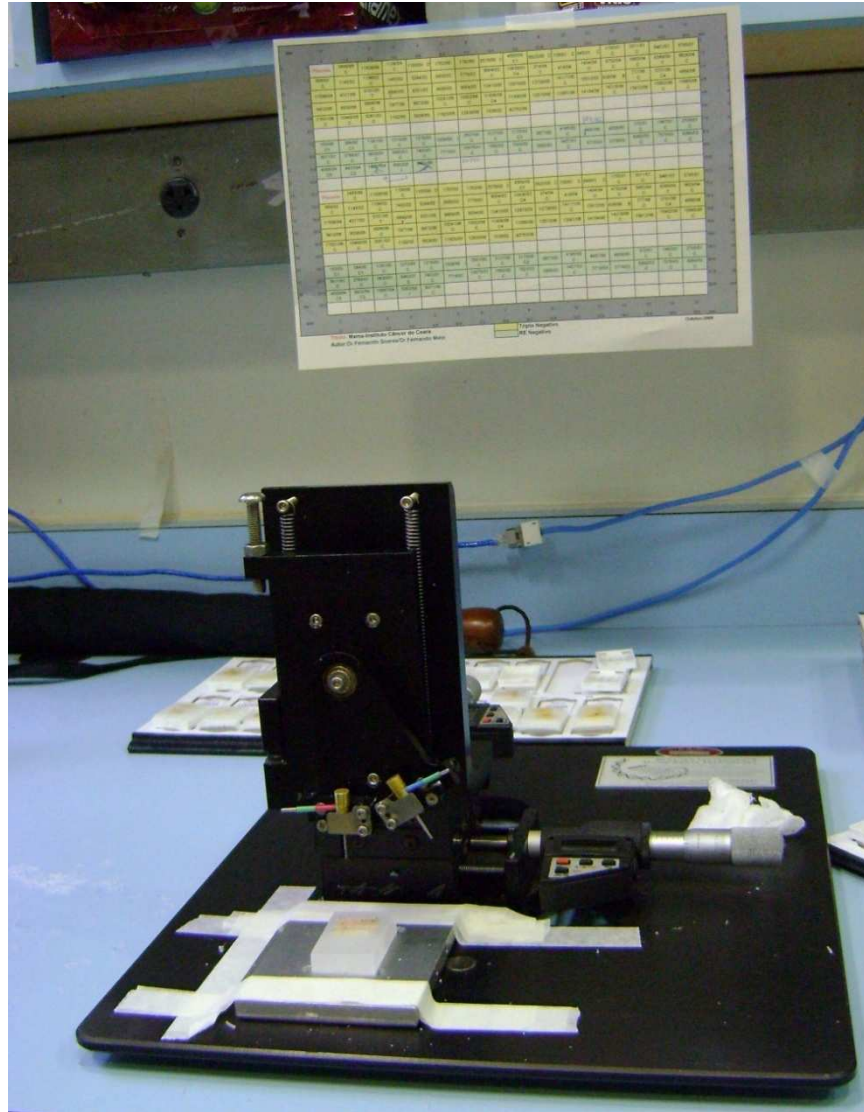


Figura 5 –Tissue microarrayer apropriado (Beecher Instruments Micro Array Technology, NJ, EUA) – Laboratório Experimental Fundação Antonio Prudente São Paulo

O bloco receptor final continha 106 amostras de tumores de mama, 71 classificados como triplo-negativos pelos dados do Laboratório Prof. Livino Pinheiro, do Hospital do Câncer – Instituto do Câncer do Ceará e um segundo grupo formado de 35 amostras de tumores classificados como duplo-negativos (RE e RP negativos nos quais não havia sido testado o produto do oncogene ERBB2). As amostras deste bloco foram então inicialmente submetidas à imunohistoquímica para RE, RP e ERBB2, no Laboratório de Patologia Experimental da Fundação Antônio Prudente, e reavaliadas por patologista com experiência no diagnóstico dos tumores de mama (Dr. Fernando Soares), para verificação da classificação inicial. Do primeiro grupo, foram excluídas onze amostras, oito por não apresentarem reação de boa qualidade

para o ERBB2 e três por apresentaram reação positiva para o ERBB2. Do segundo grupo foram excluídas nove amostras, quatro porque a reação para ERBB2 foi inconclusiva, outras quatro por apresentarem positividade para este anticorpo. Para uma outra amostra desse grupo, far-se-ia necessária a realização de reação de FISH, por apresentar marcação classificada como escore 2+, ou seja, indeterminada, tendo-se decidido pela exclusão deste caso. Portanto, nosso bloco de TMA é formado com 86 amostras de tumores triplo-negativos, destes 74 fizeram parte do estudo, composto por análise por imunohistoquímica dos marcadores e análise de dados demográficos (vide fluxograma e figuras 4 e 6).

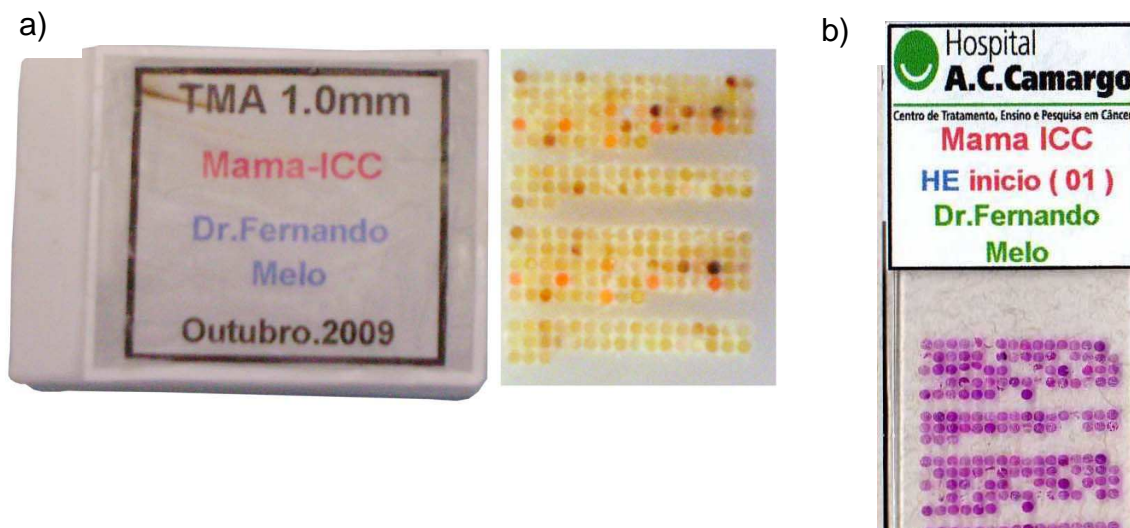


Figura 6 (a) – Bloco de TMA contendo amostra utilizada do presente estudo frente e verso e (b) lâmina corada por HE contendo amostras utilizadas neste estudo.

O preparo das lâminas seguiu padronização do Laboratório de Patologia Experimental da Fundação Antônio Prudente São Paulo – SP, sendo detalhado da maneira que se segue.

Após colocar uma fita adesiva contra o bloco de TMA, foram realizados os cortes deste bloco de TMA, sendo o mesmo cortado em micrótomo rotativo na espessura de 5µm. A fita adesiva com o material foi colado na lâmina apropriada (Instrumedics Inc.) e com a pressão manual de um rolo. A lâmina com a fita adesiva

sofreu irradiação com o ultravioleta (UV) por trinta minutos, sendo em seguida mergulhada em solução solvente (TPC – fornecido pelo fabricante do kit de TMA – Instrumedics Inc – USA) e seca em temperatura ambiente. As fitas adesivas foram retiradas após a secagem. As lâminas após sofrerem banho de parafina, estavam prontas para armazenamento em freezer.

Para a confecção de lâminas para imunistoquímica, as lâminas foram inicialmente submetidas à desparafinização, composta de diversas etapas detalhadas a seguir. As lâminas contendo os cortes histológicos foram imersas em xilol a 60°C durante 20 minutos, após haverem permanecido por 24 horas em estufa a 60°C. A seguir foram imersas em xilol à temperatura ambiente por período de 20 minutos e, posteriormente, reidratadas em etanol em concentrações decrescentes: 100% por 30 segundos, 85% por 30 segundos e 70% durante 30 segundos.

Após a desparafinização, as mesmas foram lavadas seguidamente em água corrente e destilada. As lâminas foram colocadas em panela de pressão (Eterna®, Nigro) contendo tampão citrato 10mM pH=6.0 fervente. Em seguida a panela foi lacrada com a válvula de segurança aberta. Após a saída do vapor saturado, foi abaixada a válvula de segurança e aguardada a pressurização total, cronometrou-se então 4 minutos após este momento.

Em seguida deixou-se a panela fechada sob água corrente até a despressurização total, destampando-a e lavando as lâminas em água corrente e destilada em sequência.

Procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena com H₂O₂ a 3,0%, (água oxigenada 10 vol) com 3 lavagens de 10 minutos cada. Lavou-se em água corrente e destilada e, depois, com solução salina tamponada com fosfato (PBS - *phosphate buffered saline*) 10mM pH=7.4 por 5 minutos.

As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário diluído em título pré-estabelecido, conforme tabela abaixo, em PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 18 horas, a 4°C, em câmara úmida. Os anticorpos anti-RE, anti-RP, anti-ERBB2, anti-CK5, anti-CK-14, anti-p63, anti-EGFR e anti-COX2 já haviam sido previamente padronizados pelo Departamento de Patologia Clínica para rotina laboratorial ou para outros projetos. Os demais anticorpos precisaram ter seus títulos e condições de marcação padronizadas para este estudo, para tal contamos com o auxílio do Dr. Rafael Malagoli. Foi excluída do estudo a análise do fator de necrose tumoral, $\text{TNF}\alpha$, devido à impossibilidade de titulação do anticorpo no laboratório de patologia experimental da Fundação Antonio Prudente.

Quadro 1 – Relação de anticorpos utilizados, clone utilizado, titulação, fabricante e país.

Anticorpo	Clone	Título	Fabricante e Número de Catálogo
Receptor de Estrógeno	Monoclonal de coelho SP1	1:4000	Neomarkers # RM9101,Fremont,CA,EUA
Receptor de Progesterona	PgR636	1:300	Dako # M3569, Carpinteira, EUA
C-erbB2	Policlonal de coelho A-485	1:2000	Dako #A048, Glostrup, Dinamarca
Citoqueratina 5	XM26	1:300	Neomarkers #MS 1896
Citoqueratina 14	LL002	1:400	Biogenex # MU146-UC
p63	4A4	1:500	Dako # M7247
EGFR	EGFR-25	1:100	Novocastra #NCLEGFR-384
VEGFA	SC-152	1:100	Santa Cruz Biotechnology, Inc. USA.
COX2	Monoclonal de rato 4H12	1:6000	Novocastra #NCL-COX2, Newcastle upon Tyne, Reino Unido
VEGFR2	Policlonal de coelho	1:100	Neomarkers # RB239
FGF2	Policlonal de coelho	1:500	Chemicon # AB1459
PDGF	Policlonal de coelho	1:50	Neomarkers # 9257
PDGFR alfa	Policlonal de coelho	1:50	Neomarkers # Rb 9027
PDGFR beta	Policlonal de coelho	1:50	Neomarkers # 9032
NOS2	Clone 6	1:100	BD Biosciences,# 610238 USA
TLR9	Monoclonal de rato		Abcam # 26C593, USA

A seguir foram lavadas 3 vezes em PBS durante 3 min cada lavagem, e em seguida incubadas por trinta minutos a 37°C com anticorpo secundário (*Novolink™ Pos Primary antibody* - Novolink Max Polymer cod # RE720k, Reino Unido).

Posteriormente foram lavadas 3 vezes com PBS por três minutos cada lavagem, e, após esta fase, incubadas com Novolink Polimer™ (Leica Microsystems Inc.) por 30 minutos a 37°C. A seguir, foram novamente lavadas 3 vezes em PBS durante 3 minutos cada lavagem. Em seqüência, as lâminas foram incubadas em solução substrato (3,3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride) (DAB) 100 mg% (Sigma, D-5637-EUA); 1,0 ml de Dimetilsulfóxido (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1,0 ml de H₂O₂ 6%, água oxigenada 20 vol, (Quimesp, Guarulhos, SP), 100 ml de PBS (manipulação própria); por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz.

Ao final desta etapa, verificou-se ao microscópio se houve o desenvolvimento de coloração castanho-dourada nas lâminas controles, com o padrão esperado para cada proteína estudada, como produto final da reação. As lâminas foram então lavadas em água corrente e água destilada por 3 minutos, contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 1 minuto e, a seguir, lavadas em água corrente e destilada. Foram imersas 2 vezes em água amoniacal (solução aquosa de hidróxido de amônio a 0,5%), lavadas em seguida em água corrente e destilada, e depois desidratadas em etanol em concentrações crescentes, 80%, por 30 segundos, 95%, por 30 segundos e 100% duas vezes, por 30 segundos cada. As lâminas foram então diafanizadas em xilol 4 vezes, por 30 segundos cada e, finalmente, foram montadas em Entellan neu (Merck, 1.07961, Alemanha).

3.4 Caracterização de tumores triplo-negativos

Após a confecção do bloco de TMA e das lâminas, com intuito de se confirmar a classificação realizada no laboratório de origem, foi novamente avaliada

a expressão de receptores de estrógeno e progesterona, além da pesquisa da proteína ERBB2 em todas as amostras selecionadas.

Para o receptor de estrógeno, foi utilizado um anticorpo monoclonal de coelho (Quadro 1) que produz um padrão de marcação nuclear na célula epitelial e reconhece uma proteína de 67 KDa, identificada como o receptor de estrógeno alfa, um importante regulador do crescimento e diferenciação da glândula mamária (CANO et al., 2003; HUANG et al., 2004).

Para identificação da presença de receptores de progesterona, foi utilizado anticorpo monoclonal de rato (ELASHRY-STOWERS et al., 1988). Receptores de progesterona podem ser encontrados por imunistoquímica no núcleo de células normais da mama, além de endométrio e próstata. Além dos tumores mamários, outros tumores do trato reprodutivo feminino também podem expressar receptores de progesterona como carcinoma endometrial, sarcoma endometrial, meningioma e tecoma ovariano dentre outros (BRANDIS et al., 1993).

Para concluir a classificação dos tumores como triplo-negativo, foi realizada a imunomarcação da proteína ERBB2, para o que se utilizou um anticorpo policlonal de coelho (Quadro 1). O anticorpo em estudo marca aproximadamente 20% dos tumores mamários, ovarianos e do trato gastrointestinal. Diferentemente dos anticorpos de receptores de estrógeno e progesterona que marcam o núcleo, a marcação da ERBB2 é membranar, com marcação ocasional do citoplasma. A hiperexpressão do ERBB2 é relacionada a um risco elevado de recidiva tanto em pacientes portadores de tumores positivos para receptores hormonais, bem como tumores negativos para tais receptores. A definição da hiper-expressão do ERBB2 é ainda além de importante fator prognóstico, um valioso marcador de fator preditivo (SLAMON et al., 2001).

3.5 Identificação de tumores triplo-negativos basais e não basais.

Não há consenso na literatura para caracterização de tumores basais. Em nosso estudo, utilizamos a citoqueratina 5 (CK5) e o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) para identificar os tumores basais, havendo necessidade de expressão de um destes dois marcadores para tal classificação. Foi avaliada também a expressão da citoqueratina 14 (CK14) e da proteína p63. Nas análises dos dados avaliamos também a associação dos marcadores e do prognóstico, quando os tumores foram classificados usando-se estas proteínas ou empregando-se apenas um dos marcadores previamente selecionados para subclassificação (EGFR e CK5).

Para estudar a positividade para CK5 foi utilizado um anticorpo monoclonal de rato (Quadro 1). A CK5 tem peso molecular de 58 kDa, sendo encontrada em tecido epitelial e mesotelioma, com marcação citoplasmática (CLOVER et al., 1997).

A pesquisa do EGFR foi realizada com um anticorpo monoclonal de rato (Quadro 1). O anticorpo citado detecta o antígeno na membrana e muitas vezes no citoplasma de diversos tumores, a exemplo de (pulmão, pele, colo uterino, rim, endométrio, tireóide e colón, além dos carcinomas mamários (TISCHKOWITZ et al., 2007).

A citoqueratina 14 é uma proteína com peso molecular de 50 kDa, sendo encontrada em células do epitélio escamoso estratificado e células basais e parabasais do epitélio escamoso não-queratinizado do trato urinário adulto. No tecido tumoral mamário, é encontrada nas células basais, sendo importante para estudo do prognóstico do carcinoma de mama. Para sua análise foi utilizado um anticorpo monoclonal de rato (Quadro 1).

Para identificação da proteína p63, foi utilizado um anticorpo monoclonal de rato (Quadro 1). A p63 faz parte da família da proteína p53, e sua localização predominante é na camada basal do epitélio escamoso estratificado. Esse anticorpo apresenta um padrão nuclear de imunomarcção.

Para análise de todas as imunomarcção foi tomada como padrão de positividade mínima de 10%.

3.6 Imunoistoquímica de marcadores relacionados a fatores de crescimento e à inflamação.

Após a classificação dos tumores mamários triplo-negativos em basais e não-basais avaliou-se a expressão de alguns fatores de crescimento, bem como de fatores relacionados à inflamação. No que diz respeito aos fatores de crescimento, foram estudados o fator de crescimento epidérmico (seu receptor, EGFR, foi pesquisado na etapa de classificação dos tumores basais), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e seus receptores PDGFRA e PDGFRB, fator de crescimento de fibroblastos (FGF2) e seu receptor FGFR2, fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA) e seu receptor VEGFR2. Quanto aos fatores relacionados à inflamação, foram estudadas a Cicloxigenase-2 (COX2), a interleucina-1 beta (IL1B), a óxido nítrico sintase induzida (NOS2) e ainda o *Toll-like receptor 9* (TLR9). Todos esses marcadores foram pesquisados na célula neoplásica, não tendo sido valorizado a expressão em células inflamatórias infiltrantes e células do estroma.

3.7 Imunomarcção para fatores de crescimento.

O Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) é uma proteína de 170 KDa e tem importante ação na diferenciação de células *in vivo* e um potente efeito

mitogênico em um grande número de culturas de células. O EGF tem primordial ação na sobrevivência celular, ativando transdução de sinais que incluem ativação de P13K/AKT, RAS/ERK e JAK/STAT. Para avaliação da expressão de EGF foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho (Quadro 1), com marcação membranar.

Para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) empregou-se um policlonal de coelho, com marcação citoplasmática (Quadro 1). Existem dois receptores para esta proteína, o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas alfa (PDGFRA) e o receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas beta (PDGFRB). O PDGFRA é específico e se expressa em células progenitoras oligodendrocíticas e apresenta marcação citoplasmática e membranar. O anticorpo utilizado para reconhecê-lo foi um policlonal de coelho. O PDGFRB também é específico, mas diferentemente do PDGFRA apresenta expressão nos neurônios e imunomarcação membranar. O anticorpo utilizado foi um policlonal de coelho (Quadro 1).

O fator de crescimento fibroblástico 2 (FGF2) faz parte da família de polipeptídeos ligados a heparina com peso molecular variando de 17 a 38 kDa. Ele é um importante regulador do crescimento e diferenciação de uma grande variedade de células originadas do mesoderma, ectoderma e endoderma. FGFs estão envolvidos no desenvolvimento normal, processo de cicatrização e reparo, angiogênese e hematopoiese. Em relação a processos patológicos neoplásicos, encontra-se relacionado à tumorigênese, angiogênese e ainda ao processo de metastatização. A família dos FGFs é composta por pelo menos 17 membros, designados desde FGF1 a FGF17. Para estudo de um dos receptores deste ligante, o receptor de fator de crescimento de fibroblasto 2 (FGFR2), foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho, o qual apresenta marcação citoplasmática (GALVIN, et al., 1996).

VEGFA é uma glicoproteína com estrutura semelhante ao PDGF. Foi utilizado no seu reconhecimento um anticorpo policlonal de coelho (Quadro 1) que reconhece sua marcação no citoplasma da célula.

Para marcação do receptor 2 de VEGF foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho, com marcação citoplasmática (Quadro 1).

3.8 Imunomarcação para fatores associados à inflamação.

A expressão de cicloxigenase-2 (COX2) foi pesquisada com auxílio de um anticorpo monoclonal de rato, com marcação citoplasmática (Quadro 1).

Foi utilizado um anticorpo policlonal de coelho para interleucina-1 beta (IL1B), com marcação citoplasmática (Quadro 1).

Foi pesquisada a expressão do óxido nítrico-sintase induzível utilizando-se um anticorpo de rato com marcação citoplasmática (Quadro 1).

O *Toll-like receptor* 9 (TLR9) foi investigado com um anticorpo monoclonal de rato, com marcação citoplasmática (Quadro 1).

3.9 Coleta de Dados

Foi desenvolvida uma ficha de coleta de dados clínicos específica para este estudo, onde foram avaliados dados como: idade da paciente, raça, presença de história familiar para câncer de mama e/ou ovário, grau de parentesco de eventual familiar acometido por estas neoplasias e estadiamento clínico, baseado na classificação TNM. Todas as fichas foram preenchidas a partir dos dados constantes nos prontuários médicos. Quanto à histopatologia do tumor foram estudados o grau histológico (conforme Scarf-Bloom-Richardson), o grau nuclear, a presença de invasão linfática e/ou vascular e o estadiamento patológico.

Avaliaram-se ainda os tratamentos aos quais a paciente se submeteu como realização de tratamento cirúrgico, extensão e tipo da cirurgia, tipo de abordagem e acometimento dos linfonodos regionais, realização de quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante, grau de resposta (clínica ou patológica) no caso de quimioterapia neoadjuvante e a realização de radioterapia.

Por fim foram analisados a evolução da doença e seu perfil de metastatização, o *status* da paciente na última consulta de seguimento e as datas de eventos como morte ou progressão.

3.10 Análise Estatística

Na obtenção dos resultados utilizamos o *software statistics IBM SPSS Statistics 18*.

Foi empregada a mediana como medida de tendência central e o interquartil como medida de dispersão para análise da idade, da sobrevida e do intervalo livre

de doença. Para análise da normalidade foi utilizado o teste de Kolmogorov-Smirnov. Para diferença entre as médias de grupos foi empregado o teste de Mann-Whitney.

A frequência da expressão dos diversos marcadores imunoistoquímicos nos grupos analisados, bem como a associação destes com as outras variáveis clínico-demográficas, foram avaliadas empregando-se o teste exato de Fisher.

As curvas de sobrevida foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier. A interação das variáveis clínicas, demográficas e histopatológicas foi feita pelo método de log-rank, para análise univariada, e pelo método de regressão de Cox, para análise multivariada.

Adotou-se um nível de significância de 5%, ou seja p inferior a 0,05.

4 RESULTADOS

4.1 Características clínico-demográficas e patológicas

Foi estudada a presença de imunomarcção para fatores de proliferação e para fatores relacionados à inflamação em uma amostra de 74 pacientes do sexo feminino, portadoras de carcinoma de mama triplo-negativo.

A idade das pacientes variou de 27 a 95 anos, com mediana de 57 anos e média de 59,9 anos. Ao distribuir-se a amostra em três faixas etárias, observou-se que 26 (35,1%) encontravam-se na faixa de 27 a 45 anos; 23 (31,1%) na faixa de 46 a 65 anos e 25 (33,8%) na faixa de 66 a 95 anos (Tabela 1).

Nos registros de prontuários foram encontradas duas classificações para cor, 43 eram pardas, correspondendo a 58,1%, e 31 (41,9%) eram brancas.

Nesta amostra de mulheres portadoras de tumores de mama triplo-negativos, foram encontradas avaliações quanto à presença de histórico familiar em 65 prontuários. Destas, 30 (46,2%) apresentavam familiares de primeiro ou segundo grau com câncer de mama ou ovário. Das pacientes com história familiar para câncer, 28 (93,3%) relataram familiares portadores de câncer de mama. Os 6,7% (2/30) restantes eram pacientes com familiares acometidos por neoplasia de ovário. Em relação ao grau de parentesco, 20 (66,7%) possuíam familiares de primeiro grau acometidos por neoplasia de mama ou ovário, oito (26,7%) relataram a existência de familiares de segundo grau, e ainda duas (6,7%) possuíam familiares de primeiro e segundo grau com neoplasia de mama ou ovário (Tabela 1).

Na avaliação do estadiamento clínico (EC) inicial da nossa amostra, possível de ser realizada em 72 dos 74 casos, detectou-se uma maior concentração de casos nos estádios II, com 37 casos, o que correspondeu a 52,7% da amostra (20 no EC IIA e 17 no IIB) e III com 24 casos (32,4%) (4 no EC IIIA e 20 no IIIB). Em menor proporção, foram classificados 4 (5,4%) casos no EC I e 5 (6,8%) no EC IV (Tabela 1).

Da amostra estudada, 66 (89,2%) pacientes foram submetidas a alguma forma de tratamento cirúrgico, conforme demonstrada na tabela 2. No subgrupo basal, 33 (86,8%) foram submetidas à cirurgia, e 33 (91,7%) no subgrupo não-basal ($p = 0,387$) (tabelas 3 e 6).

Quimioterapia neoadjuvante (QTneo) foi empregada em 23 (31,1%) pacientes com tumores TN. No subgrupo de tumores basais foi administrada em 10 (26,3%) e, no subgrupo de tumores não-basais, foi prescrita a 13 pacientes (36,1%) com $p = 0,255$, (tabela 3).

Quanto à quimioterapia com intuito adjuvante, a mesma foi realizada em 48 (64,9%) pacientes (tabelas 1 e 3).

A utilização de radioterapia externa pós-operatória foi realizada em 54 (77,1%) das pacientes (tabelas 1 e 3).

Foram estudadas as características morfológicas nos laudos histopatológicos constantes nos prontuários das pacientes. A maioria das pacientes 83,8% (62/74) era portadora de carcinoma ductal infiltrante (CDI), 4 (5,4%) eram portadoras de carcinoma medular, 2 (2,7%) apresentavam tumores lobulares associados à CDI, e 4(5,4%) apresentavam carcinomas indiferenciados. Desta

amostra, 45 casos foram classificados quanto ao grau histológico, seguindo os critérios de Scarf-Bloom-Richardson (SBR), em SBR2, em 23 casos (51,1%), seguindo-se do SBR3 em 19 (40%) casos. Apenas 3 (6,7%) amostras foram SBR1. Também foi estudado o grau nuclear (GN), sendo que metade dos casos avaliados (28/56) foi classificada como GN2, 21 (28,4%) foram avaliados como GN3 e 7 amostras como GN1 (12,1%) (tabela 1).

Havia relato da avaliação da infiltração linfática em 33 laudos histopatológicos. Em 29 (87,9%) destes foi encontrada infiltração linfática. Quanto à invasão vascular esta se encontrava avaliada em 20 laudos histopatológicos, estando presente em 15 amostras, ou seja, 75% destes casos (Tabela 1).

O perfil demográfico das pacientes portadoras de tumores triplo-negativos encontra-se na tabela 1.

4.2 Classificação de tumores triplo-negativos basais

Existem diversos critérios na literatura para a classificação de tumores mamários triplo-negativos basais, que se utilizam de diferentes marcadores de células basais. O mais aceito é aquele publicado por Nielsen e colaboradores em 2004, segundo o qual, são basais os tumores que, além de não apresentarem expressão para receptores de estrógeno e progesterona e para o produto do oncogene *ERBB2*, apresentam reação positiva por imunistoquímica para a citoqueratina 5 (CK5) ou para o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR).

Ao ser analisada a positividade para marcadores basais utilizados para classificação de tumores basais, foi observada imunomarcagem para CK5 em 27 casos e para EGFR em 24, o que correspondeu, segundo esta classificação, a 38

casos de tumores triplo-negativos (TN) basais, representando 51,35% dos casos, enquanto 36 (48,65%) casos foram de tumores não-basais dentro da amostra estudada de 74 tumores triplo-negativos. Por outro lado, quando analisamos outros marcadores considerados como relacionados também ao fenótipo basal da célula mamária, observamos imunomarcagem para CK14 em apenas 8 casos (10,8%), e para o p63, foi verificada imunomarcagem em 18 casos, o que correspondeu a 24,3% dos tumores triplo-negativos. Tomando por base os dados acima, se classificássemos como basais aqueles tumores que apresentaram positividade para pelo menos um destes marcadores basais (EGFR ou CK5 ou CK14 ou p63) teríamos agora 45 TN basais (60%) e 29 não-basais (40%), contrastando com os 38 (51,35%) e 36 (48,65%) da definição do estudo seguindo os critérios de Nielsen (2004) (Tabela 2). Este acréscimo foi de 7 casos, o que representa 18,4%.

Tabela 1 – Características clínico-demográficas e patológicas da amostra de tumores triplo-negativos.

Variável	Categoria	N (74)	%
Idade (anos) *	23 a 45	26	35,1
	46 a 65	23	31,1
	66 a 92	25	33,8
Raça	Parda	43	58,1
	Branca	31	41,9
História Familiar	Câncer de mama	28	37,8
	Câncer de ovário	02	2,7
	Sem história familiar	35	47,3
	Sem informação	09	12,2
Estadiamento Clínico	I	04	5,4
	II (A e B)	39	52,7
	III (A e B)	24	32,4
	IV	05	6,75
	Sem informação	02	2,7
Tipo Histológico	Ductal infiltrante	62	83,8
	Medular	04	5,4
	CDI + Lobular	02	2,7
	Indiferenciado	04	5,4
	Inflamatório	02	2,7
Scarf-Bloom-Richardson	I	03	04
	II	23	33,8
	III	19	25,73
	Não avaliado	45	36,4
Grau Nuclear	I	07	9,5
	II	28	37,9
	III	21	28,4
	Não avaliado	18	24,3
T	1	06	8,1
	2	27	36,5
	3	07	9,5
	4	24	32,4
	Não avaliado	10	13,5
N	Livre	37	50
	Comprometida	28	37,8
	Não avaliado	9	12,2
Invasão Linfática	Presente	29	39,2
	Ausente	4	5,4
	Não avaliada	41	55,4
Invasão Vascular	Presente	15	20,3
	Ausente	05	6,7
	Não avaliado	54	73
Tratamento Realizado [#]	QT Neo	23	31,1
	Cirurgia	66	89,2
	QT adjuvante	48	64,9
	Radioterapia	54	77,1
Marcadores Basais	CK5	27	36,5
	EGFR	24	32,4
	EGFR (+) ou CK5 (+)	38	51,35
	CK14	8	10,8
	p63	18	24,3

* Idade mediana = 57 anos e idade média = 59,9.

[#]A soma das frequências é maior do que 100% pois vários pacientes foram submetidos a mais de um destes procedimentos.

Conforme visto na tabela 2, poderiam ser feitas outras combinações utilizando marcadores basais para definição do tumor triplo-negativo basal. No intuito de se definir como TN basal aquele que apresentasse imunomarcção concomitante para todos os quatro marcadores teríamos apenas 5 (6,75%) casos de tumores basais e 69 (93,25%) de tumores não basais. Ao ser utilizado a definição de basal como sendo a presença de imunomarcção para uma citoqueratina (CK5 ou CK14) associado a outro marcador como EGFR ou p63, teríamos 15 (20,3%) TN basais e 59 (79,7%) de TN não-basais. E ainda, considerando como condição para definição de tumor basal a imunomarcção de EGFR associada à imunomarcção de CK5 teríamos apenas 13 (17,6%) TN basais e 61 (82,4%) tumores triplo-negativos não-basais.

Tabela 2 – Análise comparativa de diversas associações de marcadores considerados basais para definição de tumores triplo-negativos basais.

Crítérios	Basal	Não-basal
CK5(+) ou EGFR(+) (critério de Nielsen)	38 (51,35%)	36 (48,65%)
CK5(+) ou CK14(+) ou EGFR(+) ou p63(+)	45 (60,8)	29 (39,2%)
CK5(+) e p63(+) ou EGFR (+) ou CK14(+) e p63(+) ou EGFR(+)	15 (20,3%)	59 (79,7%)
CK5(+) e EGFR(+) e p63(+) e CK14(+)	5 (6,75%)	69 (93,25%)
CK5(+) e EGFR(+)	13 (17,6%)	61 (82,4%)

Tabela 3 – Características clínico-demográficas das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativo comparando os fenótipos basal e não-basal.

Variáveis	Categorias	Basal (%) N=38	Não-basal (%) N=36	P
Idade	Média	57,4	54,9	
	Mediana	58,5	49	
	Range	27 a 92	29 a 95	
	27 a 45	12 (31,6)	14 (38,9)	
	46 a 65	10(26,3)	13 (36,1)	
	66 a 92	16(42,1)	09 (25)	
Raça	Branca	15 (39,5)	16 (44,4)	0,814
	Parda	23 (60,5)	20 (56,6)	
História Familiar	Sim	15 (39,5)	15 (41,6)	0,533
	Não	13 (60,5)	17 (58,4)	
	Não avaliado	10 (26,3)	4 (11,1)	
Estadiamento Clínico (TNM)	EC I	2 (5,3)	2 (5,7)	0,175
	EC II (A + B)	18 (47,4)	20 (57,5)	
	EC III (A + B)	14 (36,4)	11 (31,4)	
	EC IV	3 (7,9)	2 (5,7)	
	Não avaliado	1 (2,6)	1 (2,8)	
Tipo Histológico	Ductal infiltrante	33 (86,8)	29 (80,6)	
	Medular	2 (5,3)	2 (5,6)	
	CDI + lobular	1 (2,6)	1 (2,8)	
	Indiferenciado	1 (2,6)	3 (8,)	
	Inflamatório	1 (2,6)	1 (2,8)	
Tratamento	QT – Neo	10 (26,3%)	13 (36,1%)	0,255
	Cirúrgico	33 (86,8%)	33 (91,7%)	0,387
	QT – Adjuvante	23 (60,5%)	25 (69,4%)	0,288
	Radioterapia	24 (66,7%)	30 (88,2%)	0,30

Tabela 4 – Marcadores basais nos tumores mamários triplo-negativos comparando so fenótipos baasal e não basal.

Variáveis	Categorias	Basal (%) N=38	Não-basal (%) N=36	P
Marcadores Basais	CK5 (+)	27 (36,5%)	0	-
	CK5(-)	10 (26,3)	34 (94,4)	
	Não avaliável	1 (2,6)	2 (5,6)	
	CK14 (+)	7 (18,4)	1 (2,8%)	0,032
	CK14 (-)	30 (78,9%)	30 (83,3%)	
	Não avaliável	1 (2,6%)	5 (13,9%)	
	EGFR (+)	24 (63,2)	0	-
	EGFR (-)	14 (36,8)	35(97,2)	
	Não avaliável	0	1 (2,7)	
	p63 (+)	12 (31,6%)	6 (16,7%)	0,264
	p63 (-)	25 (65,8%)	27 (75,0%)	
	Não avaliável	1 (2,6%)	3 (8,3%)	

Tabela 5 – Marcadores relacionados à proliferação e à inflamação nos tumores mamários triplo-negativos comparando os fenótipos basal e não basal.

Variáveis	Categorias	Basal (%) N=38	Não-basal (%) N=36	P
Marcadores relacionados à proliferação celular	EGF (+)	25 (65,8)	19 (52,8)	0,565
	EGF (-)	9 (23,7)	11 (30,6)	
	Não avaliável	4 (10,5)	6 (16,7)	
	PDGF (+)	27 (71,1)	21 (58,3)	0,014
	PDGF (-)	11 (28,9)	8 (22,2)	
	Não avaliável	0	7 (19,4)	
	PDGFRA (+)	35 (92,1)	24 (66,7)	0,004
	PDGFRA (-)	1 (2,6)	10 (27,8)	
	Não avaliável	2 (5,3)	2 (5,6)	
	PDGFRB (+)	14 (36,8)	13 (36,1)	0,430
	PDGFRB (-)	22 (57,9)	18 (50)	
	Não avaliável	2 (5,3)	6 (16,6)	
	VEGFA (+)	6 (15,8)	3 (8,3)	0,150
	VEGFA (-)	30 (78,9)	26 (72,2)	
	Não avaliável	2 (5,3)	7 (19,4)	
	VEGFR (+)	26 (68,4)	19 (52,8)	0,442
	VEGFR (-)	11 (28,9)	14 (38,9)	
	Não avaliável	1 (2,6)	3 (8,3)	
FGF2 (+)	38 (100%)	36 (100%)	-	
FGFR2 (+)	31 (81,6)	21 (58,3)	0,93	
FGFR2 (-)	3 (7,9)	6 (16,7)		
Não avaliável	4 (10,5)	9 (25)		
Marcadores relacionados à inflamação	COX2 (+)	14 (36,8)	3 (8,3)	0,014
	COX2 (-)	21 (55,3)	28 (77,8)	
	Não avaliado	3 (7,9)	5 (13,9)	
	NOS2 (+)	15 (39,5)	21 (58,3)	0,018
	NOS2 (-)	21 (55,3)	9 (25)	
	Não avaliável	2 (5,3)	6 (16,7)	
	IL-1 β (+)	33 (86,8%)	26 (72,2)	0,361
	IL-1 β (-)	1 (2,6)	2 (5,6)	
	Não avaliável	4 (10,5)	8 (22,2)	
	TLR9 (+)	33 (86,8)	24 (66,7)	0,083
	TLR9 (-)	1 (2,6)	2 (5,6)	
	Não avaliável	4 (10,5)	10 (27,8)	

4.3 Fatores relacionados à proliferação celular

Foram analisados, por imunohistoquímica, sete marcadores relacionados à proliferação celular: fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRB), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA), receptor do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR2), fator de crescimento de fibroblasto (FGF) e o receptor 2 do fator de crescimento de fibroblasto (Tabela 5).

O fator de crescimento epidérmico (EGF) foi positivo em 44 (59,5%) amostras dos tumores triplo-negativos, sendo positivo em 25 (65,8%) casos de tumores TN basais e em 19 casos não-basais. Sua análise foi inconclusiva em 10 casos.

Foi encontrada positividade para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) em 48 (64,9%) das amostras de tumores triplo-negativos, sendo que este marcador se mostrou presente em 27 (71,1%) amostras de tumores basais, e em 21 (58,3%) amostras de câncer TN não-basal. Ao ser aplicado o teste exato de Fisher esta diferença se mostrou estatisticamente significativa, com $p = 0,014$. A análise deste marcador não foi possível em 7 amostras de tumores de mama TN não-basais.

Em relação ao receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA), este se mostrou presente em 59 (79,7%) amostras. Ao serem analisados os subgrupos, este marcador foi positivo em 35 (92,1%) casos de tumores basais e em 24 (66,7%) casos de tumores não basais, sendo negativo em apenas um tumor basal e em 10 tumores não-basais. Não foi possível sua avaliação em 4 casos (2 basais e 2 não-basais). Portanto, a expressão deste marcador, da mesma forma que

do seu ligante (PDGF), esteve associada com o perfil basal de forma estatisticamente significativa ($p = 0,004$) (tabela 5).

O receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRB) apresentou imunomarcacão em 27 (36,5%) das amostras, sendo que sua avaliao não foi possível em 7 amostras (2 basais e 5 não-basais). Nos tumores basais, a imunomarcacão foi positiva em 14 (36,8%) amostras, enquanto que nos não-basais, a imunomarcacão para o PDGFRB foi positiva em 13 (36,1%) amostras, sem associao com o fenótipo ($p=0,430$).

Nove (12,2%) amostras foram positivas para o fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA), sendo a marcao inconclusiva em 9 casos (2 tumores basais e 7 tumores não basais). Nos tumores basais, a imunomarcacão foi positiva em 6 (15,8%) e nos não-basais, o resultado da imunomarcacão foi considerada positiva em 3 casos (8,3%). Não houve associao entre este marcador e o fenótipo ao se comparar os subgrupos basais e não-basais, esta análise não apresentou significância estatística pelo teste de Fisher ($p = 0,150$) (tabela 5).

Foi encontrada imunomarcacão para o receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR2) em 45 (60,8%) amostras. Esta marcao foi positiva em 26 (68,4%) casos de tumores basais e em 19 (52,7%) amostras de TN não basais. A avaliao não foi possível em 3 casos, um do subgrupo de tumores basais e dois do subgrupo não basais. Também não apresentou associao com os fenótipos aqui estudados ($p = 0,442$), conforme apresentado na tabela 5.

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF2), se mostrou positivo em todos os casos analisados (74), tanto no subgrupo de TN basais, bem como no subgrupo de não-basais, vide tabela 5.

O receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR2), apresentou positividade à imunomarcação em 52 (70,3%) casos. No subgrupo basal foi positivo em 31 (81,6%) e, no subgrupo não-basal, apresentou imunomarcação em 21 (58,3%). A avaliação da imunomarcação do FGFR2 foi inconclusiva em 13 casos, sendo 6 dos basais e 7 dos TN não-basais. Ao submeter este resultado ao teste de Fisher, o mesmo não mostrou significância estatística ($p = 0,093$) (tabela 5).

Ao final da análise dos marcadores de proliferação celular, de forma a resumir este sub-item, o PDGF e a isoforma alfa de seu receptor, o PDGFRA, mostraram associação significativa com o fenótipo basal dos tumores triplo-negativos.

4.4 Marcadores relacionados à inflamação.

Foram realizados estudos por imunoistoquímica de quatro marcadores relacionados à inflamação: cicloxigenase 2 (COX2),  xido nítrico sintase (NOS2), interleucina 1-beta (IL-1B) e *Toll-like receptor* 9 (TLR9), e comparados entre os subgrupos de tumores basais e não-basais (Tabela 5).

A imunomarcação da enzima COX2 mostrou positividade em 17 (23%) amostras, sendo que 14 (36,8%) destas eram de tumores TN basais, e apenas 3 (8,3%) dos TN não-basais. Foi negativa em 21 amostras do subgrupo de TN basais e em 28 casos de amostras de TN não-basais. Esta diferenç  foi estatisticamente significativa com $p = 0,014$. Não foi possível a análise deste marcador em 3 amostras de TN basais e em 5 casos de TN não-basais.

A  xido nítrico sintase (NOS2) apresentou marcação por imunoistoquímica em 36 (48,6%) amostras. Ao analisar o subgrupo de tumores basais, 15 casos apresentaram positividade, o que correspondeu a 39,5% versus 21 (58,3%) dos

tumores não-basais. Esta diferença, aparentemente pequena, se associou significativamente ($p = 0,018$) com o fenótipo não-basal. Sua análise foi inconclusiva em 8 amostras.

A avaliação da imunomarcacão de Interleucina-1 beta (IL1 B) se mostrou positiva em um número importante (59) das amostras (79,7%) de tumores triplo-negativos, o que contrasta com 3 (4,1%) que foram negativos. Sua avaliação foi inconclusiva em 12 casos (16,2%), sendo 4 de tumores basais e 8 do subgrupo não-basal. Ao analisar o subgrupo de tumores basais, a marcação para IL1 B ocorreu em 33, o que correspondeu a 86,8% deste subgrupo, sendo negativa em apenas 1 caso. Ao analisar o subgrupo de tumores não-basais a IL1 B foi também positiva em 26 casos (72,2%), e negativa em apenas 2 casos. Não se evidenciou associaçã de IL1B com nenhum dos fenótipos (basal x não-basal) com $p = 0.361$.

O *Toll-like receptor 9* (TLR9) apresentou positividade à análise imunoistoquímica em 57 amostras, o que correspondeu a 77% dos tumores TN. A avaliação deste marcador foi inconclusiva em 14 casos (18,9%), sendo 4 do subgrupo de tumores basais e 10 do subgrupo de tumores não-basais. Quando analisado o subgrupo de tumores TN basais, a marcação de TLR9 foi positiva em 33 (86,8%) casos, e negativa em apenas um caso. Ao ser analisado o subgrupo de tumores TN não-basais, 24 amostras apresentaram marcação para TLR9, correspondendo a 66,7%, sendo negativa em apenas 2 casos, sem diferença entre os subgrupos ($p = 0,083$).

De forma sintética dos marcadores relacionados à inflamação, foi encontrada associaçã estatística da COX2 com o perfil basal, enquanto que a NOS2 mostrou associaçã estatística com o perfil não-basal.

4.5 Análise de dados demográficos.

Foi realizada análise retrospectiva de prontuários referentes às amostras de carcinoma de mama triplo-negativos constantes no TMA, quanto aos dados demográficos, clínicos e patológicos das pacientes (tabelas 1, 3 e 4), conforme modelo de ficha apresentada em anexo (anexo I).

A idade das pacientes estudadas variou de 27 a 95 anos, com média de 59,9 anos e mediana de 57 anos, como já mostrado na tabela 1. No subgrupo de tumores basais, a idade média foi de 57,4 anos e a mediana de 58,5 anos, enquanto que no subgrupo não-basal, a idade média e mediana foram, respectivamente, 54,9 e 49 anos de idade.

Os extremos de idade foram semelhantes nos dois subgrupos, no que se refere aos tumores basais e não-basais, conforme demonstrada nas tabelas 1 e 3, bem como as faixas etárias.

Ao ser analisado o subgrupo de tumores basais, 23 mulheres eram pardas, correspondendo a 60,5%, as demais (15) eram brancas, o que correspondeu a 39,5%. No subgrupo de portadoras de tumores TN não-basais, a cor parda foi registrada em 20 (55,6%) prontuários, as demais 16 (44,4%) eram brancas, sem diferença estatística entre os subgrupos ($p = 0,814$).

A análise da presença de história familiar para câncer de mama ou ovário foi relatada em 65 prontuários, destes, 30 casos de pacientes portadoras de câncer de mama triplo negativo apresentavam familiares portadores de neoplasia de mama e/ou ovário, o que correspondeu a 46,2%. Ao ser estudado o subgrupo de mulheres portadoras de tumores TN basais, a ocorrência de histórico familiar para câncer de

mama e/ou ovário foi relatada em 15 casos, o que correspondeu a 45,5%; já no subgrupo de mulheres portadoras de tumores TN não-basais foram encontrados relatos de 15 (46,9%) pacientes com parentes portadoras de câncer de mama ou ovário, sem diferença significativa entre os subgrupos ($p = 0,553$), vide tabelas 1 e 3.

Nas pacientes que apresentaram positividade para história familiar de neoplasia, foi estudada a localização desta neoplasia, sendo relatados 28 casos de pacientes portadores de tumores TN e história familiar para câncer de mama, o que correspondeu a 93,3%, e apenas dois casos de associação de tumor de mama TN com familiares portadores de neoplasia ovariana. Ao serem estudados e comparados os dois subgrupos (basais x não-basais) os resultados foram idênticos, com 14 casos de neoplasia mamária e um caso de câncer de ovário, em cada subgrupo ($p = 0,759$).

Quanto ao grau de parentesco do familiar acometido de neoplasia, no subgrupo de tumores basais foi encontrado relato de 11 casos de familiar de primeiro grau e no subgrupo não-basal foram encontrados 9 casos. Ao analisarmos a presença de familiares de segundo grau, foram encontrados 3 casos no subgrupo basal e cinco no subgrupo não-basal, e ainda um caso em cada subgrupo de paciente com familiar de primeiro e segundo grau ($p = 0,833$).

Ao ser avaliado o tipo histológico desta amostragem, o carcinoma ductal infiltrante foi encontrado em grande percentual dos casos de tumores triplo-negativos, 62/74 (85%) amostras, sendo 33 do subgrupo basal e 29 do subgrupo não-basal, correspondendo a 86,8% e 80,6%. O carcinoma medular foi encontrado em duas pacientes de cada subgrupo. A associação de carcinoma ductal e lobular foi encontrado em uma paciente de cada subgrupo. O carcinoma indiferenciado foi diagnosticado em apenas uma paciente portadora de tumor de mama triplo-negativo basal e em 3 do subgrupo não-basal, foi ainda diagnosticado um caso de carcinoma inflamatório em cada subgrupo.

Tabela 6 – Características patológicas e de tratamento das pacientes de toda a amostra e seus tumores agrupadas quanto ao fenótipo basal ou não-basal.

Características	Categorias	Basais (%) N=38	Não-basais (%) N=36	P
Tipo histológico	Ductal infiltrante (CDI)	33 (86,8)	29 (80,6)	1,0
	Medular	2 (5,3)	2 (5,6)	
	CDI + Medular	1 (2,6)	1 (2,8)	
	Indiferenciado	1 (2,6)	3 (8,3)	
	Inflamatório	1 (2,6)	1 (2,8)	
Grau histológico (SBR)	1	0 (0)	3 (8,3)	0,054
	2	12 (31,6)	11 (30,5)	
	3	10 (26,3)	9 (25)	
	Sem informação	16 (42,1)	13 (36,1)	
	Grau nuclear	GN 1	1 (5,3)	
GN 2	13 (34,2)	15 (41,7)		
GN 3	14 (36,8)	7 (19,4)		
Sem informação	10 (26,3)	12 (33,3)		
Infiltração linfática	Presente	17 (44,7)	12 (33,3)	0,574
	Ausente	2 (5,3)	2 (5,5)	
	Sem informação	19 (50,0)	22 (61,6)	
Infiltração vascular	Presente	9 (27,3)	6 (16,7)	0,704
	Ausente	2 (5,3)	2 (5,5)	
	Sem informação	27 (71,0)	28 (77,8)	
Estadiamento clínico	I	2 (5,3)	2 (5,5)	0,175
	IIA	12 (31,6)	8 (22,2)	
	IIB	6 (15,8)	12 (33,3)	
	IIIA	0 (0)	4 (11,1)	
	IIIB	14 (36,8)	6 (16,6)	
	IV	3 (7,9)	2 (5,5)	
Estadiamento patológico*	I	3 (7,9)	2 (5,5)	0,08
	IIA	10 (26,3)	10 (27,8)	
	IIB	5 (13,1)	10 (27,8)	
	IIIA	2 (5,3)	4 (11,1)	
	IIIB	6 (15,8)	4 (11,1)	
	IV	6 (15,8)	0	
Tratamento cirúrgico*	Sem informação	6 (15,8)	8 (22,2)	0,387
	Sim	33 (86,8)	33 (91,7)	
Tipo de cirurgia*	Não	3 (13,2)	3 (8,3)	0,303
	Mastectomia radical	26 (78,8)	30 (90,9)	
	Cirurgia Conservadora	6 (18,2)	3 (9,1)	
	Mastectomia. Subcutânea	1 (3)	0 (0)	
Linfadenectomia axilar*	Não realizada	5	3	0,187
	Sim	29 (87,9)	31 (93,4)	
	Não	4 (12,1)	2 (6,6)	

*para estas frequências foram calculadas apenas para os tumores operados.

O grau histológico foi analisado seguindo os critérios de Scarff, Bloom e Richardson (SBR) em 45 (60,8%) das 74 amostras de tumores de mama triplo-negativos. Com maior frequência, foi encontrado SBR2 em 23 (51,1%) amostras, seguido de SBR-3 em 18 amostras (40%). Ao ser analisado o subgrupo de tumores

basais, não foi encontrado nenhum caso de de SBR-1, foram classificados 12 (31,6%) casos como SBR2 e 10 (26,3%) foram classificados como SBR3. No subgrupo de tumores não-basais foram classificados 3 (8,3%) como SBR1, 11 (30,5%) como SBR2, e 9 casos (36,1%) como SBR3 ($p=0,054$), vide tabela 6.

Também foi realizado análise comparativa dos dois subgrupos após agrupamento dos tumores mais diferenciados, ou seja SBR1 e SBR2, correspondendo a 12 casos de TN basais e 14 de não-basais, e dos tumores menos diferenciados (SBR3), correspondendo a 10 pacientes do subgrupo de TN basal e em 9 de não-basais, contudo, também sem evidenciar diferença significativa ($p = 0,309$).

Ao ser estudado o grau nuclear (GN) dos tumores triplo-negativos, a maioria dos tumores avaliados foram classificados como GN2, correspondendo à metade dos casos. A informação sobre o GN não estava disponível em 29,7% dos casos. Ao avaliar o GN entre os subgrupos de tumores basais e não-basais, foram encontrados com maior frequência os tumores com GN2 correspondendo a 13 (34,2%) casos no subgrupo basal e 15 (41,7%) casos no subgrupo de tumores não-basais, já o GN3 foi encontrado em 14 casos (36,8%) dos tumores basais e em 7 (19,4%) dos tumores não-basais. O grau nuclear 1 foi descrito em apenas um caso do subgrupo de tumores basais e em 6 casos de tumores não-basais. Houve associação entre o fenótipo basal e um maior grau nuclear ($p=0,049$).

Foi estudada, outrossim, a frequência da infiltração linfática, para qual constava avaliação em apenas 33 laudos histopatológicos, estando presente em 29 casos (87,9%) destes tumores. Foi encontrada infiltração linfática em 17 (44,7%) casos de tumores basais e em 12 (33,3%) das amostras de tumores não-basais ($p = 0, 574$).

Também foi pesquisada nos prontuários das pacientes e seus laudos histopatológicos a presença de invasão vascular, sobre a qual havia relato em 20 (27%) registros, e esteve presente em 15 casos, 75% da amostra disponível para análise, distribuindo-se da seguinte maneira: 9 de 12 tumores basais e 6 de 8 tumores não-basais ($p = 0,704$).

O estadiamento (EC) foi avaliado em 71 pacientes, conforme se encontra detalhado nas tabelas 1 e 3, mas não apresentou associação com o fenótipo ($p = 0,175$).

Também foi realizada análise do impacto do estadiamento, agrupando-se os casos em três grupos, o primeiro grupo sendo formado por casos com doença inicial (EC I e II), o segundo grupo formado por tumores localmente avançados (EC III), e o terceiro grupo constituído de pacientes portadoras de doença disseminada (EC IV), mas aqui também não se mostrou associação com o fenótipo ($p=0,801$).

Nos tumores analisados o estadiamento patológico mais encontrado foi o IIA em 20 (32,3%). No subgrupo referente aos tumores basais, o estadiamento patológico encontrado com maior frequência também foi o IIA com 10 (31,3%) casos. No subgrupo de tumores não-basais, os estadiamentos patológicos encontrados com maior frequência foram o IIA e IIB, com dez (33,3%) casos de cada estadiamento ($p = 0,08$).

A amostra de pacientes foi avaliada quanto à modalidade terapêutica à qual foram submetidas, como cirurgia, quimioterapia ou radioterapia. Nas pacientes submetidas a tratamento cirúrgico, foi estudado o tipo de cirurgia e sua extensão. 56 (84,8%) foram submetidas à mastectomia radical, 9 (13,6%) à cirurgia conservadora e apenas uma submetida à mastectomia subcutânea. Das 33 pacientes portadoras de tumores basais, 26 (78,8%) foram submetidas à mastectomia radical, seis

(18,2%) foram submetidas à cirurgia conservadora, e apenas 1 (3%) foi submetida à mastectomia subcutânea. No subgrupo de tumores não-basais, 30 (90,9%) pacientes foram submetidas à mastectomia radical, e 3 (9,1%) foram submetidas à cirurgia conservadora. Comparando-se os dois subgrupos não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,303$).

Foi avaliada a realização do esvaziamento axilar quando do tratamento cirúrgico nos dois subgrupos. A maioria das pacientes operadas, 60 (92,3%), realizou linfadenectomia. No subgrupo basal, 29 (87,9%) pacientes foram submetidas à linfadenectomia axilar. No subgrupo de pacientes com tumores não-basais, 31 (92,3%) foram submetidas ao esvaziamento axilar ($p = 0,187$).

A biópsia de linfonodo sentinela (BLS) foi realizada em apenas 8 (12,1%) das pacientes portadoras de TN, sendo 5 (15,2%) do subgrupo basal e 3 (9,1%) do subgrupo não-basal ($p = 0,354$). O resultado da biópsia de linfonodo sentinela (BLS), naqueles 8 casos submetidas a este método de avaliação da axila, foi positivo em 2 (25%). No subgrupo basal, uma (20%) dentre cinco pacientes apresentou biópsia positiva do linfonodo sentinela axilar. No subgrupo de tumores não-basais, 1 (33,3%) dentre três avaliadas apresentou comprometimento do linfonodo sentinela axilar ($p = 0,643$).

A utilização de tratamento quimioterápico de forma neoadjuvante (QTneo) foi avaliada, sendo utilizada em 23 (31,1%) pacientes com TN. No subgrupo de tumores basais foi administrada a QTneo em 10 (26,3%) pacientes. No subgrupo de tumores não-basais, foi prescrita a 13 pacientes (36,1%). Ao ser realizado teste de Fisher, não foi encontrada diferença significativa ($p = 0,255$) (tabela 1).

Foram utilizados diversos protocolos de quimioterapia neoadjuvante, em especial utilizando antracíclicos e taxanos. O esquema mais utilizado nos dois

subgrupos foi AC, combinação de ciclofosfamida e doxorubicina, o qual foi aplicado a 3 pacientes do subgrupo basal e 5 do subgrupo não-basal. O segundo protocolo mais utilizado foi o AC-T, o qual acrescenta o paclitaxel ao AC (três pacientes em cada subgrupo). Contudo não houve associação entre o tipo de QTneo e os subgrupos ($p = 0.939$).

A resposta clínica ao tratamento neoadjuvante foi avaliada em 22 pacientes, utilizando-se os seguintes parâmetros: resposta objetiva parcial (redução de diâmetro tumoral superior a 30%), resposta objetiva completa (ausência de tumor detectável por exame clínico e métodos de imagem), doença estável e progressão. Os resultados dos subgrupos basais e não-basais encontram-se na tabela 6. Ao se comparar o nível de resposta clínica à QTneo e entre os subgrupos (basal x não-basal), não foi encontrada significância estatística ao teste de Fisher ($= 0,303$), vide tabela 7.

A resposta patológica após QTneo foi avaliada utilizando quatro critérios: resposta patológica completa, resposta patológica parcial, presença apenas de carcinoma *in situ* na peça tumoral, ou ausência de resposta. Não foi encontrado nenhum caso com relato de histopatológico que constasse apenas carcinoma *in situ*. A resposta patológica completa foi encontrada em apenas um caso pertencente ao subgrupo de pacientes portadores de tumores não-basais. Nenhuma paciente do subgrupo basal apresentou resposta patológica completa. Seis (66,7%) pacientes do subgrupo basal apresentaram resposta patológica parcial, enquanto que no subgrupo de pacientes com tumores não-basais foram 10 (83,3%) pacientes. Ao ser avaliada a ausência de resposta patológica à QTneo foi encontrado 3 (33,4%) casos no subgrupo de pacientes com tumores basais, e apenas um (8,3%) caso do subgrupo de paciente com tumores não-basais (tabela 8) ($p = 0,272$).

Tabela 7 – Avaliação da resposta clínica ao tratamento neoadjuvante de pacientes portadores de tumores triplo-negativos de mama, comparando os perfis basal e não-basal.

Características	Categorias	Basais (%)	Não-basais (%)	p
		N=8	N=12	
Resposta Clínica	Completa	0	3 (25)	0,297
	Objetiva parcial	4 (40)	6 (50)	
	Estável	3 (30)	1 (8,3)	
	Progressão	3 (30)	2 (16,7)	
	*Resposta parcial e completa	4 (40)	9 (75)	

Quanto à quimioterapia com intuito adjuvante, a mesma foi realizada em 48 (64,9%) pacientes. No subgrupo referente às pacientes portadoras de tumores basais, 23 (60,5%) receberam quimioterapia adjuvante, enquanto no subgrupo de pacientes portadoras de tumores não-basais, 25 (69,4%) realizaram tratamento quimioterápico com finalidade adjuvante ($p= 0,288$).

Foram analisados os esquemas de quimioterapia utilizados com a finalidade adjuvante, comparando-se os dois subgrupos. O protocolo mais utilizado em cada subgrupo (9/23, correspondendo a 39,1% no subgrupo basal e 11/24, correspondendo a 45,8% no subgrupo não-basal), bem como no grupo de pacientes triplo-negativo foi o CMF – ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracil, o qual foi utilizado em 20 (42,6%) pacientes. O segundo protocolo mais utilizado foi o AC, o qual foi administrado a 9 (19,1%), sendo 6 (26,1%) do subgrupo basal e 9 (19,1%) do subgrupo não-basal. Foram ainda utilizadas outras 8 combinações de drogas quimioterápicas com finalidade adjuvante. A análise da frequência dos esquemas de

quimioterapia adjuvante entre os dois subgrupos não apresentou significância estatística ($p = 0,520$).

Tabela 8 – Resposta patológica ao tratamento neoadjuvantes de pacientes portadores de tumores triplo-negativos de mama, submetidas a quimioterapia neoadjuvante comparando os perfis basal e não-basal.

Características	Categorias	Basais (%) N=9	Não-basais (%) N=12	P
Resposta patológica	Completa	0	1 (8,3%)	0,272
	Parcial	6 (66,7)	10 (83,3%)	
	Ausência de resposta	3 (33,3)	1 (8,3%)	

A radioterapia externa pós-operatória foi realizada em 54 (77,1%) das pacientes. No subgrupo de pacientes portadores de tumores basais 24 (66,7%) pacientes foram submetidas à radioterapia, enquanto que no subgrupo não-basal, 30 (88,2%) receberam tratamento radioterápico, não tendo sido encontrada diferença estatística entre dos subgrupos.

A evolução das pacientes foi estudada levando-se em consideração, as seguintes variáveis: ausência de doença, presença de recidiva loco-regional, presença de recidiva sistêmica, ou ainda, ausência de dados em registros de prontuário. A ausência de doença em atividade foi observada em 39 (58,2%) das pacientes, sendo 15 (46,9%) pacientes do subgrupo basal, enquanto no subgrupo não-basal não foi observada doença em atividade em 24 pacientes (68,6%). Recidiva loco-regional foi registrada em 7 (10,4%) pacientes, sendo 5 (15,6%) do subgrupo basal e 2 (5,7%) do subgrupo não-basal. Foi encontrado relato de recidiva

sistêmica em 19 pacientes, sendo 11 (34,4%) no subgrupo basal e 8 (22,9%) no subgrupo não-basal, sem diferença entre os subgrupos para todas as variáveis acima ($p= 0,244$).

Foram avaliadas as localizações das recidivas, de forma isolada, os sítios mais frequentes de metástases foram: pleuro-pulmonar com 6 seis casos, sendo 4 no subgrupo basal e 2 no subgrupo não-basal, e 3 casos de metástases ósseas, sendo um caso no subgrupo basal e dois casos no subgrupo não-basal. Foram encontrados cinco relatos de metástase cerebral nos prontuários, sendo dois no subgrupo basal e três no subgrupo não-basal. Foram encontradas diversas combinações de sítios metastáticos, sendo a mais freqüente, a associação de metástase pleuro-pulmonar e óssea, com 4 casos, dois em cada subgrupo. Não houve associação significativa do sítio de metástase com os subgrupos ($p = 0,598$).

Na análise da associação entre os subtipos basal e não-basal com a ocorrência de metástase cerebral ou de outros sítios de metástases, bem como de recidiva loco-regional, não se evidenciou associação estatística destas com os fenótipos basal e não-basal ($p = 0,218$), conforme demonstrada na tabela 9.

Tabela 9 – Análise do padrão de recidiva nos tumores mamários triplo-negativos e nos subgrupos basal e não-basal.

Característica	Categoria	Basal	Não-basal	Total
Recidiva	Loco-regional	4 (25%)	0	4 (14,8%)
	Sistêmica não-cerebral	10 (62,5%)	8 (72,7%)	18 (66,7%)
	Cerebral	2 (12,5%)	3 (27,3%)	5 (18,5%)
Total		16 (100%)	11 (100%)	27 (100%)

O seguimento mediano da população foi de 44,6 meses (95%IC [36,5; 32,7]). Quando do encerramento do estudo, ao se analisar o status final das pacientes, encontravam-se vivas sem evidência de doença em atividade 23 (31,1%), sendo 10 (26,3%) do subgrupo basal e 13 (36,1%) do subgrupo não-basal. Quatro pacientes, duas de cada subgrupo (5,3% e 5,6% respectivamente), encontravam-se vivas com doença em atividade. Havia descrição de óbito por câncer em 12 prontuários (16,2%), sendo 8 (21,1%) do subgrupo basal e 4 (11,1%) do subgrupo não-basal. Trinta e cinco (47,3%) pacientes foram considerados como perda de seguimento, sendo 18 (47,4%) do subgrupo basal e 17 (47,2%) do subgrupo não-basal, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,616$).

Vinte e quatro pacientes apresentaram recidivas, sendo 15 no subgrupo basal e 9 no subgrupo não-basal. O ILD das pacientes portadoras de tumores triplo-negativos foi em média 22,9 meses com IC95% [16,2; 29,5] e mediana 20,3 meses. Para o subgrupo basal, o intervalo livre de doença foi de 20,4 meses em média com IC95% [10,9; 30,0] e mediana de 15,0 meses. Para o subgrupo não-basal o ILD foi de 27,0 meses em média IC95% [17,2; 36,8] e mediana de 26,7 meses (gráfico 1), sem diferença estatisticamente significativa entre as médias de ILD ($p=0,174$).

As pacientes portadoras de tumores triplo-negativos apresentaram sobrevida média de 44,6 meses IC95% [36,5; 52,7] e mediana de 38,0 meses. O subgrupo basal apresentou sobrevida média de 42,0 meses IC95% [30,5; 53,5] e mediana de 36,0 meses. Já o subgrupo não-basal teve sobrevida média de 47,3 meses IC95% [35,3; 59,2] e mediana de 39,0 meses. Apesar da aparente maior sobrevida do subgrupo não-basal, não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as médias dos dois subgrupos, basal e não-basal ($p=0,176$) (gráfico 1).

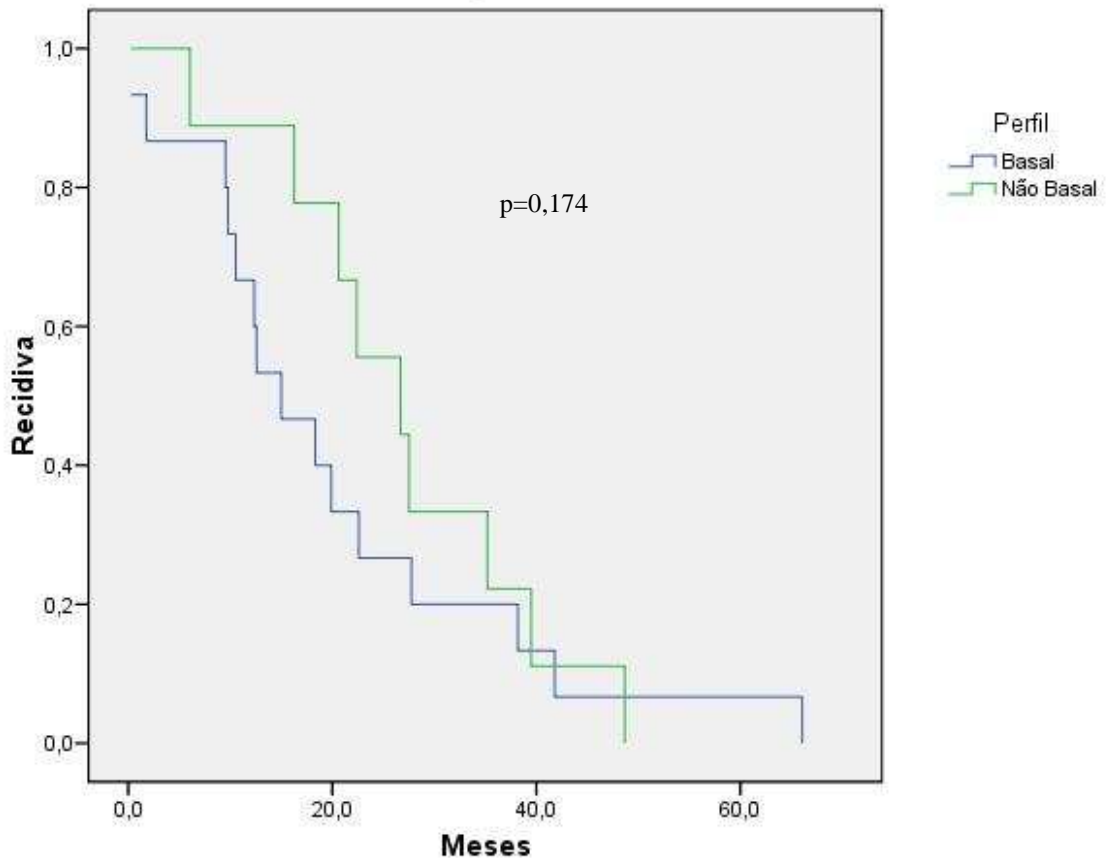


Gráfico 1 – Sobrevida livre de doença de pacientes portadoras de tumores basais e não-basais. A sobrevida foi medida do término do tratamento inicial até o surgimento da primeira recidiva (intervalo livre de doença) e as curvas calculadas pelo método de Kaplan-Meier.

Após ajuste por idade (até 50 anos inclusive e aquelas com idade superior a 50 anos), quando se ordenou o subgrupo de mulheres menores de 50 anos foi detectada diferença estatisticamente significativa quanto à curva de sobrevida global entre os subgrupos basal e não-basal, com pior sobrevida das pacientes portadoras de tumores basais (gráfico 2). Por outro lado não foi encontrada significância estatística ao se comparar a sobrevida dos grupos basal e não-basal pelas curvas de Kaplan-Meier, no subgrupo das pacientes com idade superior a 50 (gráfico 3).

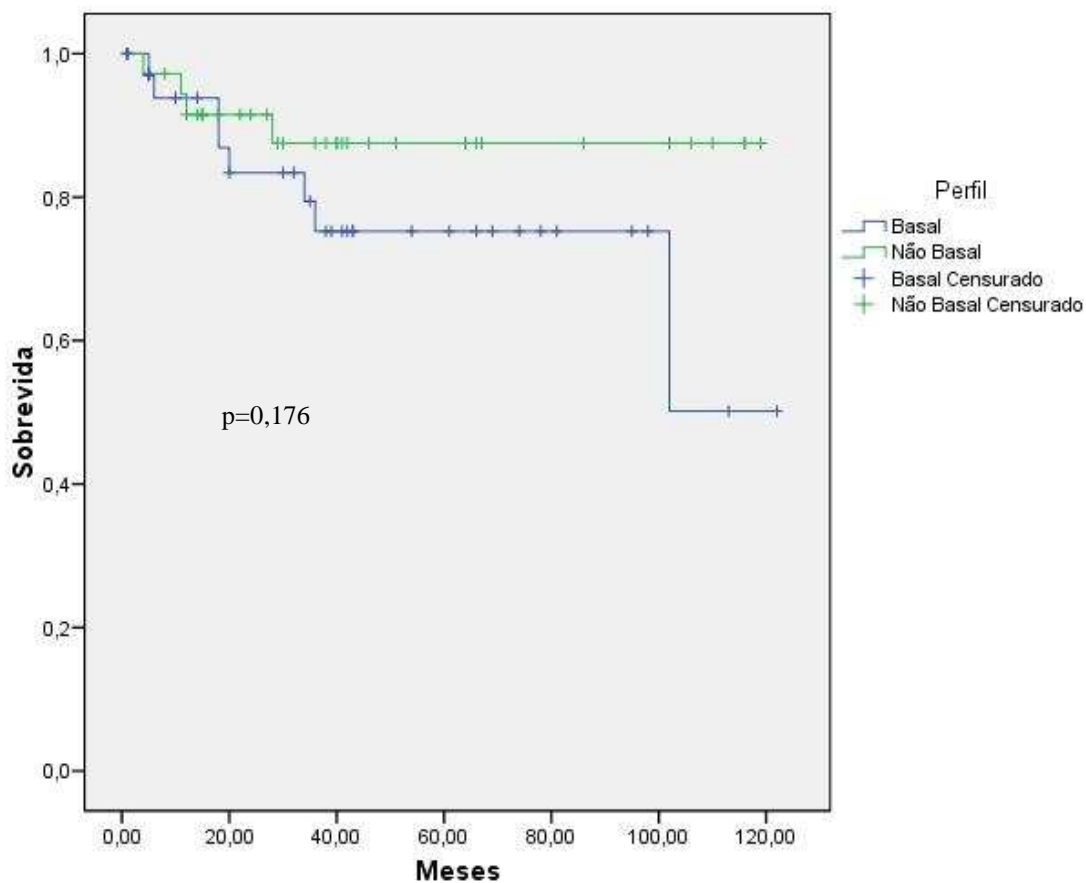


Gráfico 2 – Sobrevida global das pacientes portadoras de tumores de mama triplo-negativo comparando os subgrupos basal e não-basal. A sobrevida foi medida da data do diagnóstico até a morte por qualquer causa e as curvas calculadas pelo método de Kaplan-Meier.

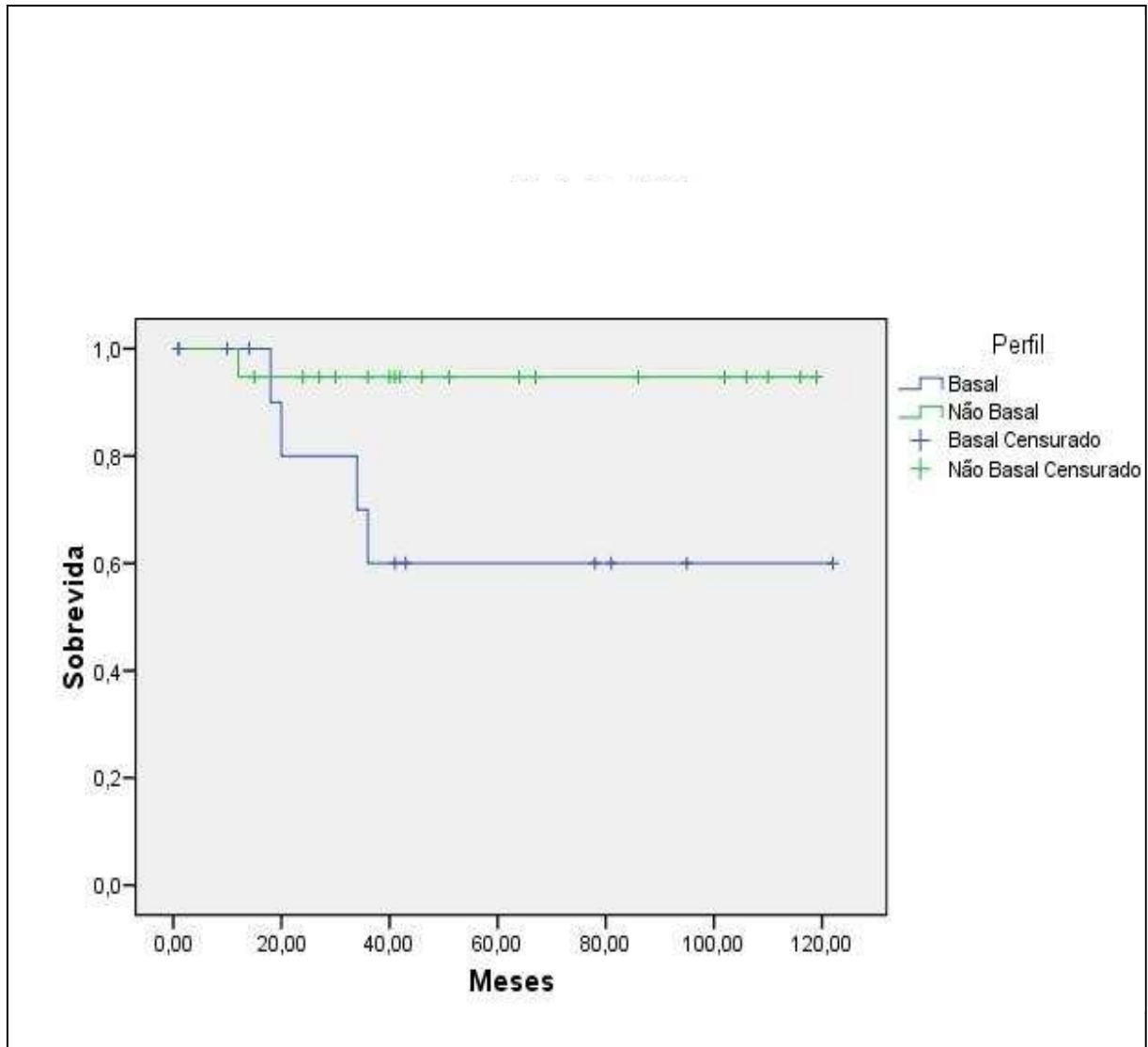


Gráfico 3 – Sobrevida global das pacientes portadoras de tumores triplo-negativos, comparando os subgrupos basal e não-basal, em paciente com idade inferior a 50 anos. A sobrevivida foi medida da data do diagnóstico até a morte por qualquer causa. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank.

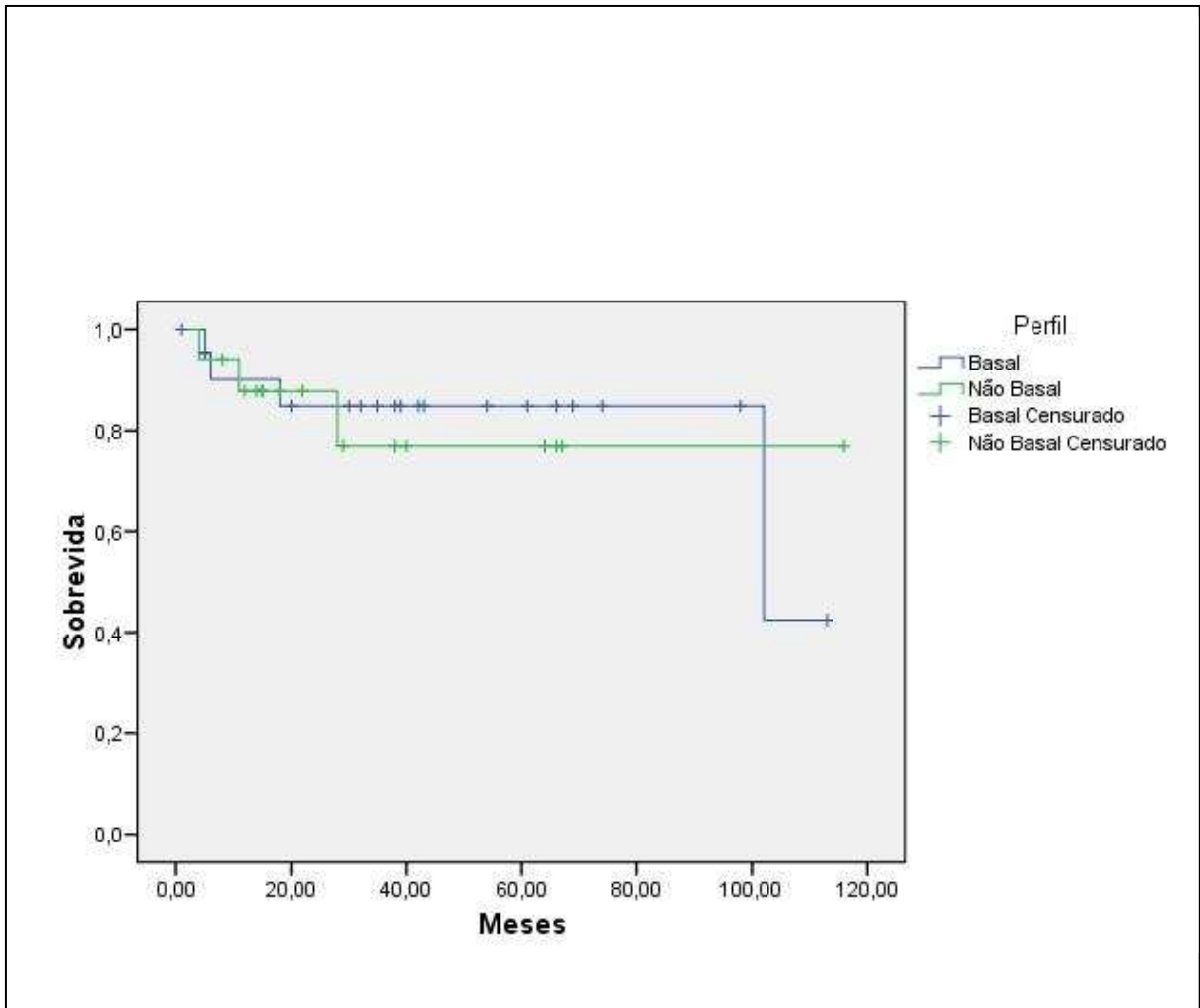


Gráfico 4 – Sobrevida das pacientes portadoras de tumores triplo-negativos com idade superior 50 anos de idade, comparando os subgrupos basal e não-basal. A sobrevida foi medida da data do diagnóstico até a morte por qualquer causa. As curvas foram calculadas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas pelo método de log-rank.

A sobrevida global considerando toda a população de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos foi pior para quem tinha estadiamento clínico mais avançado ($p < 0,001$), tumores maiores ($p < 0,001$), comprometimento axilar clínico ($p = 0,005$), presença de metástases ao diagnóstico ($p < 0,001$), estadiamento patológico agrupado (doença precoce x localmente avançada, $p < 0,001$), estadiamento T patológico ($p = 0,002$), pacientes não operadas ($p < 0,001$), pacientes submetidas à cirurgia conservadora ($p = 0,024$), pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante ($p = 0,002$), ausência de resposta clínica ($p = 0,003$), não realização de quimioterapia adjuvante ($p < 0,001$), evolução clínica (ausência de

recidiva x recidiva loco-regional x recidiva sistêmica, $p < 0,001$), expressão de EGF no tumor ($p = 0,042$) e de PGFRA ($p = 0,036$).

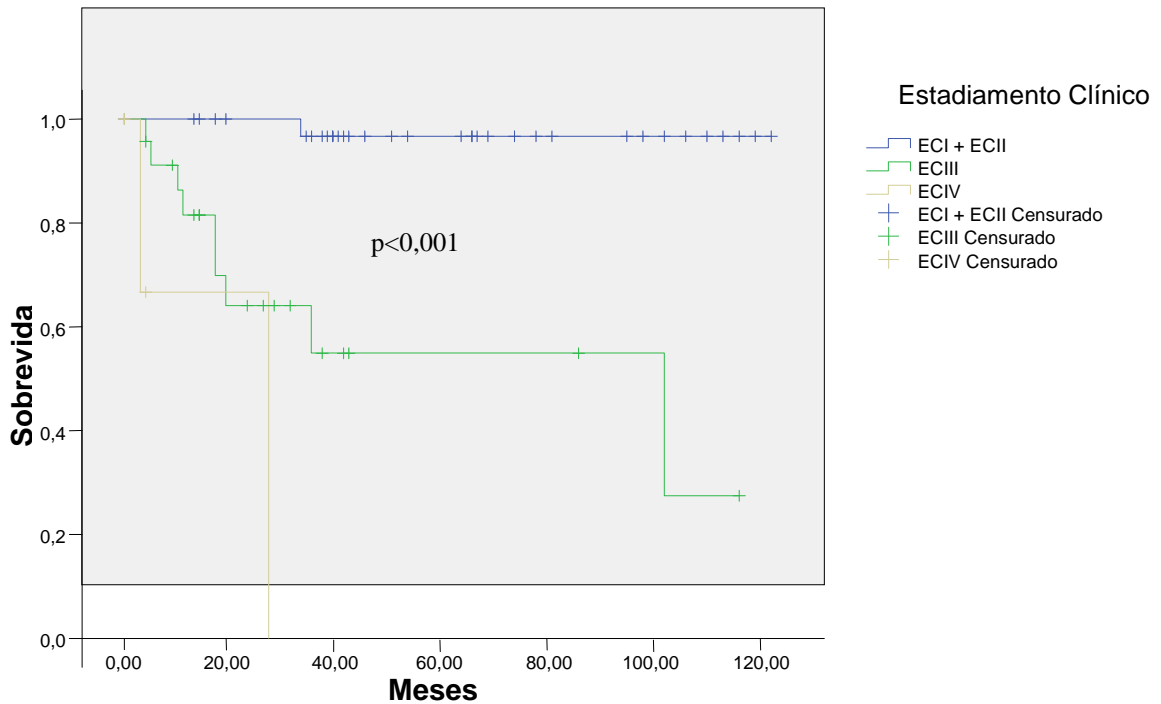


Gráfico 5 – Impacto do estadiamento clínico agrupado ([EC1+EC2] x [ECIII + ECIV]), na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

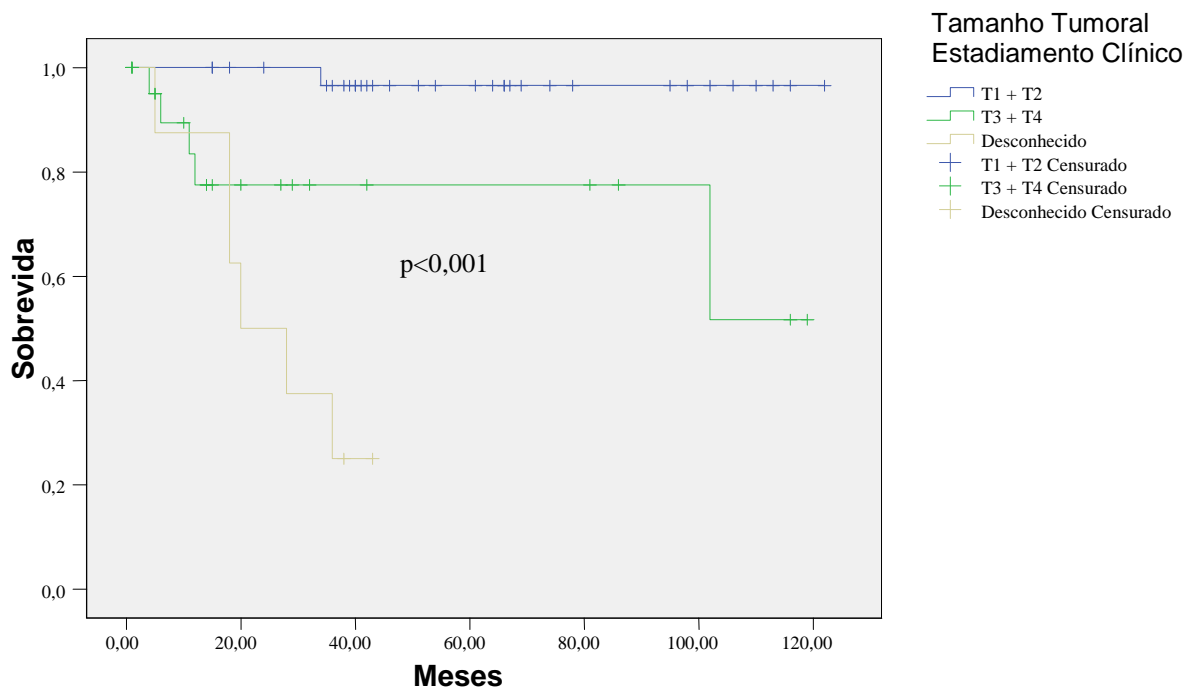


Gráfico 6 – Impacto do tamanho do tumor agrupado ([T1+T2] x [T3 +T4]), na sobrevida global da pacientes portadores de tumores mamários triplo-negativos.

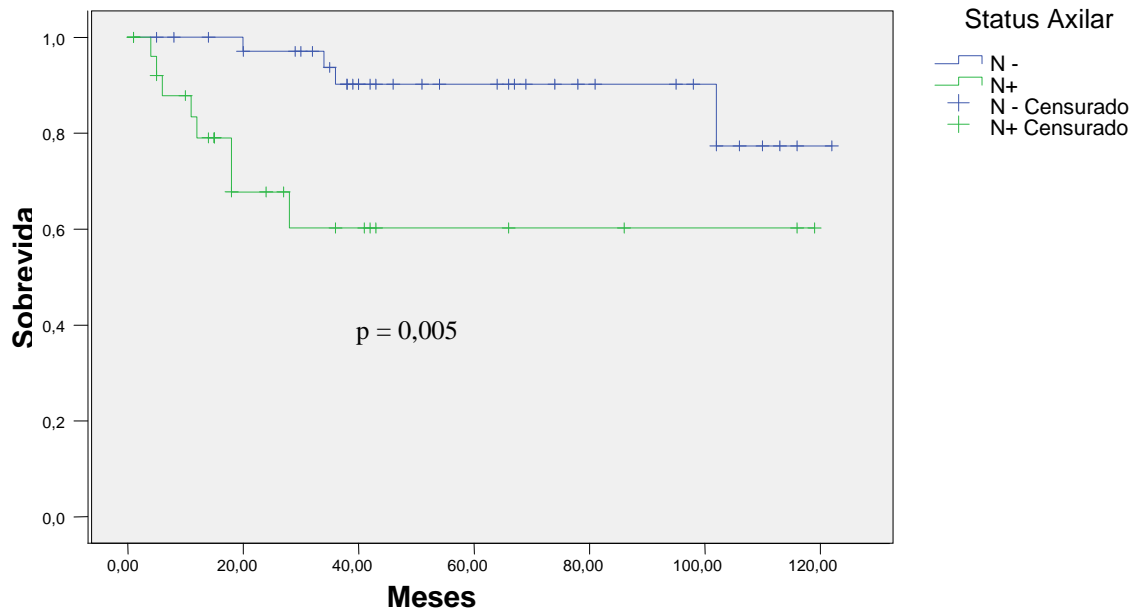


Gráfico 7 – Impacto do status axilar ([N-] x [N+]), na sobrevivida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

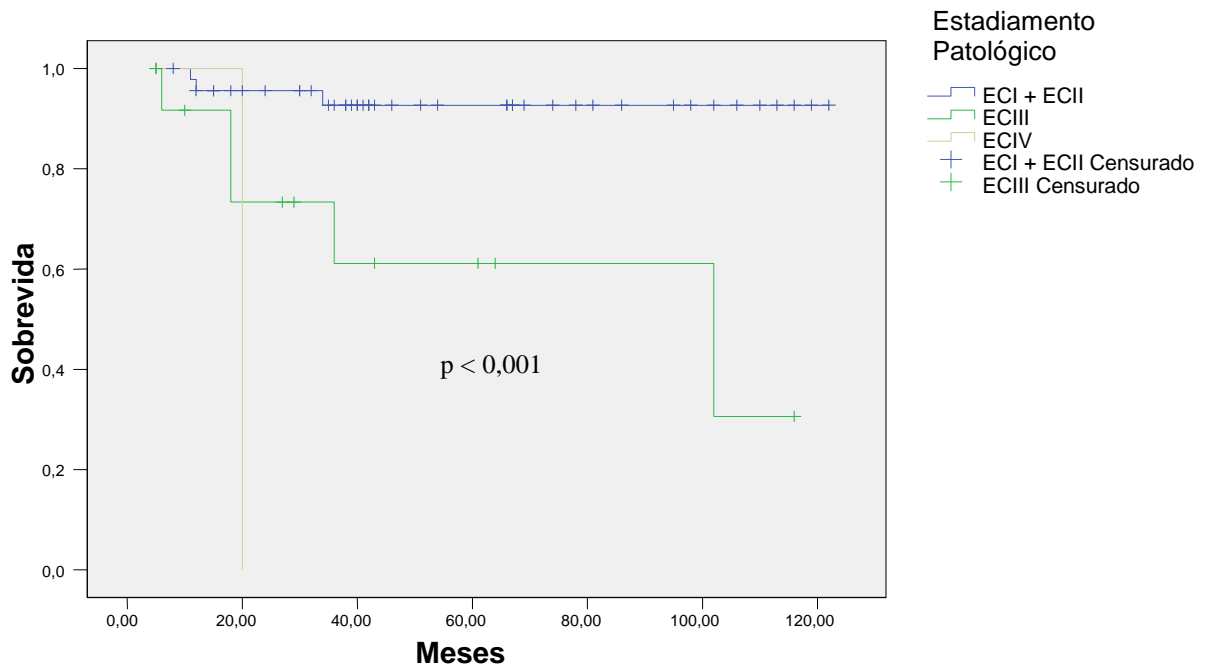


Gráfico 8 – Impacto do estadiamento patológico agrupado ([EP1+EP2] x EP3), na sobrevivida global da pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

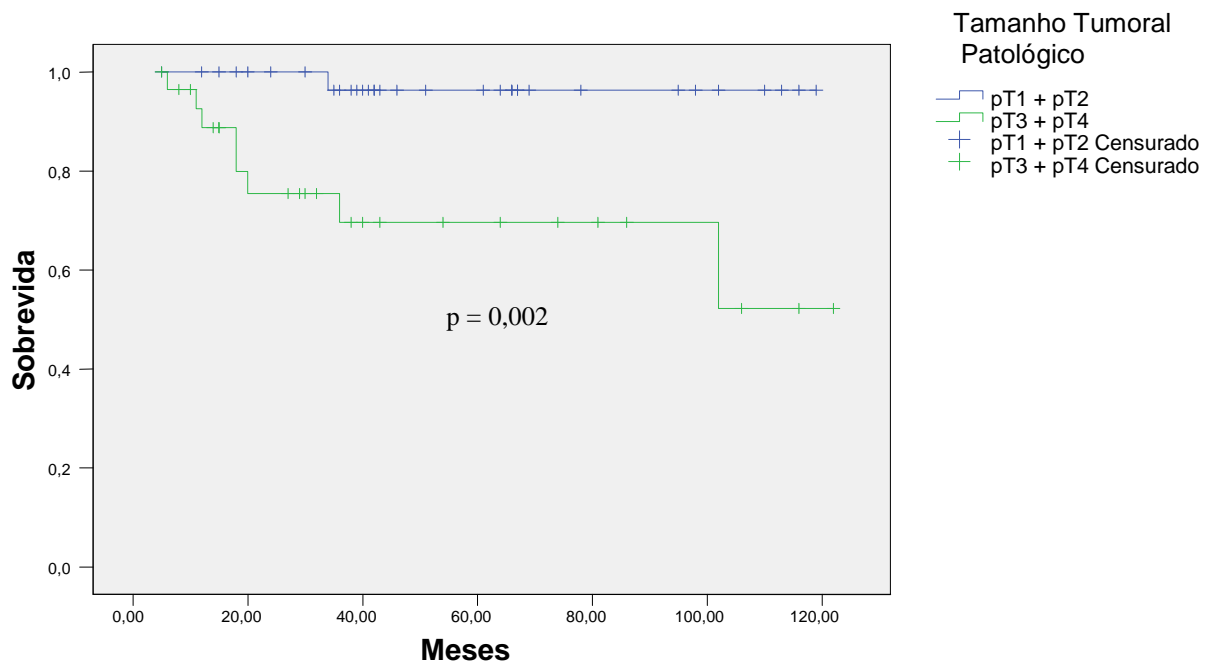


Gráfico 9 – Impacto do tamanho tumoral patológico agrupado ([pT1 + pT2] x [pT3 + pT4]), na sobrevivida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

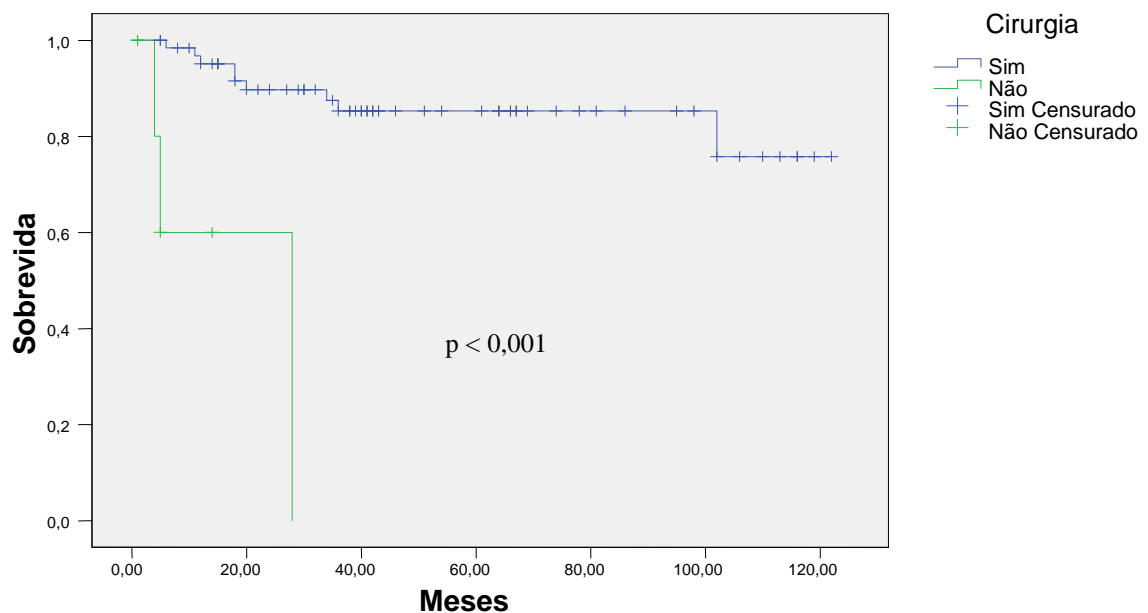


Gráfico 10 – Impacto da realização cirurgia na sobrevivida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

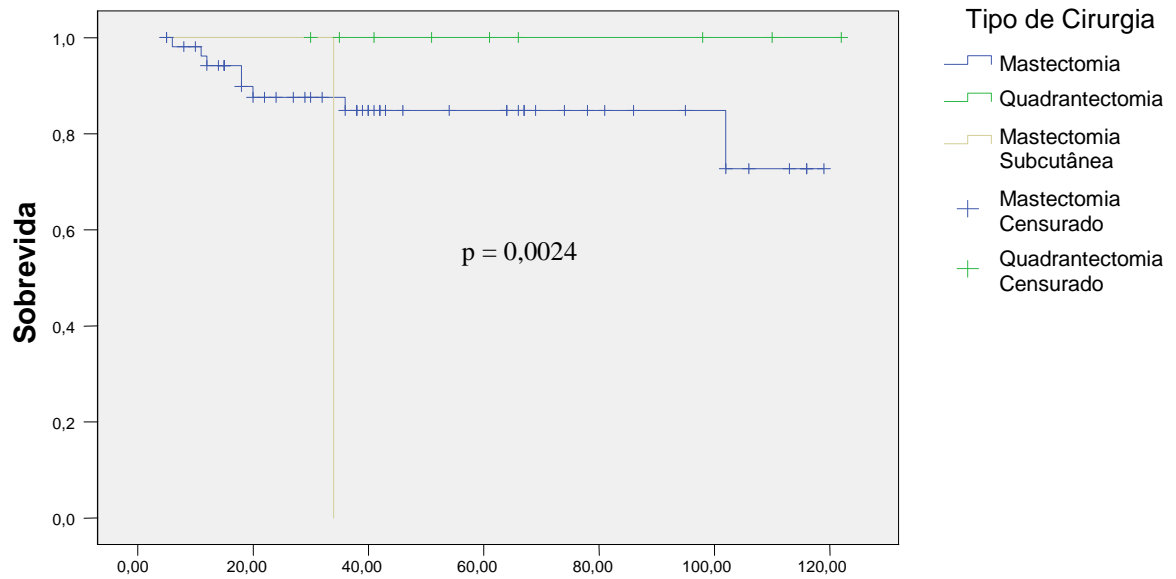


Gráfico 11 – Impacto do tipo de cirurgia, (mastectomia x cirurgia conservadora), na sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

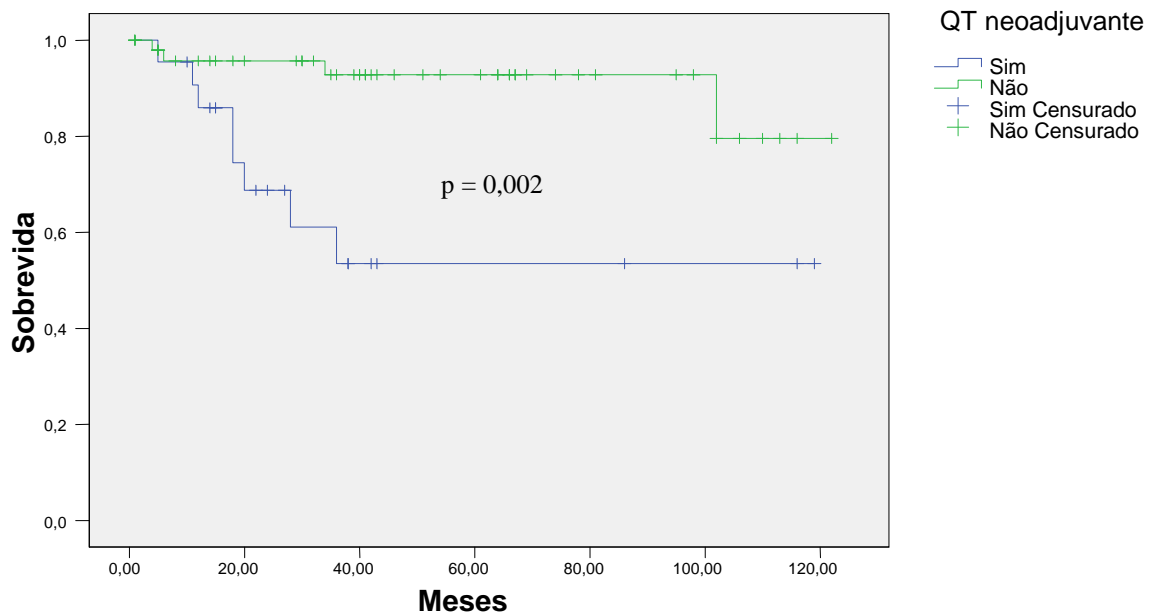


Gráfico 12 – Impacto da realização de quimioterapia neoadjuvante na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

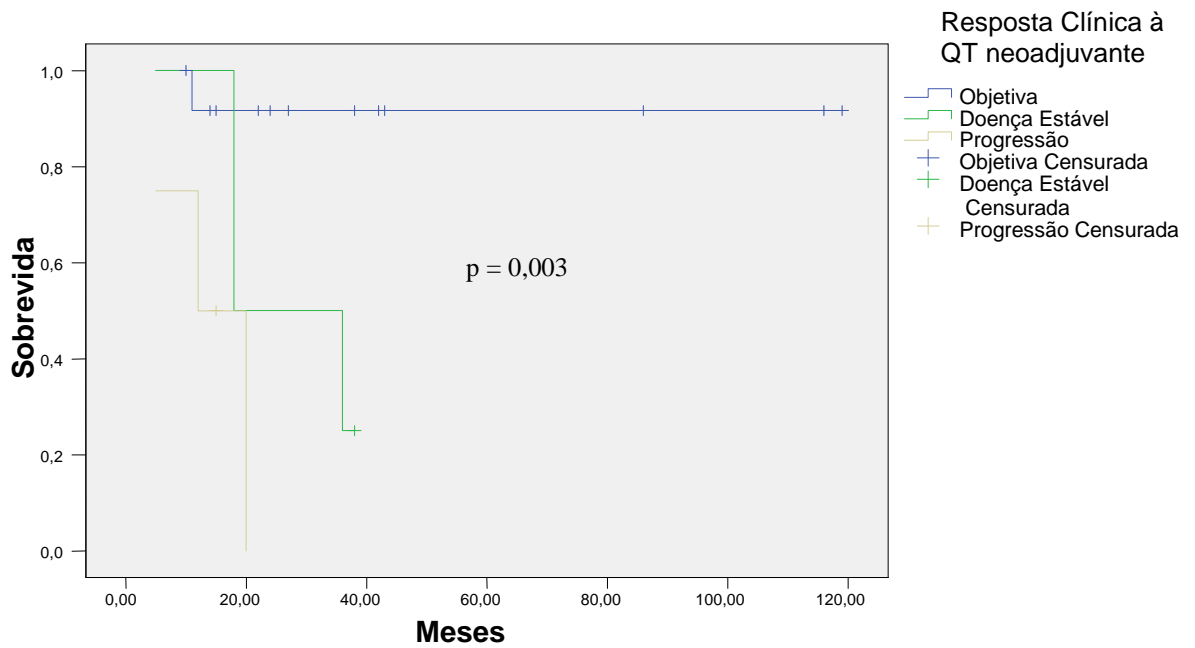


Gráfico 13 – Impacto da resposta clínica (presença x ausência de resposta) da QTneo em pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

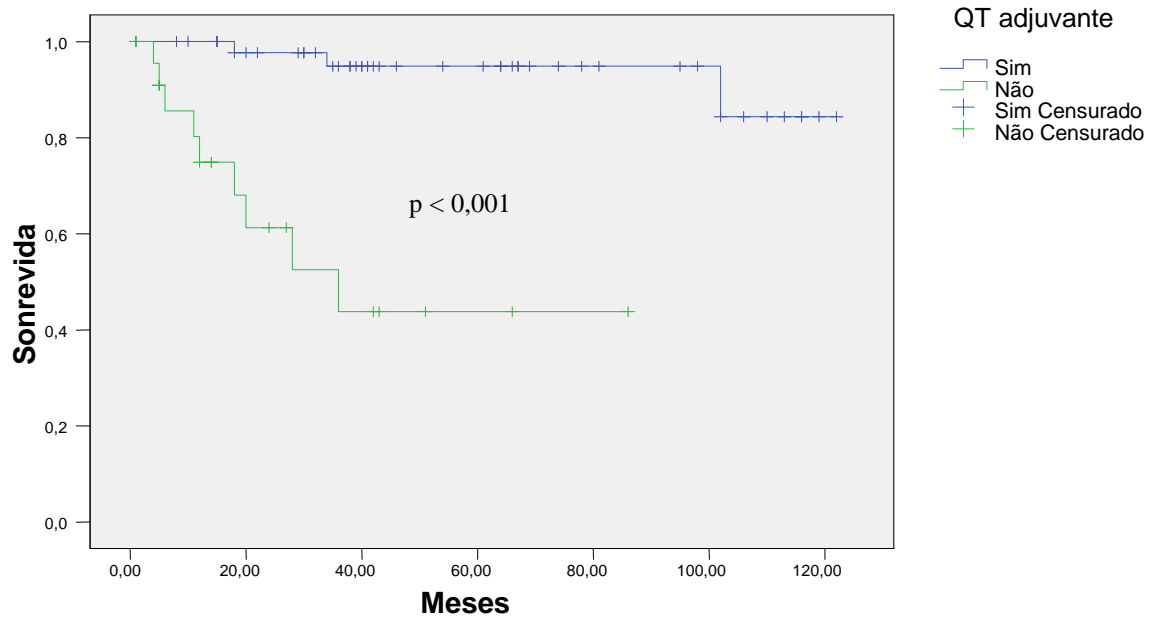


Gráfico 14 – Impacto da realização de quimioterapia adjuvante na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos.

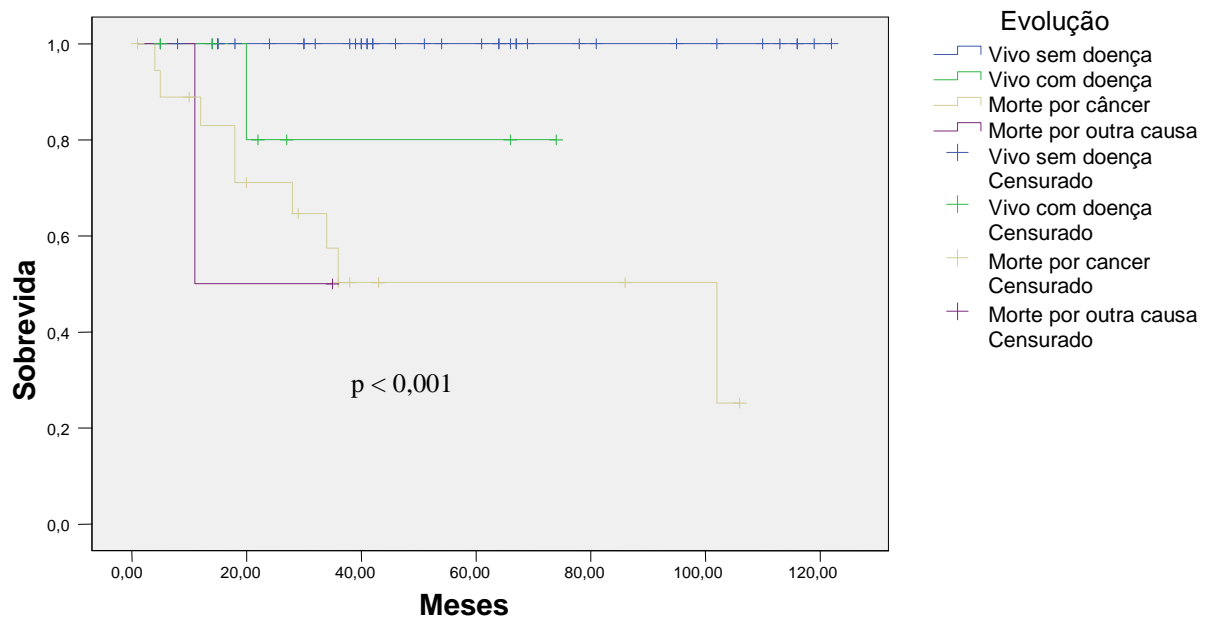


Gráfico 15 – Impacto da evolução (ausência de recidiva x recidiva loco-regional x recidiva sistêmica), na sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

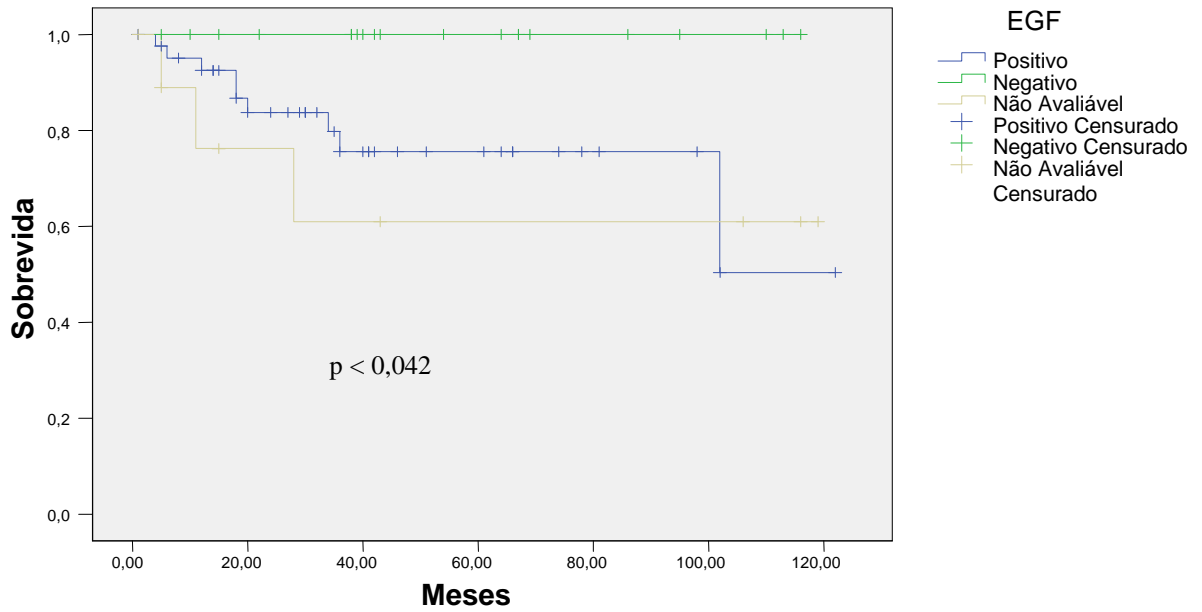


Gráfico 16 – Impacto da expressão de EGF na sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

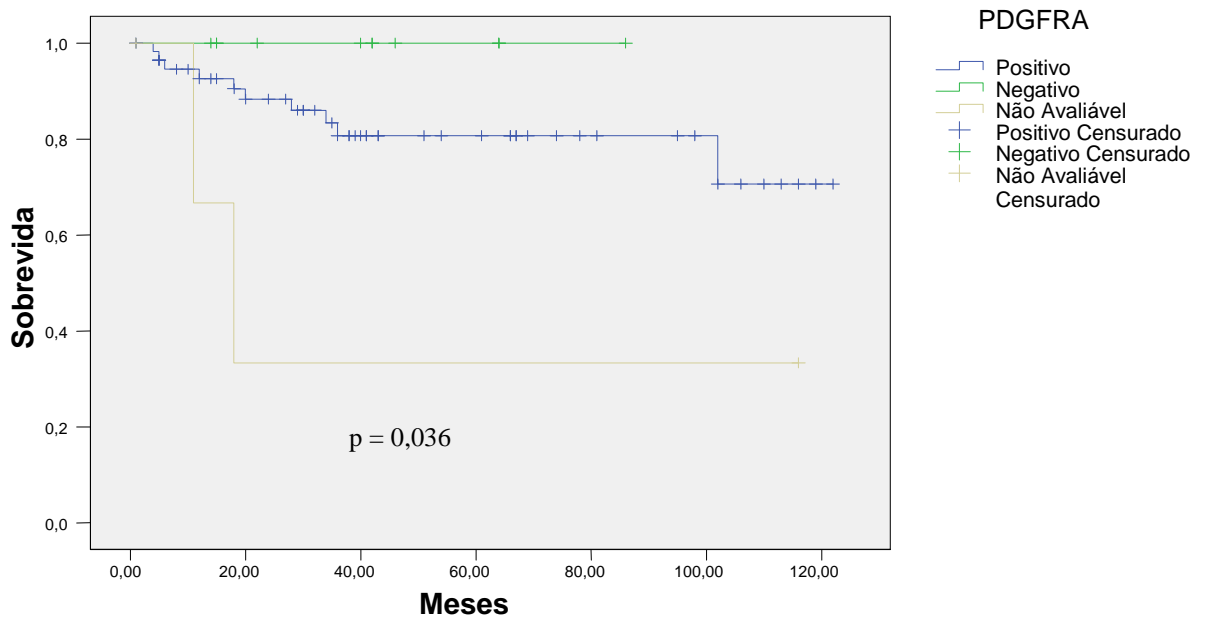


Gráfico 17 – Impacto da expressão de PDGFRA na sobrevida global de pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

Procuramos também avaliar se havia interação do imunofenótipo com as demais variáveis quanto à sobrevida e encontramos associação estatisticamente

significante para as pacientes de cor parda (pior sobrevida para os tumores basais, $p=0,030$), presença de metástases ao diagnóstico (pior sobrevida no subgrupo basal, $p=0,043$) e cujos tumores expressavam PDGF, VEGFR e NOS2 (pior sobrevida para os tumores basais, $p=0,006$; $p=0,046$ e $p=0,024$, respectivamente (gráficos 5 a 17).

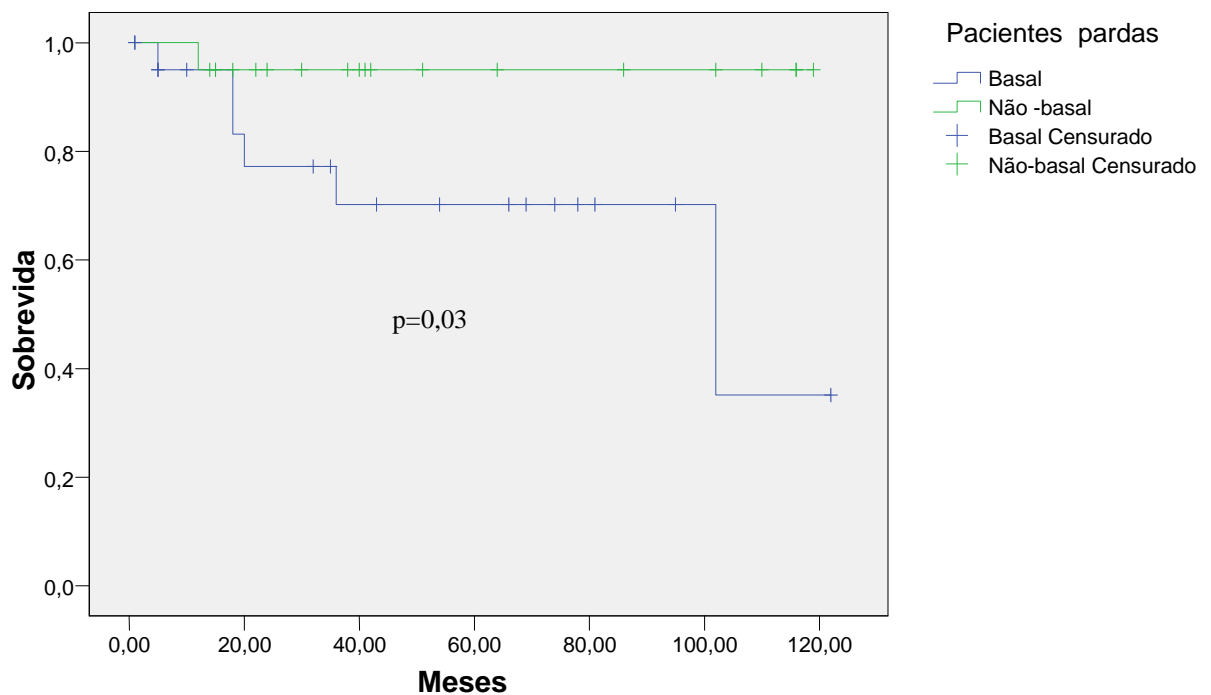


Gráfico 18 – Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função do perfil imunohistoquímico e da variável cor.

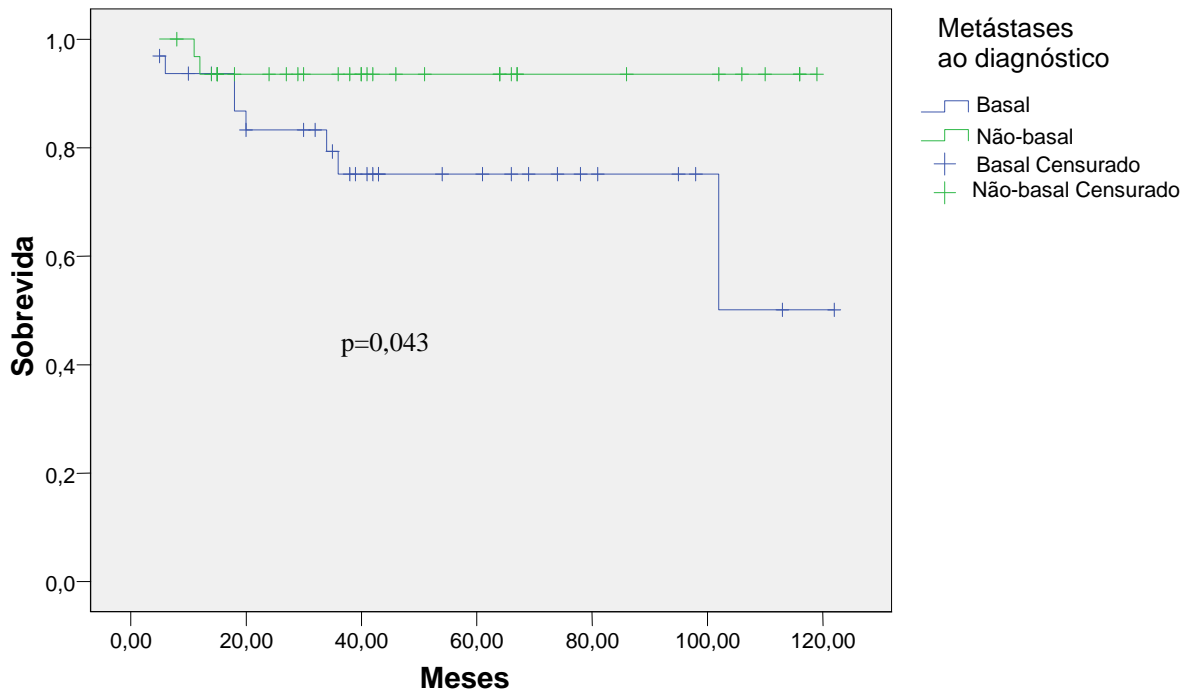


Gráfico 19 – Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função da presença de metástase ao diagnóstico

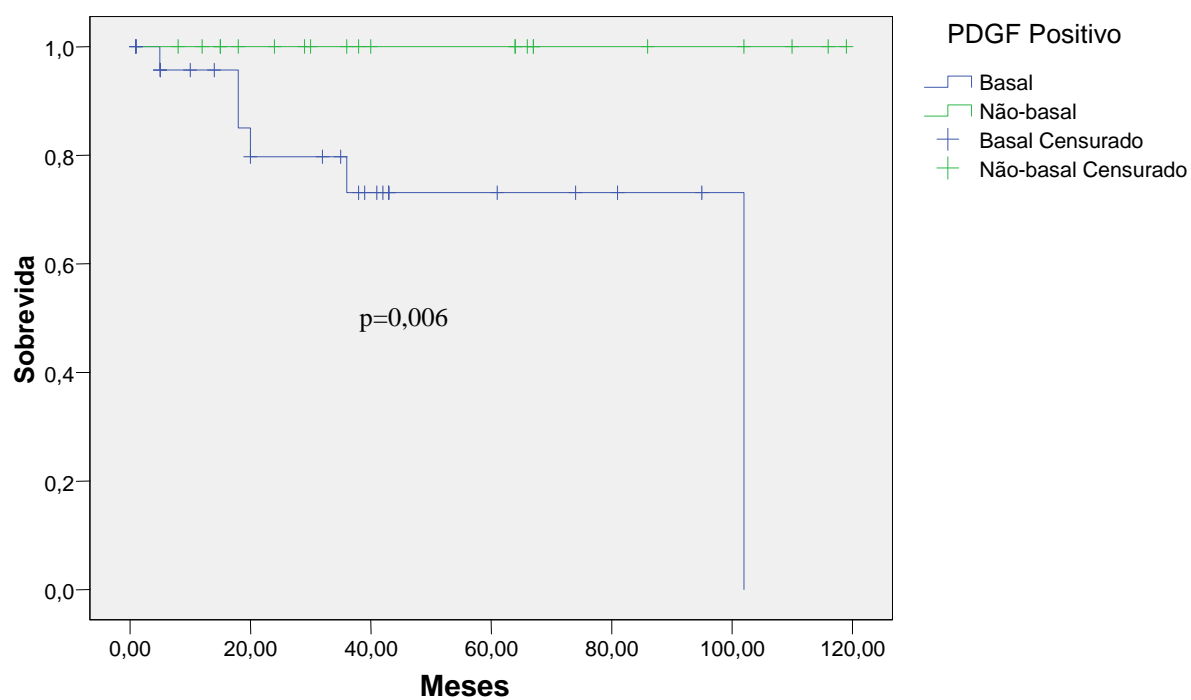


Gráfico 20 – Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos em função da imunoposição de PDGF.

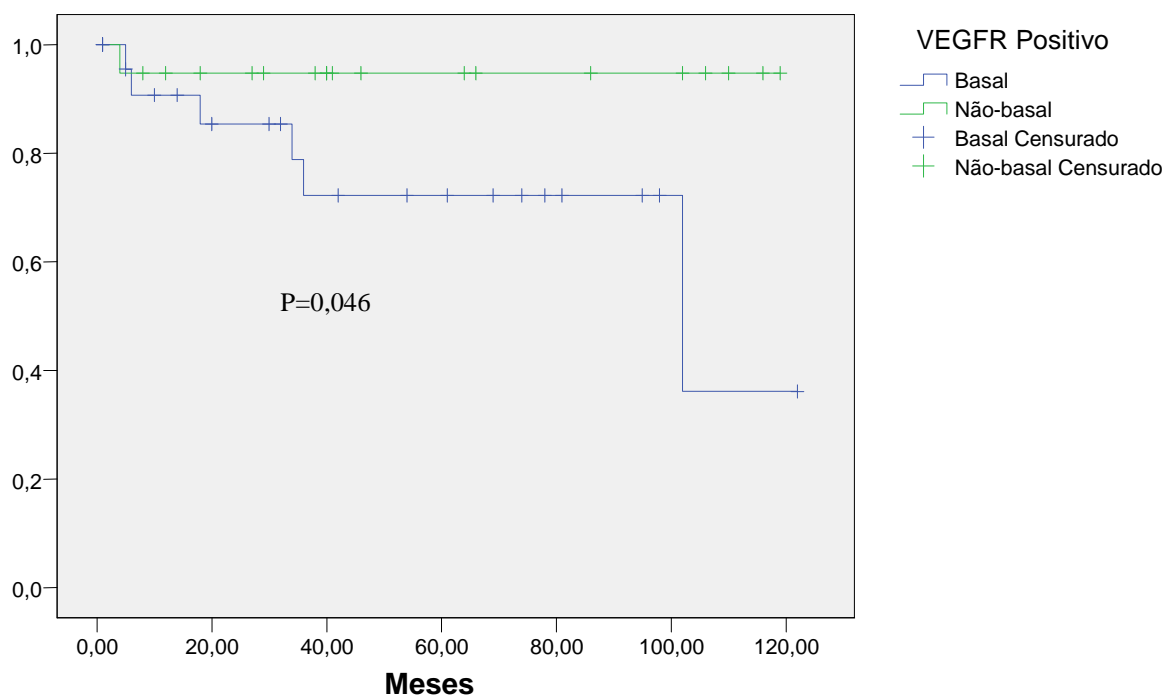


Gráfico 21 – Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo- negativos em função da imunoexpressão de VEGFR.

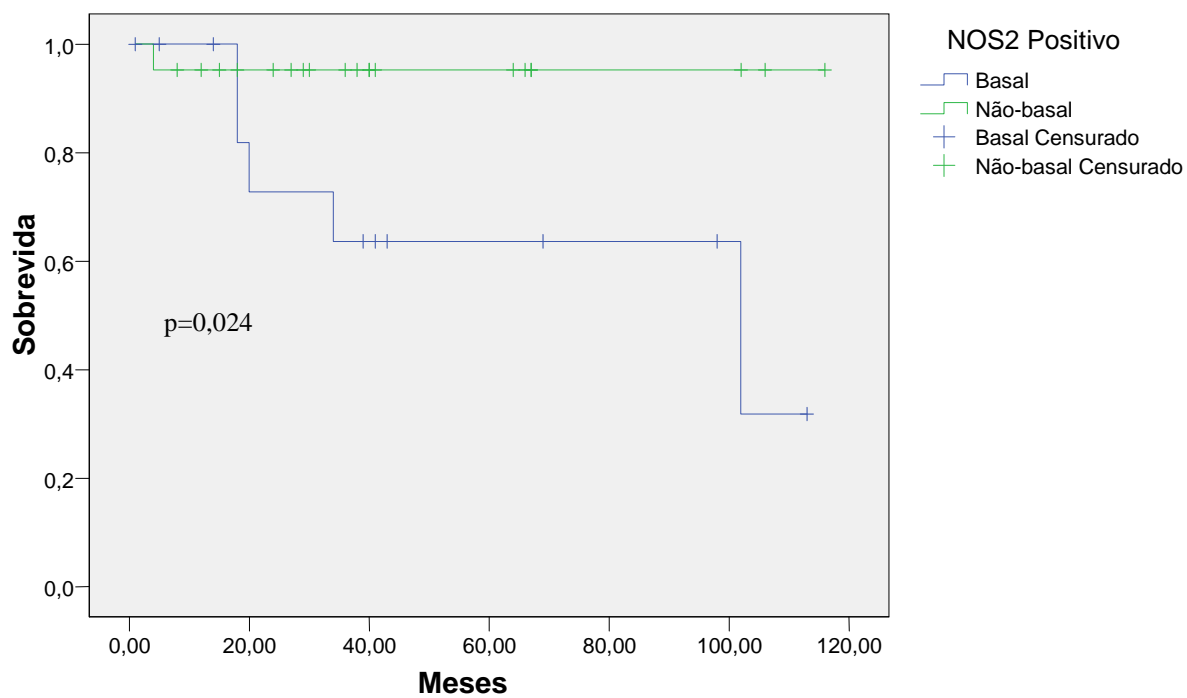


Gráfico 22 – Sobrevida global de pacientes portadoras de tumores triplo- negativos em função da imunoexpressão de NOS2.

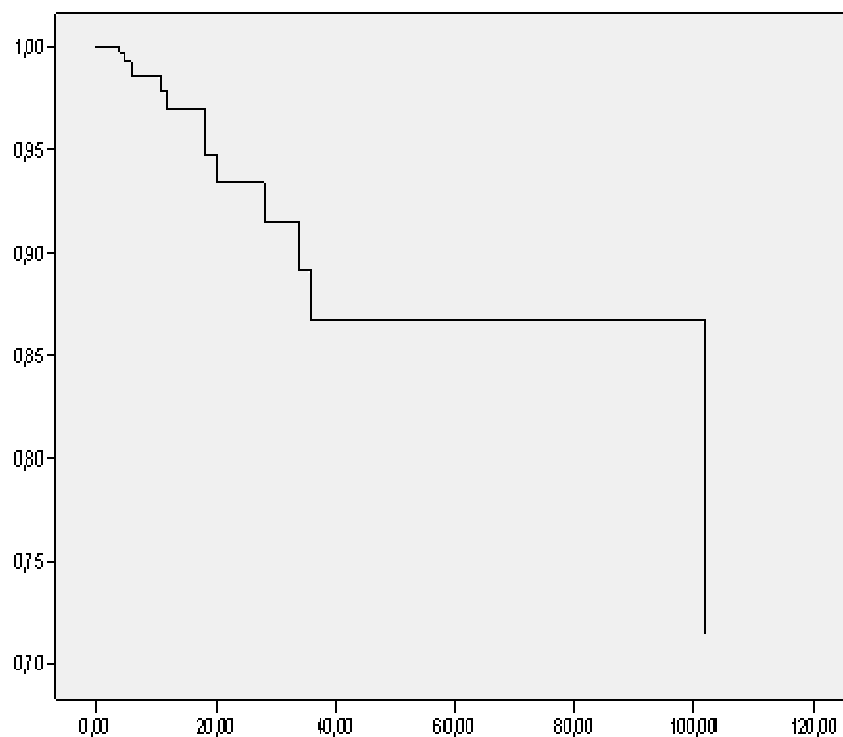


Gráfico 23 – Análise multi-variada – Regressão de Cox, sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos.

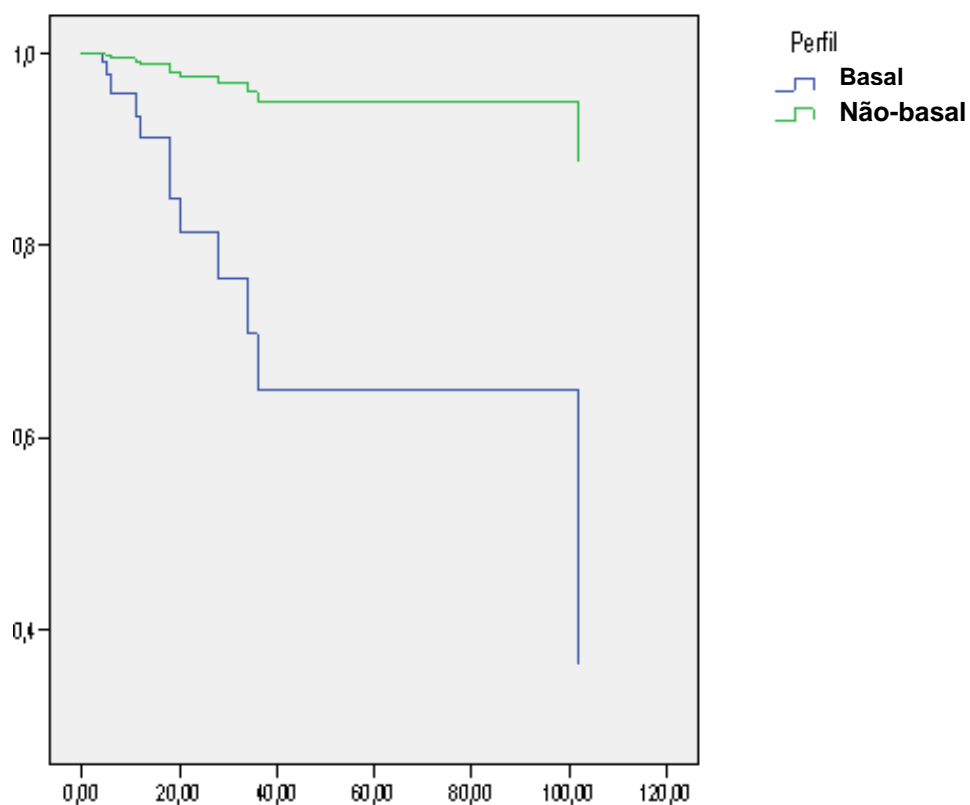


Gráfico 24 - Análise multi-variada – Regressão de Cox, sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos, controlando os perfis basal e não-basal.

Ao ser realizada a análise multivariada, partindo-se de variáveis que apresentaram significância de até 20% na regressão de Cox bivariada que testou, além do perfil basal e não-basal, todas as demais variáveis, permaneceram no modelo final: perfil imunoistoquímico, comprometimento axilar (N2), realização de cirurgia e QTNeo, levando à seguinte conclusão: pacientes portadoras de tumores basais (*odds adjust* = 8,5), com axila comprometida (*odds adjust* = 4,9), submetidas à quimioterapia neoadjuvante (*odds adjust* = 3,5) e não operadas (*odds adjust* = 13,1) apresentaram pior sobrevida, vide tabela 10 e gráficos 23 e 24.

Tabela 10 – Análise multivariada da sobrevida global das pacientes portadoras de tumores mamários triplo-negativos – Regressão de Cox.

	B	SE	Wald	df	Sig.	Exp(B)	Li	Ls
Perfil	2.136	.784	7.431	1	.006	8.469	1.823	39.350
N2	1.583	.751	4.447	1	.035	4.869	1.118	21.198
Cirurgia	2.572	.885	8.455	1	.004	13.093	2.313	74.122
QTneo	-1.243	.725	2.936	1	.087	.289	.070	1.196

B = coeficiente de regressão;

SE = Erro padrão do coeficiente de regressão;

Wald = Teste de Wad;

Df = Grau de liberdade;

Sig = Nível de significancia;

Exp (B) = Odss = Exponencial de coeficiente de regressão;

Li = Limite inferior de coeficiente de regressão do intervalo de confiança 95,0%;

Ls = Limite superior de coeficiente de regressão do intervalo de confiança 95,0%

5 DISCUSSÃO

Os tumores triplo-negativos continuam a desafiar os profissionais que lidam com o câncer de mama, desde a dificuldade na definição de marcadores imunoistoquímicos apropriados para a identificação dos subtipos basais, até na escolha do tratamento sistêmico, tendo em vista a escassez de quimioterápicos mais eficazes e específicos para esta forma agressiva de câncer de mama.

Em nosso estudo, composto de 74 amostras de tumores triplo-negativos a idade variou de 27 a 95 anos, com média de 59,9 anos e mediana de 57 anos, o que mostra uma faixa etária elevada em comparação com a literatura pesquisada (ANDERS e CAREY 2008; FERNANDES et al. 2009; REIS-FILHO e TUTT, 2008; RHEE et al. 2008), a qual relata maior incidência de tumores triplo-negativos em mulheres jovens. ONITILLO et al. (2009) ao estudarem 1134 casos de carcinoma invasivo da mama, encontraram uma idade média de 62,7 anos. Ao se avaliarem apenas os casos triplo-negativos, a idade encontrada foi um pouco inferior, 58,1 anos, semelhante àquela encontrado em nosso estudo.

Os tumores de mama acometem mais frequentemente mulheres na faixa etária acima de 50 anos de idade, alcançando seu pico de incidência no intervalo de 65 a 70 anos de idade, conforme dados do INCA (2010), enquanto que os tumores triplo-negativos são encontrados em mulheres mais jovens (ANDERS & CAREY 2008; REIS-FILHO e TUTT, 2008; RHEE et al., 2008; FERNANDES et al., 2009).

No subgrupo basal, a idade das pacientes variou de 27 a 92 anos, com média de 57,4 anos e mediana de 58,5 anos, dados estes que quando comparados com o subgrupo não-basal, com limites de idade de 29 a 95 anos e média e mediana de 54,9 e 49 anos, mostram uma discordância com a literatura, Silva et al. (2008) citam

uma maior frequência dos tumores basais em pacientes jovens com idade variando de 35 a 60 anos. No nosso estudo o subgrupo basal com idade inferior a 45 anos correspondeu a apenas 31,1% dos casos. Sasa et al. (2007), ao estudarem 66 pacientes portadoras de tumores TN, encontraram que 14 (35%) de 40 pacientes do subgrupo basal apresentavam idade inferior a 49 anos, enquanto que no grupo não-basal, 5 (19,2%) de 26 pacientes encontrava-se nesta faixa etária. LIN et al. (2009) estudaram 167 casos de tumores triplo-negativos, sendo que a idade foi bastante semelhante ao comparar os subgrupos de basais e não-basais, 51,97 e 51,93 anos, respectivamente. Este resultado é maior que o encontrado na maioria dos estudos, porém inferior a encontrada em nosso estudo, no qual a mediana foi de 58,5 e 49 anos subgrupos basal e não-basal respectivamente. CAREY et al. (2007), em estudo que analisou a resposta à quimioterapia neoadjuvante em 107 pacientes, encontraram uma idade mediana de 51 anos, enquanto que no subgrupo de tumores basais a idade mediana foi de 45 anos, mostrando que as pacientes do subgrupo basal são diagnosticadas em idade menor que no grupo não-basal.

Em nosso estudo, encontramos dois grupos quanto a cor, sendo 43 pardas (58,1%) e 31 (41,9%) brancas. Quando analisados os dois subgrupos (basais e não-basais), encontramos que a proporção de mulheres pardas no subgrupo basal foi de 60,5% versus 56,6% no subgrupo não-basal.

Devemos ter cuidado ao se comparar dados epidemiológicos no que se refere à cor, devido à grande miscigenação ocorrida em nosso país e a grande diferença existente entre os diversos estados. No Ceará, a população feminina é composta de 56,22% de pardas, 38,96% de brancas, 3,74% de pretas, 0,14% de amarelas e 0,16% de indígenas, segundo censo demográfico de 2000 do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2010).

Diversas publicações se referem à maior incidência de tumores triplo-negativos em mulheres afrodescendentes. LUND et al. (2008), em uma população americana, verificaram uma maior frequência de tumores TN em mulheres negras

quando comparadas a mulheres não-negras (29,3% x 13%). RHEE et al. (2008) relataram a incidência de 19,9% de TN na população americana não-negra, enquanto que nas americanas negras a incidência é 26,4%. BRENTON et al. (2005) relatam maior frequência de tumores basais em mulheres afrodescendentes na pré-menopausa quando comparadas com mulheres na pós-menopausa não-afrodescendente (39% versus 14%). MILLIKAN et al. (2008), dentre um universo de 225 pacientes de tumores basais, comparou a frequência de pacientes de cor negra e branca, nas mulheres pré e pós-menopausadas, tendo encontrado maior frequência de tumores basais nas negras na pré-menopausa (27,2% x 14,5%), bem como nas pacientes pós-menopausadas (16% x 9,3%).

Ao analisarmos o padrão racial do grupo por nós estudado, a participação de mulheres pardas, que compõem 60,5% do subgrupo basal, foi superior a participação de mulheres pardas na população cearense que é composta de 56,22% de mulheres pardas. Nosso resultado mostra uma incidência um pouco maior de mulheres pardas no grupo basal, o que seria coerente com a literatura citada no parágrafo anterior, porém, ressaltamos que a literatura se refere à cor negra, a qual representa apenas 3,74% da população feminina cearense, segundo o IBGE (2010), e ainda reforçamos que não encontramos nenhum relato de paciente de cor negra em nossa amostra. Isso pode ser, entretanto, um viés de anotação, já que as pessoas costumam evitar o termo negro ou preto nos registros médicos. A cor parda esteve associada com pior sobrevida dentro do subgrupo de portadoras de tumores basais, contudo, como esta população era enriquecida para pacientes desta cor, isto pode refletir apenas essa preponderância numérica.

REIS-FILHO e TUTT (2008) relatam uma associação entre tumores triplo-negativos e mutação do gene *BRCA1*. Vários autores encontraram associação de mutações em *BRCA1* com os tumores triplo-negativos e com a expressão de marcadores de fenótipo basal (ANDERS e CAREY 2008; RAKHA et al. 2008).

Em nossa prática clínica, a realização de estudos de mutação de genes como o *BRCA1* ou *BRCA2* é muito difícil, dessa maneira, como um marcador indireto, pesquisamos nos prontuários dados referentes à presença de histórico familiar para câncer de mama ou de ovário. Foi encontrada história de familiares com câncer em 15 pacientes do subgrupo basal, bem como 15 no subgrupo não-basal (45,5% x 46,9%), sem significância estatística. A idade média ao diagnóstico foi de 59,9 e mediana de 57 anos. Ao avaliar a localização do tumor no familiar acometido identificamos 14 casos de câncer de mama e um caso de câncer de ovário em cada subgrupo, sugerindo que potencialmente, pelo menos uma parcela destas pacientes sejam portadoras de mutações.

Quanto às características morfológicas dos tumores triplo-negativos encontramos a maioria classificada como carcinoma ductal infiltrante (89,7%), sem diferenças entre os subgrupos basais e não-basais (88,9% x 90,6%), o carcinoma medular puro foi encontrado em 5,9% (N=4) dos tumores TN, sua distribuição foi semelhante nos subgrupos basais e não-basais (5,6% x 6,3%). ANDERS e CAREY (2008) relatam a predominância do carcinoma ductal invasivo dentre os tumores triplo-negativos, podendo ser encontrados fenótipos agressivos como metaplásico, medular atípico ou adenóide cístico. Diversos autores, entre eles FULFORD et al. (2006), citam como características histopatológicas dos tumores basais: cicatriz central, necrose tumoral, presença de *spindle cells*, metaplasia escamosa, alto grau mitótico e alto grau nuclear. THIKE et al. (2010), em uma amostra de Singapura, encontraram distribuição dos tipos histopatológicos semelhante ao nosso, estudo 92% de tumores ductais invasivos, enquanto que na amostra aqui apresentada foi de 83,8%. Em relação aos tumores medulares, foi encontrado um percentual desta variante tumoral na amostra oriunda do Ceará superior ao resultado encontrado na amostra de Singapura (5,9% x 2%).

Ao ser estudado o grau histológico, conforme Scarf, Bloom & Richardson (SBR), o maior percentual dos tumores foi classificado como SBR2 (54,5% no subgrupo basal e 47,8% no subgrupo não-basal) e SBR3 (45,5% no subgrupo basal e 34,8% no subgrupo não-basal), não sendo encontrada diferença entre os dois

subgrupos, o que se aproxima dos dados relatados em outros estudos. ONITILLO et al. (2009) relataram uma frequência de 76,3% de tumores indiferenciados, 12,5% de tumores moderadamente diferenciados e 4% de tumores bem diferenciados entre os tumores TN por eles estudados.

CHEANG et al. (2008) compararam as características morfológicas dos tumores TN, comparando os tumores basais (336) com os tumores não-basais (303) e encontraram 87,2% de tumores grau III entre os tumores basais versus 64,4% entre os tumores não-basais. Os mesmos autores também referem uma frequência inferior de tumores GII (10,4% entre tumores basais e 26,4% entre os não-basais). É importante ressaltar o achado de LIVASY et al. (2006) que observaram, em uma amostra de 23 tumores TN, que todos apresentaram SBRIII. A nossa amostra é enviesada quanto a este parâmetro já que não foi realizada avaliação do grau histológico em 39,1% dos casos.

Ao ser avaliado o grau nuclear (GN) no estudo ora apresentado, observamos GN1 em 3,6% dos tumores basais versus 21,4% em tumores não-basais, GN2 em maior frequência nos tumores não-basais (53,6% x 46,4%) que nos tumores basais, bem como os tumores GN3 (42,9% x 21,4%), sendo esta associação estatisticamente significativa ($p=0,049$), ou seja, foi encontrada associação do fenótipo basal com grau nuclear elevado. SASA et al. (2007), em amostragem japonesa de 66 tumores triplo-negativos, encontraram tumores GN1 em maior número entre os tumores não-basais (50% x 15%). Para os tumores GN2 foi relatada um discreto predomínio no subgrupo basal (15% x 11,5%), já o GN3 foi encontrado com maior frequência no subgrupo basal (70% x 38,5%). Concluímos que nossos achados foram semelhantes para o grau nuclear relacionado com os tumores não-basais, enquanto que os graus nucleares mais elevados se relacionaram com os tumores basais. Este dado sugere uma maior agressividade destes tumores, em especial dos tumores basais.

A infiltração vascular quando avaliada, foi encontrada em 75% dos tumores triplo-negativos, tanto no subgrupo basal, quanto no subgrupo não-basal, embora tenha sido realizada em apenas 44,6% das pacientes. No estudo de SASA et al. (2007) foi encontrado 32,5% de invasão vascular nos tumores basais e 15,4% de invasão vascular nos tumores não-basais. Este indicador de agressividade por nós avaliado indica, mais uma vez, uma potencial maior agressividade dos tumores triplo-negativos como um todo.

Quando avaliado o estadiamento clínico das pacientes portadoras de tumores triplo-negativos, 52,7% encontravam-se no ECII e 32,4% no ECIII. Foram encontrados cinco casos de pacientes com doença disseminada no momento do diagnóstico, três no subgrupo basal e duas no subgrupo não-basal. O estadiamento clínico e o estadiamento T do TNM, tanto clínico quanto patológico, após agrupamento, mais avançados, assim como a presença de metastases ao diagnóstico, estiveram associados com pior sobrevida global. O comprometimento axilar clínico também esteve associado com pior sobrevida, e junto com a presença de metastase, se manteve como fator independente na análise multivariada. RAKHA et al. (2006), ao analisarem 1862 pacientes com câncer de mama, verificaram que 347 (18,6%) apresentaram fenótipo basal. Ao ser analisada a presença de metástase quando do diagnóstico, esta foi encontrada em 145 pacientes portadores de tumores não-basais, correspondendo a 9,5%, sendo encontrados 66 pacientes EC IV no subgrupo basal, o que correspondeu a 19%. A taxa de 19% de EC IV no subgrupo basal foi bem mais elevada que aquela do subgrupo não-basal ($p < 0,0001$), bem como mais elevado do que aquela encontrada na pesquisa ora apresentada (6,75%).

Quanto ao tratamento cirúrgico, 66 pacientes foram submetidas a alguma forma de tratamento cirúrgico, o que correspondeu a 89,2% dos casos. A maioria (N=56) foi submetida à mastectomia, nove realizaram cirurgia conservadora e apenas uma mastectomia subcutânea. A não realização de cirurgia e a realização de cirurgia conservadora estiveram associadas com pior sobrevida global no nosso estudo. Ao ser analisada a possibilidade de maior risco de recidiva local na

conservação da mama, a literatura não é uniforme. HAFETY et al. (2006) relataram que as pacientes portadoras de TN e submetidas à conservação da mama, apresentam taxa de recidiva loco-regional semelhante às demais. Da mesma forma FREEDMAN et al. (2009) concluíram que pacientes portadoras de TN não apresentam maior risco de recidiva loco-regional isolada, sendo candidatas ao tratamento conservador. Já SOLIN et al. (2009) relataram um maior taxa de recidiva após cirurgia conservadora nas pacientes TN, porém esta diferença é de pequena monta, não contra-indicando a conservação da mama seguida de radioterapia nas pacientes com tumores triplo-negativos. Na série estudada por ONITILLO et al. (2009), 150 pacientes portadoras de tumores triplo-negativos foram submetidas a alguma modalidade terapêutica cirúrgica, correspondendo a 98,7%, índice este mais elevado que o encontrado em nosso estudo (89,2%).

Embora nosso estudo tenha mostrado um impacto negativo da cirurgia conservadora nesse subgrupo de pacientes, entendemos que a classificação da paciente na categoria triplo-negativo, ou mesmo como portadora de tumor basal, não interfere na definição de seu tratamento cirúrgico, não chegando a contraindicar cirurgia conservadora, desde que se leve em consideração o tamanho do tumor e o acometimento linfonodal.

O tratamento quimioterápico neoadjuvante foi utilizado em 23 pacientes com o intuito de reduzir a massa tumoral e facilitar o tratamento cirúrgico. A realização de quimioterapia neoadjuvante esteve associada a uma pior sobrevida de forma independente. Isto provavelmente reflete o estadiamento mais avançado das pacientes que são encaminhadas para este tratamento.

A resposta à quimioterapia neoadjuvante foi avaliada de forma clínica e patológica, sendo encontrada resposta clínica completa em 3 pacientes do subgrupo não-basal e em nenhum do subgrupo basal. Quanto à resposta patológica completa, esta foi encontrada em apenas um caso de tumor triplo-negativo, sendo este não-basal. A ausência de resposta clínica objetiva, ao contrário da resposta patológica,

esteve associada a pior sobrevida; ANDERS & CAREY (2008), ao utilizarem quimioterapia com antraciclina e taxano, relataram maior taxa de resposta à quimioterapia neoadjuvante nas pacientes TN quando comparadas àquelas com tumores RH (+). Tal comparação não é viável em nosso estudo visto que todo nosso subgrupo era formada de tumores triplo-negativos apenas. CAREY et al. (2007) relataram resposta clínica completa em 85% das pacientes portadoras de TN, quando comparado com pacientes portadores de tumores luminais, as quais apresentaram taxa de resposta completa de 47%. Ao utilizar esquemas de quimioterapia neoadjuvante compostos de doxorubicina e paclitaxel, ROUZIER et al. (2005) encontraram uma taxa de resposta patológica completa bem mais elevada nos tumores basais que nos tumores luminais (45% versus 6%).

LIEDTKE et al. (2008), em estudo realizado no *M. D. Anderson Cancer Center*, em uma população de 1.118 pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante, observaram 255 (23%) portadoras de tumores triplo-negativos. As pacientes portadoras de TN tiveram o dobro de taxa de resposta a quimioterapia quando comparadas com as demais pacientes (22% x 11%) com $p=0,034$. Os autores ainda afirmam que as pacientes portadoras de TN, apesar de terem globalmente um pior prognóstico, quando apresentam resposta completa à quimioterapia neoadjuvante passam a ter prognóstico igual ao das demais pacientes. Em nossa amostra de 22 pacientes avaliáveis quanto à resposta histopatológica, apenas uma alcançou resposta completa, sendo esta do subgrupo não-basal.

A maioria dos estudos analisa a resposta à quimioterapia neoadjuvante com esquemas contendo antracíclicos e taxanos. HUGH et al. (2009) afirmaram que o esquema TAC (paclitaxel, adriamicina e ciclofosfamida) é superior ao FAC (5-fluorouracil, adriamicina e ciclofosfamida). SILVER et al. (2010) relataram eficácia da cisplatina como agente único na terapia neoadjuvante dos pacientes portadores de triplo-negativos comparável a de outros esquemas, havendo associação entre resposta e mutação no gene *BRCA1* ou metilação de sua região promotora.

Muitos autores, entres eles GLUZ et al. (2009), referem-se ao paradoxo da maior resposta à quimioterapia neoadjuvante em contraposição ao pior prognóstico em termos de sobrevida das portadoras de tumores TN. Tal diferença pode dever-se a composição das amostras quanto a tumores basais (mais sensíveis à quimioterapia) e tumores *claudin-low*, por exemplo.

Tal diferença em relação aos dados apresentados na literatura pode dever-se ao caráter retrospectivo da análise, englobando pacientes que receberam tratamentos diversos, nem sempre oferecidos nos intervalos adequados ou com regime de quimioterapia ótimo (antraciclina e taxanos).

Na população apresentada no presente estudo, 48 pacientes realizaram quimioterapia de forma adjuvante, correspondendo a 64,9%, com distribuição semelhante nos subgrupos basal e não-basal, e esta esteve associada com aumento de sobrevida. O esquema mais utilizado foi o CMF (ciclofosfamida, adriamicina e metotrexate) seguido de AC (adriamicina e ciclofosamida). RAKHA et al. (2006) relataram uma melhora na sobrevida e no risco de recidiva nas pacientes com tumores TN que apresentavam critérios de Nottingham desfavoráveis e que foram submetidas à quimioterapia adjuvante. No grupo por nós estudado, o esquema quimioterápico mais empregado foi o CMF, talvez devido ao período de tratamento das pacientes estudadas. Recentemente, o impacto do perfil imunohistoquímico triplo-negativo foi avaliado num grupo de mulheres randomizadas para receber 6 ciclos de CMF clássico, goserelina isolada ou ficarem em observação apenas e verificou-se que este subgrupo de pacientes foi o que mais se beneficiou da quimioterapia adjuvante com este esquema em termos de sobrevida global (COLLEONI et al. 2010).

NOFECH-MOZES et al. (2009) observaram maior risco de morte na análise multivariada entre portadores de tumores basais (HR 1,62 95%IC 1,14–2,28; $p=0,006$) quando comparado a tumores não-basais ou RH+, risco esse que foi independente da quimioterapia recebida mesmo que 55% das portadoras de

tumores basais a tenham recebido. Hoje em dia os esquemas mais utilizados incluem alguma droga das famílias dos antracíclicos ou dos taxanos. Importante avaliar ainda a indicação de utilização de sais de platina que podem ser mais mais efetivos naquelas pacientes que apresentam mutação de *BRCA1* (SILVER et al, 2010) e nos tumores TN de modo geral (FRASCI et al. 2009), devendo ser ressaltada a interseção dos universos de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos, tumores basais e pacientes portadoras de mutação em *BRCA1*.

O tratamento radioterápico foi realizado em 54 (77,1%) pacientes, sendo 24 do subgrupo basal. Da amostra de TN, 9 pacientes submetidas à cirurgia conservadora, receberam radioterapia na mama e as demais 45 receberam radioterapia no plastrão. RAKHA et al. (2006) relataram a realização de tratamento radioterápico em 334 (22,3%) pacientes TN, porém sem especificar a taxa de utilização no grupo de tumores basais. ONITILLO et al. (2009) relataram a realização de tratamento radioterápico em 68,4% das pacientes com tumores TN, resultado este um pouco inferior ao encontrado em nosso estudo, porém, quando comparada a utilização desta modalidade de tratamento como os demais grupos (ER+/RP+/ERBB2-, RE+/RP+/ERBB2+, RE-/RP-/ERBB2+), o resultado encontrado foi semelhante, semelhantemente aos resultados encontrados do estudo anterior. Os autores não especificam, contudo, quando foi realizada a radioterapia na mama, em caso de cirurgia conservadora, ou no plastrão, no caso de mastectomia.

Entendemos que a escolha do tratamento loco-regional, seja ele, cirúrgico, como exposto acima, ou radioterápico, não deva ser influenciado no caso de paciente portadora de tumor triplo-negativo ou basal, visto que, a maior agressividade desta variedade tumoral em estudo, leva a um maior risco de recidiva sistêmica, sem alterar o risco de recidiva loco-regional (ANDERS & CAREY, 2008; DENT et al, 2009; ONITILLO et al, 2009).

O presente estudo foi delineado com o objetivo de tentar identificar por imunohistoquímica a expressão de alguns fatores de crescimento e seus respectivos

receptores, bem como de algumas proteínas envolvidas com resposta inflamatória e resposta imune inata, e sua associação com tumores triplo-negativos, basais e não-basais, e o impacto desta na sobrevivência das pacientes.

Em nossa amostra de 74 tumores triplo-negativos foram encontrados 38 casos de tumores basais, o que representou 51,4%, seguindo os critérios de Nielsen. Este dado aproxima-se dos achados de SASA et al. (2007) que encontraram 60,1% de tumores com fenótipo basal dentre os 66 tumores triplo-negativos de sua amostra de mulheres japonesas. O mesmo foi observado por HUO et al. (2009), em estudo que incluiu 210 pacientes com tumores triplo-negativos africanas da Nigéria e Senegal, que encontraram 49,1% de tumores basais.

Considerando o resultado encontrado em nossa população, supostamente miscigenada, com aqueles publicados em estudos em populações puramente africanas e asiáticas, parece evidente que a proporção de tumores basais entre os tumores triplo-negativos de diferentes etnias não apresenta uma divergência marcante. Torna-se, entretanto, necessário assinalar que no estudo de HUO et al. (2009), com mulheres africanas, apesar da proporção de tumores basais entre os tumores triplo-negativos ser relativamente semelhante à encontrada em nosso estudo, e no estudo asiático de Sasa et al. (2007), a proporção de tumores triplo-negativos em relação ao total de casos de câncer de mama em seis regiões africanas, foi de 55,5%, dado bastante superior aos tradicionalmente relatados na literatura que variam de 8,4% a 15,8%:(MILLIKAN et al. 2008; DENT et al. 2009; LIU et al. 2009; ONITILLO et al. 2009).

Realizamos o agrupamento das pacientes usando definições diferentes de perfil basal, considerando, por exemplo, a imunomarcagem para qualquer um dos seguintes marcadores: CK5, EGFR, CK14 ou p63, nossa população de tumores com fenótipo basal passaria de 51,4% para 60,8%. Este dado é diferente daquele obtido por VIALE et al. (2009), em pacientes italianas, que consideraram basais aqueles tumores triplo-negativos que apresentaram positividade para qualquer um dos três

marcadores: p63, CK5/6 e EGFR e encontraram 245 (86,3%) tumores basais dentre 284 tumores triplo-negativos.

A imunomarcção para CK5 foi encontrada em 27 (36,5%) amostras, a mesma foi negativa em 44 (59,5%), e não foi possível sua avaliação em 3 amostras. HUR et al. (2009) pesquisaram a expressão de CK5/6, tendo encontrado imunomarcção para a mesma em 80% dos casos de tumores basais. VIALE et al. (2009) em estudo italiano já citado, encontraram imunomarcção para CK5/6 em 90 amostras (36,7%), resultado bastante semelhante ao encontrado na presente pesquisa no que se refere à CK5. LIU et al. (2009) utilizaram como critério para definição de tumor basal a positividade para uma citoqueratina de alto peso molecular, seja CK5/6 ou CK14, com este critério os autores obtiveram 46,4% de positividade, sendo assim próximo do resultado por nós encontrado de 51,35%.

Durante algum tempo conviveu-se na literatura com certa confusão entre tumores triplo-negativos e tumores basais, grande parte, desta confusão, pela falta de cuidado em observar que a classificação triplo-negativo é baseada em critérios imunohistoquímicos, enquanto a definição do perfil basal é baseada em padrões de expressão gênica global (GLUZ et al. 2009). BOSCH et al. (2010) afirmam que os tumores triplo-negativos compartilham seus achados fenotípicos com os tumores basais, os quais, por sua vez são mais agressivos e apresentam pior prognóstico. Em estudo japonês, Kuroda et al. (2009), descreveram 85 casos de carcinoma mamário, dos quais 11 (12,9%) eram triplo-negativos, e 8 foram considerados basais, correspondendo a 72,2% dos casos TN.

RAKHA et al. (2007) publicaram uma carta ao editor em que discordando de HUO et al (2009), que afirmavam que os tumores TN e os carcinomas basais seriam uma mesma entidade, por terem encontrado 91% de tumores basais dentre os TN por eles descritos. REIS-FILHO e TUTT (2007) repetem a pergunta sobre a sinonímia destas duas entidades e concluem afirmando que as mesmas não são sinônimas.

Concordando com as afirmações citadas acima (RAKHA et al, 2007; REIS-FILHO e TUTT, 2008), entendemos que os tumores basais correspondem a um percentual importante dos tumores triplo-negativos, devendo ser melhor conhecido e diferenciados dos demais tumores triplo-negativos, para os quais ainda se busca uma melhor terminologia, do que as atualmente utilizadas como, *não-basal-like* ou *normal-like*. Dentro deste contexto, recentemente PARKER et al. (2009), questionam não apenas a terminologia *normal-like*, mas a própria existência deste subgrupo, desde que estes autores, tem suspeitado de que o perfil normal-like, seja de fato, um artefato contendo um alto percentual de “contaminação”, de tecido normal na espécime tumoral. Adicionalmente estes autores aventam outras possíveis explicações, entre as quais, a de que trata-se de um grupo de tumores basais de crescimento lento, em que há ausência de expressão de genes de proliferação, ou até mesmo a de que trata-se de um potencial novo subtipo, que tem sido referido como tumores claudin-low.

Em relação ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), o outro marcador definidor do perfil basal utilizado neste estudo, positividade em 24 amostras de tumores triplo-negativos, correspondendo a 32,9% dos tumores TN, mas correspondendo a 63,2% dos tumores basais, o que contrasta com os achados de HUO et al. (2009), que encontraram 93% de imunomarcção para EGFR entre os tumores basais. Viale et al (2009) encontraram positividade para este marcador em 136 casos, o que correspondeu a 55,5% da sua amostra de tumores basais. Os mesmos autores correlacionam a positividade do EGFR a um pior prognóstico nas pacientes portadoras de tumores triplo-negativos.

No presente estudo, além dos dois marcadores já citados para definir o perfil basal, também foram avaliados p63 e CK14. Para o p63, foi encontrada positividade em 18 amostras, 12 amostras de tumores basais (31,6%) e 6 (16,7%) casos de tumores não-basais. No trabalho de VIALE et al. (2009), foi relatada a presença de imunomarcção de p63 em 136 casos de tumores basais, correspondendo a 66,5%, uma frequência bem mais elevada que aquela aqui relatada. MATOS et al. (2005) encontraram positividade para imunomarcção de p63 em 20,1%, de 154 casos

avaliáveis de carcinomas invasivos de mama. MATKOLVIC et al. (2008), em estudo por imunohistoquímica de tumores medulares, realizado na Croácia, encontraram positividade de p63 em 24 de 48 casos estudados, correspondendo a 50% desta amostra de tumores medulares. HUO et al.(2009) relataram a imunomarcação de p63 em 9% dos tumores basais, resultado este bastante inferior àquele por nós encontrado (31,6%), e ainda bem inferior que aquele relatado por VIALE et al. (2009).

A imunomarcação da citoqueratina 14 (CK14), em nosso estudo, foi positiva em 7 (18,4%) amostras de tumores basais e em apenas um caso de tumor não-basal (2,8%). VIALE et al. (2009) em 245 tumores basais encontram imunomarcação para esta citoqueratina basal em 153 amostras, o que correspondeu a 62,4%, achado este bastante diferente do que o encontrado no estudo aqui apresentado. TAN et al. (2008), em estudo realizado no Reino Unido, encontraram imunomarcação para CK14 em 51,6% das amostras de tumores triplo-negativos, também bem superior ao nosso achado.

Tais diferenças podem dever-se a *backgrounds* genéticos diferentes, critérios de seleção diferentes, além de possíveis variações técnicas já que se tratam de estudos retrospectivos de material arquivado. Não houve associação da expressão de EGFR com outros fatores clínicos ou patológicos, nem com sobrevida, na nossa amostra.

Após análise dos critérios de definição de tumor basal, marcadores basais e EGFR, e seus resultados, fizemos análise dos nossos achados relativos a marcação para alguns fatores de crescimento e seus receptores.

O fator de crescimento epidérmico (EGF) não mostrou diferença com significância estatística quando comparamos os subgrupos basal e não-basal (65,8% x 52,8%), mas esteve associado com pior sobrevida global. Na análise

multivariada, entretanto, esta associação deixou de existir. Vale ressaltar que mesmo sem significância estatística, na análise global dos tumores triplo-negativos, observou-se imunomarcção para EGF em parcela importante deste grupo (65%). Tal achado pode nos sugerir que a ativação da via EGF/EGFR esteja relacionada à fisiopatologia e à biologia dos tumores triplo-negativos, embora não disponhamos de dados desta imunomarcção em tumores não triplo-negativos, em nossa casuística.

É sabido da literatura que a ativação da sinalização do EGFR pelo seu ligante EGF parece regular a invasão e migração de células epiteliais mamárias malignas, associadas à transição epitélio-mesenquimal (EMT), assim como modular os estágios iniciais do desenvolvimento da glândula mamária (HARDY et al., 2010).

Algumas das evidências favorecendo o EGF como indutor-chave da invasividade das células tumorais vêm de estudos *in vitro* e *in vivo* com células obtidas de câncer mamário de camundongo. Como muitas células epiteliais, células de carcinoma mamário expressam receptores de EGF, e a ativação destes receptores por EGF faz com que estas células adquiram mobilidade, invasividade e secretem o fator estimulador de colônias 1 (CSF-1), o que lhes permite recrutar macrófagos do estroma e estimulá-los a produzirem mais EGF, resultando em uma alça de retroalimentação positiva entre estes dois tipos celulares. Análises por PCR mostraram que os níveis de RNAm destes dois fatores de crescimento e seus receptores são reciprocamente expressos em células de carcinoma mamário que surgem em camundongos transgênicos com tendência a câncer, e em macrófagos estromais recrutados (WYCKOFF et al., 2004; GOSWAMI et al., 2005). Entretanto, a demonstração desta interação recíproca entre macrófagos do microambiente tumoral e células do carcinoma mamário em humanos não está tão bem estabelecida, muito menos nos carcinomas mamários triplo-negativos.

LU e KANG em recente artigo (2010) relacionaram o EGF ao desenvolvimento ósseo fisiológico, bem como à sinalização para a patogênese da metástase óssea em diversos tipos de câncer, em especial, o câncer mamário e

prostático. Os mesmos autores chegam a sugerir a utilização da via de sinalização de EGF como desenvolvimento de terapia alvo para metastáse osteolítica.

Em nossa amostra, foi encontrada significância estatística ao comparar a imunomarcção para o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), nos subgrupos basal e não-basal. O fator de crescimento epidérmico (EGF) não mostrou diferença com significância estatística quando comparamos os subgrupos basal e não-basal (65,8% x 52,8%), mas esteve associado com pior sobrevida global, entretanto na análise multivariada esta associao deixou de existir.

RAICA e CIMPEAM (2009), revisaram dados da literatura sobre a expressao de PDGF e seu receptor, PDGFR, em diversos tipos de neoplasia, entre elas, o carcinoma mamário. Estes autores comentam que níveis elevados de PDGF e PDGFR em pacientes com câncer têm sido correlacionados com pior resposta à quimioterapia, com conseqente pior sobrevida. Apesar de, no nosso estudo, termos encontrado maior frequência do PDGF nos tumores basais, tidos como de maior agressividade, não foi encontrada correlação, com significância estatística, da presença do PDGF e uma pior sobrevida. Estes mesmos autores ainda citam que em modelos experimentais de xeno-enxertos, a inibicao do PDGF leva a uma diminuição da pressão do fluido intersticial e conseqente aumento do efeito da quimioterapia.

Fazendo parte de uma gama de ligantes e receptores relacionados ao processo da angiogênese, juntamente com o VEGF e o FGF2, o PDGF e seus ligantes PDGFRA e PDGFRB, nos últimos dez anos, tiveram estudados os seus papeis na angiogênese em situações fisiológica e tumoral. O PDGF é um dímero de 30 Kda, com duas cadeias, A e B. O PDGF sinaliza através de receptores tirosina quinase da superfície celular, ativando a VEGF-A, e conseqente desenvolvimento da angiogênese. A ativação da via PDGF/PDGFR leva a resposta celular como proliferação e migração. Os mecanismos de mediação da angiogênese através

PDGF/PDGFRs ainda não estão completamente elucidados, mas há demonstrações de que inibidores de tirosina quinase levam a uma redução do crescimento tumoral e da angiogênese em modelos experimentais. (RAICA & CIMPEAM, 2009).

O receptor alfa do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRA) foi encontrado em 59 (79,7%) amostras de tumores triplo-negativos. Ao serem analisados os subgrupos, este marcador foi positivo em 35 (92,1%) casos de tumores basais e em 24 (66,7%) casos de tumores não basais, tal associação foi estatisticamente significativa ($p=0,004$). A expressão de PDGFRA também esteve associada com pior sobrevida nas portadoras de tumores triplo-negativos como um todo. Até onde pesquisamos na literatura, este é de fato, o primeiro relato de correlação positiva entre PDFRA e o subgrupo de tumores basais em uma amostra de tumores triplo-negativos, bem como com a sobrevida destas pacientes.

CARVALHO et al. (2005), em estudo realizado no Instituto de Patologia Molecular e Imunologia da Universidade do Porto, encontraram expressão de PDGFRA em 39,2% dos carcinomas mamários e correlacionam a positividade deste marcador com maior frequência de metástase linfonodal, expressão de ERBB2 e bcl2, portanto, com parâmetros de maior agressividade biológica. Esta amostra, entretanto, não era de tumores basais, ou mesmo triplo-negativos.

A imunomarcção do receptor beta do fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFRB) foi positiva em 27 (36,5%) das amostras de tumores triplo-negativos. Nos tumores basais, a imunomarcção foi positiva em 14 (36,8%) amostras, enquanto que nos tumores não-basais, a imunomarcção para o PDGFRB foi positiva em 13 (36,1%) amostras, sem associação com o fenótipo ($p=0,430$). VREKOUSSIS et al. (2007), ao estudarem 33 amostras de carcinoma mamário comparando-as com 30 amostras de tecido mamário normal, relataram a imunomarcção do PDGFRB em 69,7% dos carcinomas. Os referido autores compararam o seu achado com a imunomarcção para PDGFRB de 43,3% em

células mamárias normais, concluindo que a imunomarcagem para PDGF/PDGFRB pode ser uma maneira de selecionar pacientes que se beneficiam de terapia anti-angiogênica, como o tratamento com imatinibe . Acreditamos não ser possível a comparação com o resultado encontrado em nosso estudo, visto que VREKOUSSIS et al. (2007) não estudaram especificamente os tumores triplo-negativos.

JECHLINGER et al. (2006) correlacionaram a imunopressão de PDGFR ao desenvolvimento metastático no câncer mamário, os mesmo autores estudaram a intensidade da imunomarcagem do PDGFRA e PDGFRB no tecido mamário normal, no carcinoma in situ e no carcinoma invasivo. Estes marcadores se mostraram ausentes no tecido mamário normal, com imunomarcagem leve a moderada nos carcinomas in situ, e a imunomarcagem intensa foi encontrada apenas nos carcinomas invasivos.

O fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFA) apresentou imunomarcagem em nove (12,2%) amostras de tumores triplo-negativos, sendo 6 amostras de tumores basais e 3 de tumores não-basais, apesar da aparente diferença, o dobro de casos no subgrupo basal, o mesmo não apresentou significância estatística. O papel da angiogênese na tumorigênese tem sido exaustivamente estudado nos últimos trinta anos, com mais de 17.000 publicações sobre o tema.(ELLIS e HICLIN, 2008). Das moléculas com potencial angiogênico, a mais estudada delas é a VEGF, a qual estimula fortemente as células endoteliais no tecido normal, bem como no tecido tumoral. O VEGF secretado tanto pelas células normais, bem como pelas células tumorais induz a angiogênese ao ligar-se aos receptores VEGFR1 e VEGFR2. LINDERHOLM et al. (2009) relataram o achado de imunomarcagem elevada de VEGF elevado em tumores triplo-negativos, relacionando-o com uma pior sobrevida em tumores operáveis. HUO et al. (2009) encontraram imunomarcagem para este fator de crescimento em 84% dos casos de tumores basais, resultado este bem mais elevado que o encontrado no presente estudo.

Hombrey et al. (2003), analisaram diariamente por 13 dias, pacientes submetidas à cirurgia para ressecção de câncer, reconstrução mamária tardia após cirurgia para câncer de mama e pacientes submetidas à mamoplastia redutora e compararam os níveis de VEGF na ferida operatória e VEGF sérico entre os três grupos. Os referidos autores encontraram um maior pico de VEGF no segundo dia pós-operatório, tanto na ferida operatória, bem como a nível sérico, sendo a liberação de VEGF mais intensa na mamoplastia redutora que na reconstrução tardia, por câncer, e esta mais elevada que na cirurgia para ressecção do tumor mamário. Os mesmos autores encontraram significância ao comparar a resposta do VEGF nas pacientes portadoras de neoplasia mamária (no momento da ressecção do tumor primário ou mesmo no momento da reconstrução tardia) com as pacientes que não apresentavam neoplasia mamária e foram submetida a mamoplastia redutora. Porém os autores neste estudo, não levaram em conta a heterogeneidade do câncer de mama e seus diferentes perfis moleculares.

Foi encontrada imunomarcção para o receptor 2 do fator de crescimento do endotélio vascular (VEGFR2) em 45 (60,8%) amostras de tumores triplo-negativos. Esta marcação foi positiva em 26 (68,4%) casos de tumores basais e em 19 (52,7%) amostras de TN não-basais. Apesar de não ter sido encontrada significância estatística ao comparar a frequência deste marcador entre os subgrupos basal e não-basal ($p = 0,442$), quando avaliada a sobrevida pela curva de Kaplan-Meier, as pacientes com imunomarcção para VEGFR2 tiveram pior sobrevida que aquelas sem imunomarcção para este marcador, com significância estatística. Achado semelhante foi encontrado por RYDÉN et al. (2010), que relataram menor sobrevida em cinco anos das pacientes triplo-negativas, $HR=2.6$ (95%[1,1; 6,3], $p = 0,03$), cujo tumor expressa VEGFR.

O fator de crescimento de fibroblastos (FGF2), se mostrou positivo em todos os casos analisados (74), tanto no subgrupo de TN basais, bem como no subgrupo de não-basais. Apesar da impossibilidade de análises estatísticas, vale ressaltar a alta positividade deste fator de crescimento. RAJKUMAR (2001) relaciona a positividade de FGF2 com maior agressividade e tendência à metastatização, o que

é encontrado nos tumores prostáticos. A inferência da associação de FGF2 com agressividade tumoral pode ser relacionada com nosso achado de 100% de imunomarcção de FGF2 nos tumores triplo-negativos, tanto basais como não-basais. O FGF2 e o FGFR2 controlam uma variedade de funções biológicas, regulando a proliferação celular, migração e diferenciação. O FGF tem importante papel fisiológico na cicatrização, bem como na angiogênese. A desregulação da sinalização de FGF2 leva à proliferação e desenvolvimento tumoral (TURNER e GROSE, 2010). RELF e col. (1997) relataram uma alta marcação deste fator de crescimento quando analisadas peças de mamoplastia, sem diagnóstico de neoplasia maligna.

No presente estudo, ao ser avaliado o receptor 2 do fator de crescimento de fibroblastos (FGFR2), foi encontrado positividade à imunomarcção em 52 (70,3%) casos. No subgrupo basal, foi positivo em 31 (81,6%) casos e no subgrupo não-basal apresentou imunomarcção em 21 (58,3%). Ao submeter este resultado ao teste de Fisher, o mesmo não mostrou significância estatística ($p = 0,093$). TANNHEIMER et al. (2000), relataram a amplificação deste marcador em 5 a 10% dos tumores mamários, porém sem fazer relação aos tumores triplo-negativos ou basais. Existem evidências de que a via de sinalização modulada por FGF está relacionada com diversas neoplasias, além de apresentar um extenso *crosstalk* com a via da angiogênese mediada por VEGFR, além de poder ser parte de um dos mecanismos resistência à terapia alvo anti-VEGFR (revisado em TURNER e GROSE; 2010).

A fase seguinte do estudo consistiu da análise de quatro fatores relacionados à inflamação: cicloxigenase 2 (COX2), óxido nítrico sintase 2 (NOS2), interleucina 1 β (IL1 β) e TLR9 (*Toll-like receptor 9*). Caracteristicamente, os tumores triplo-negativos, notadamente os basais, apresentam um infiltrado linfocítico em sua periferia, sugerindo que o processo inflamatório tenha um papel na biologia deste tumor (LIVASY et al. 2006; FULFORD et al. 2006).

A análise da imunomarcção da enzima cicloxigenase-2 (COX2) mostrou positividade em 17 (23%) amostras, sendo que 14 (36,8%) destas eram de tumores TN basais, e apenas 3 (8,3%) dos TN não-basais. Esta diferença foi estatisticamente significativa com $p=0,014$. RISTIMAKI et al. (2002), ao analisarem a imunomarcção de COX2 em tumores mamários, sem levar em conta seu perfil molecular, pontuaram a marção em 4 graus, ausente, leve, moderada e forte, aqueles com marção forte e moderada correponderam a 37,4% de 1576 tumores invasivos de mama, o que apresentou correlação com tumores de alto grau, tumores de tamanho maior, ausência de expresso de receptores hormonais, alta expresso de p53, presença de positividade para ERBB2 e menor intervalo livre de doença. LUCCI et al. (2008) correlacionaram a imunomarcção de COX2 com o desenvolvimento de metástase para médula óssea. NES e col. (2009) correlacionaram a imunomarcção de COX2 com pior prognóstico na ausência de terapia sistêmica como quimioterapia ou hormonal, com aumento de risco de recidiva e morte, porém os dados disponiveis não suportam a inferência de COX2 como fator prognóstico independente dos fatores prognósticos clássicos como idade e *status* axilar e doença.

Ao ser estudada a imunomarcção da óxido nítrico sintase (NOS2), esta foi positiva em 36 (48,6%) amostras. No subgrupo de tumores basais, 15 (39,5%) casos apresentaram positividade versus 21 (58,3%) dos tumores não-basais. Esta diferença, aparentemente pequena, se associou significativamente ($p=0,018$) com o fenótipo não-basal. Sua análise foi inconclusiva em 8 amostras. Observamos impacto negativo da expresso de NOS2 na sobrevida global. THOMSEN et al. (1995) foram os primeiros a avaliar a atividade de NOS2 em tecido mamário neoplásico, bem como a sua expresso imunoistoquímica, verificando a associao de ambas com maior grau histológico. Dois outros trabalhos, contudo, correlacionam níveis de expresso mais altos de NOS2 com menor índice proliferativo do tumor e consequente menor grau histológico (TSCHUGGUEL et al. 1999; REVENEAU et al. 1999). O nosso achado de imunomarcção para este marcador de inflamação foi de quase 60% em todo o grupo de tumores triplo-negativos, sem diferença estatística entre os subgrupos, embora um pouco superior no subgrupo não-basal, o que tentamos correlacionar com o grau de diferenciação. Conforme a literatura, grau histológico normalmente é elevado nos tumores triplo-negativos, sendo ainda mais

elevados nos tumores basais (LIVASY et al, 2006; CHEANG et al. 2008). No nosso estudo encontramos, no subgrupo basal, 45,5% de tumores GIII e 34,8% no subgrupo não-basal, e uma grande parcela de tumores GII, 54,5% no subgrupo basal e 47,8% no subgrupo não-basal. Semelhante ao estudo de THOMSEN et al. (1995), encontramos uma frequência de marcação maior para os graus II e III (47,6% para ambas as categorias, comparado a 4,8% entre os tumores de GI), com significado estatístico marginal ($p=0,067$).

Ao ser avaliada a imunomarcação para interleucina-1 beta (IL1B), esta se mostrou positiva em um número importante das amostras 59 (79,7%) de tumores triplo-negativos. Sua avaliação não foi possível em 12 casos (16,2%), sendo 4 de tumores basais e 8 do subgrupo não-basal. Ao analisar o subgrupo de tumores basais, a marcação para IL1B ocorreu em 33 (86,8%) deste subgrupo, sendo negativa em apenas 1 caso. Ao analisar o subgrupo de tumores não-basais a IL1B foi também positiva em 26 casos (72,2%), e negativa em apenas 2 casos. Não se evidenciou associação de IL1B com nenhum dos fenótipos (basal ou não-basal) ($p=0,361$). Mesmo sem apresentar diferença entre os dois subgrupos, marcação para este mediador de resposta inflamatória esteve presente em praticamente 80% dos tumores triplo-negativos.

REED et al. (2009) demonstraram, em modelo animal e *in vitro*, que a inibição da atividade de IL1B em células epiteliais mamárias ativadas por FGFR1 resulta em menores níveis de COX2 e redução da formação de estruturas hiperplásticas induzidas por FGFR1, sugerindo um papel destas duas proteínas (COX2 e IL1B) na tumorigênese mamária. Há dados na literatura que sugerem que a expressão de IL1 é maior nos carcinomas mamários quando comparado com o tecido mamário normal, e ainda, os níveis elevados deste mediador inflamatório se relacionam com maior invasividade, agressividade, angiogênese e inibição da apoptose (PERRIER et al. 2009). Estes dados corroboram a possibilidade da associação da expressão de IL1B e maior agressividade dos tumores triplo-negativos.

Quando analisada a imunomarcação do *Toll-like receptor 9* (TLR9), positividade para o mesmo foi encontrada em 77% das amostras de TN, 86,8% nos tumores das pacientes do subgrupo basal e em 66,7% do subgrupo não-basal. Ao serem comparados estes dois subgrupos, não foi encontrada diferença com significância estatística. Segundo RAKOFF-NAHOUM e MEDZHITOV, em artigo publicado em 2009, a maior parte dos dados referentes à família dos *Toll-like receptors* é em relação ao processo inflamatório, com informações ainda escassas no que diz respeito ao seu papel na carcinogênese. Além do papel no processo inflamatório, os mesmos autores relacionaram a ação dos TLRs com a homeostasia tissular, reparo e regeneração tecidual, sendo a sinalização por TLR9 dependente da produção de COX2 pelo estroma tissular. Os autores citados acima relatam que a resposta inflamatória ainda promove a carcinogênese por múltiplos mecanismos, porém, consideram ser um grande desafio se esclarecer melhor a relação do processo inflamatório e a tumorigênese. MERREL et al. (2006) observaram que a estimulação de TLR9 em linhagens de câncer mamário esteve associada com maior invasividade e produção de metaloproteínases, especialmente MMP-13, o que, em modelos *in vivo*, poderia estar associado com comportamento mais agressivo.

JUKKOLA-VUORINE et al. (2008) encontraram expressão do TLR9 na quase totalidade dos 141 tumores mamários estudados, estando presente em 98% dos casos. A intensidade da marcação foi maior em tumores receptores hormonais negativos quando comparada com tumores receptores positivos, podendo ser feita uma correlação com o achado do estudo por nós apresentado no qual foi encontrado positividade para TLR9 em 86,8% dos tumores triplo-negativos. Os mesmos autores demonstraram associação entre o grau histológico e a imunomarcação positiva, havendo correlação dos tumores de alto grau com maior expressão de TLR9. Da mesma forma, os mesmos autores mostram sobrevida livre de doença mais longa entre os pacientes com baixa expressão de TLR9. Na nossa amostra, não verificamos associação do grau histológico com a expressão de TLR9, entretanto a maior parte da mostra era composta de tumores com GII e GIII.

Diversos autores, relatam uma predileção dos tumores basais em apresentarem recidiva hematogênica, em especial pleuropulmonar ou cerebral, ao invés de recidiva linfonodal ou óssea, como nos demais perfis de tumores mamários (DENT et al. 2009; ANDERS e CAREY 2008). No estudo ora apresentado foi encontrado relato de recidiva sistêmica em 19 pacientes, o que correspondeu a uma taxa de 25,7%, enquanto que a recidiva loco-regional foi relatada em 07 casos (10,4%). No subgrupo basal, 34,4% desenvolveram doença sistêmica, enquanto que no subgrupo não-basal o mesmo ocorreu em 22,9%, não tendo sido encontrado significância estatística ($p=0,244$). Corroborando a idéia da preferência da disseminação sistêmica, Freedman et al. (2009) afirmaram que quando realizada a cirurgia conservadora seguida de radioterapia, a taxa de recorrência loco-regional nos tumores triplo-negativos não foi mais elevada que nos demais tumores. ONITILLO et al. (2009) analisaram a localização de recidiva tumoral, comparando os seguintes grupos: (ER+/RP+/ERBB2-, RE+/RP+/ERBB2+, RE-/RP-/ERBB2+ e RE-/RP-/ERBB2-), não tendo encontrado diferença na taxa de recidiva loco-regional quando o grupo de tumores triplo-negativos foi comparado com os demais. Da mesma forma, quando analisou a recidiva cerebral, esta não foi mais frequente nas pacientes portadores de tumores TN, que nas demais, já a recidiva óssea foi menos frequente no subgrupo triplo-negativo.

ANDERS e CAREY (2008) estudaram os padrões de recorrência sistêmica, afirmando que as recidivas pulmonares e cerebrais foram encontradas mais frequentemente nos tumores basais que nos luminais. Já a recorrência óssea foi encontrada com maior frequência nos tumores luminais. Em nosso estudo, foram encontrados seis casos de recidiva pleuropulmonar, sendo quatro no subgrupo basal e dois no subgrupo não-basal, foram encontrados três casos de metástases hepáticas no subgrupo basal e nenhum caso no subgrupo não-basal. O estudo do M. D. Anderson (Liedtke et al. 2008) relatou a predileção de recidiva visceral e partes moles em tumores TN, com baixa taxa de recidiva óssea ($p=0,027$). RAKHA et al. (2006) também relataram maior predileção da disseminação sistêmica, com maior frequência de metástases hepática, pulmonar e cerebral, sendo estas três vezes mais frequentes que as metástases ósseas. MUÑOZ et al. (2008) compararam a taxa de recidiva dos tumores TN como a dos luminais e do perfil

ERBB2 +, encontrando maior taxa de recidiva nos tumores ERBB2 (39,4%), seguida dos tumores basais (30,8%) e as melhores taxas de sobrevidas nos luminais A (19%) e B (25,4%).

Foram analisadas as pacientes que apresentaram recidivas, num total de 24 pacientes. Das 15 pacientes do subgrupo basal que vieram a recidivar, o intervalo livre de doença (ILD) foi de 20,4 meses, enquanto que no subgrupo não-basal o ILD foi de 27 meses. ONITILLO et al. (2008) relataram sobrevida livre de doença em 05 anos de 73,5% nos tumores TN, dado este superior ao encontrado nas pacientes portadoras de tumores ERBB2 + (66%), porém bastante inferior que aquela encontrada nos grupamentos de pacientes portadoras de tumores luminais A (86,8%) e B (83,2%). LIN et al. (2009) ao comparar o sobrevida livre de doença nas pacientes portadoras de tumores TN e não-TN encontraram uma razão de risco para recidiva de 1,28 (95%IC [0,82; 1,99]; $p=0,2835$) para os TN, sem diferença mesmo após análise das pacientes axila positiva e negativa agrupadas.

Ao ser analisada a sobrevida global, foi encontrada uma mediana de 38 meses nos tumores TN, sendo 36 meses no subgrupo basal e 39 meses no subgrupo não-basal. DE BROT et al. (2009) encontraram resultados inferiores aos achados neste estudo no que se refere à sobrevida, com 28 meses de sobrevida nas pacientes portadoras de tumores TN. Quando comparou os subgrupos basal e não-basal, esta foi inferior no subgrupo basal. A publicação de DE BROT et al. (2009) apresentou ainda semelhanças com o estudo ora apresentado, ambos encontraram pior sobrevida no subgrupo basal, porém sem significância estatística. LIN et al. (2009) também realizaram estudo comparando a sobrevida das pacientes portadoras de TN com pacientes portadoras de tumores não-TN, os mesmos encontraram razão de risco de morte para as pacientes portadoras de TN de 1,99 (IC95% [1,26; 3,13]; $p=0,0031$). LIEDTKE et al. (2008) analisaram a sobrevida livre de doença em três anos e encontraram um pior resultado nos TN quando comparados com tumores não triplo-negativos (74% x 89%). ELIAS (2009), em artigo de revisão, mostra que os tumores classificados como triplo-negativos não

apresentam pior prognóstico em relação aos demais tumores mamários, e ainda que o pior prognóstico estaria relacionado ao fenótipo basal, com esta definição enfatizamos a importância de se definir os tumores basais dentre os triplo-negativos.

Sendo o câncer de mama, uma doença heterogênea, uma de suas formas de apresentação, os tumores triplo-negativos, e dentre estes, os tumores basais, por suas características de maior agressividade, capacidade de metastatização e carência de tratamento sistêmico eficaz, necessitam ser melhor estudados e de terapias específicas para esta forma de apresentação do câncer de mama.

O tratamento do câncer é interdisciplinar envolvendo aspectos loco-regionais com cirurgia e radioterapia e sistêmicos, com quimioterapia, hormonioterapia e algumas formas de tratamento utilizando drogas-alvo. Porém os tumores triplo-negativos, apesar de sua característica de maior agressividade, não respondem à terapia hormonal seja com tamoxifeno ou inibidores da aromatase, tampouco ao anticorpo monoclonal trastuzumabe. Daí a necessidade de novas pesquisas envolvendo este subtipo de câncer, que acomete aproximadamente 15% dos casos de câncer mamário.

LIU e colaboradores publicaram, em 2009, artigo que mostra que o hipoglicemiante metformina teria ação nos células de tumores epiteliais mamários triplo-negativos tratadas *in vitro*, sendo esta por pelo menos dois mecanismos, ambos envolvendo ativação da AMP-activated protein kinase (AMPK). A metformina no fígado leva a inibição da gliconeogênese, diminuição da glicemia e uma diminuição secundária dos fatores de crescimento ligados à insulina e fatores de crescimento insulina-símile (IGFs). Na célula neoplásica, a metformina ativa a AMPK, inibindo mTOR. Interessante ressaltar a efetividade desta droga nos tumores triplo-negativos, o que não ocorreu nos tumores não triplo-negativos.

Grande percentual de tumores triplo-negativo apresentam imunomarcacão para EGFR, variando de 45 a 70% segundo BOSCH et al. (2010). Em nosso estudo foi encontrada positividade para EGFR em 63,2% da amostra de tumores TN, daiser uma interessante linha de pesquisa, a utilizao de antagonista de EGFR. O'SHAUGHNESSY et al. (2007) realizaram estudo fase II no qual utilizaram cetuximabe, avaliando sua ao em doença metastática, ao associ-lo  quimioterapia, tendo observado uma taxa de resposta objetiva de 39% quando associado  quimioterapia, e 19% ao não utilizar esta modalidade de terapia alvo, porém as taxas de toxicidades foram bastante elevadas. CAREY et al. (2008) apresentaram estudo em que utilizaram cetuximabe isolado ou associado  carboplatina. Quando isolado, o cetuximabe foi bem tolerado, porém, apresentou uma taxa de resposta baixa, quando associada ao quimioterápico (carboplatina) a taxa de resposta foi de 18% e o benefício clínico de 27%.

Conforme apresentado, os tumores triplo-negativos associam-se a imunoeexpresso de diversos marcadores relacionados  angiogênese. A utilizao de drogas anti-angiognicas constitui importante linha de pesquisa, no intuito de descobrir uma terapia voltada para este tipo especial de câncer de mama. BOSCH et al. (2010) citam os estudos AVADO e E2100 que utilizaram o bevacizumabe, porém não incluíram exclusivamente pacientes com tumores triplo-negativos ou basais. Os mesmos autores ainda citam a existência de um grande número de estudos em andamento utilizando bevacizumabe e outras drogas anti-angiognicas.

A mais recente linha de pesquisa se relaciona com o uso de inibidor da *PARP*. Segundo BOSCH et al. (2010) a *PARP* (*poly ADP-ribose polymerase*) tem ao na sinalizao do reparo de DNA. Foi apresentado no congresso anual da *American Society of Cancer (ASCO)* em 2009, estudo fase II relatando o uso do inibidor da *PARP*, *BSI-201* associado  quimioterapia (gencitabina e cisplatina), em pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo, mostrando melhora na sobrevida, quando comparados ao grupo que recebeu apenas quimioterapia (O'SAUGNESSY et al. 2009). Outro trabalho apresentado na ASCO/2009,

demonstrou a alta eficácia de olaparibe (outro inibidor de PARP) nas pacientes triplo-negativas que apresentavam mutação de BRCA1/2 (TUTT et al. 2009).

Hoje, o câncer de mama é definido como uma doença heterogênea. O conhecimento de seu perfil molecular ou mesmo sua classificação utilizando-se da imunohistoquímica, e a inclusão destes marcadores como fatores prognósticos e preditivos de tratamento são necessários para a escolha individualizada e adequada para cada paciente.

O nosso estudo tem algumas deficiências comuns a levantamentos retrospectivos a partir de dados registrados em prontuário, com seus conhecidos vieses, mas agrupa uma população uniforme de pacientes portadoras de tumores triplo-negativos e fornece informações sobre esta variante na população brasileira.

Da mesma forma, se faz necessário classificar os tumores de mama, como luminais, ERB2 (+) e triplo-negativos. Entendemos também que, dentre os triplo-negativos, faz-se necessário a distinção entre basais e não-basais, visto que em nosso estudo, confirmamos, nas pacientes jovens, o achado de literatura de que as pacientes portadoras de tumores basais apresentaram pior sobrevida, quando comparadas às pacientes portadoras de tumores não-basais, o mesmo não sendo observado para pacientes com mais de 50 anos.

Encontramos associação da presença da imunomarcagem de PDGF, PDGFR e COX2 com o fenótipo basal, enquanto que a NOS2 mostrou associação com o perfil não-basal. Consideramos este achado como uma contribuição na distinção de tumores basais e não-basais dentre os triplo-negativos, entretanto como não avaliamos outros subgrupos de tumores de mama, não podemos afirmar que se tratam de achados exclusivos destes subgrupos.

A imunomarcção para VEGFR e PDGFRA apresentou associao com pior sobrevida, achado este que pode sugerir a incorporao da pesquisa destes marcadores na avaliao de tumores triplo-negativos bem como sugerir alguma atividade de terapias-alvo anti-VEGFR ou anti-PDGFR para este grupo selecionado de pacientes.

Embora alguns padroes e associao aqui relatados ja estejam bem descritos na literatura, em nosso conhecimento esta e a primeira vez que se relata a associao de PDGF e PDGFRA com o fenotipo basal, bem como da expressao de PDGFRA com pior sobrevida.

6 CONCLUSÕES

A partir dos resultados deste estudo podemos concluir que:

- A maioria das pacientes possuía história familiar de câncer de mama ou ovário, eram portadoras de tumores maiores que 2,0cm, de alto grau nuclear e histológico.
- Grau nuclear mais elevado esteve associado com perfil basal.
- Todos os fatores de crescimento testados, seus receptores e os marcadores de inflamação foram expressos em tumores desta amostra em maior ou menor grau.
- A expressão de COX2, PDGF e PGFRA esteve associada com o fenótipo basal.
- Não houve associação entre os fenótipos basal e não-basal e o padrão de metastáses.
- A sobrevida global foi inferior para as pacientes portadoras de tumores basais com menos de 50 anos, não se observando diferença em sobrevida por fenótipo tumoral para indivíduos com mais de 50 anos.
- O imunofenótipo basal esteve associado com pior sobrevida global para as pacientes de cor parda, com presença de metástases ao diagnóstico e cujos tumores expressavam PDGF, VEGFR ou NOS2.
- A sobrevida global das pacientes desta amostra esteve negativamente associada com estadiamento clínico mais avançado, tumores maiores, comprometimento axilar clínico, presença de metástases ao

diagnóstico, estadiamento patológico agrupado e estadiamento T patológico mais avançados, não realização de cirurgia ou realização de cirurgia conservadora, quimioterapia neoadjuvante e ausência de resposta clínica a mesma, não realização de quimioterapia adjuvante, presença de recidiva, expressão de EGF ou PDGFRA no tumor.

- Perfil imunohistoquímico (basal), comprometimento axilar (N2), não realização de cirurgia e quimioterapia neoadjuvante estiveram associados de forma independente com maior risco de morte.

7 PERSPECTIVAS

Pretendemos rever os dados referentes ao grau histológico e nuclear, bem como invasão linfática e vascular, para os quais houve uma perda grande de informação, a fim de permitir uma melhor avaliação das variáveis associadas de forma independente com a sobrevida.

Estamos validando o papel da expressão de PDGFRA e PDGF numa amostra independente de tumores triplo-negativos.

Pretendemos testar a expressão de PDGFRA em uma linhagem de tumor de mama e, se positiva, avaliar a atividade de inibidores de PDGFR (dasatinibe, sorafenibe e sunitinibe) nesta linhagem.

REFERÊNCIAS

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

Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology* 2008;22:1233-9.

Araújo AP, Ribeiro R, Pinto D, et al. Epidermal Growth Factor Genetic Variation, breast cancer risk, and waiting time to onset of disease. *DNA cell biol.* 2009;28:265-269.

Bane AL, Pinnaduwage D, Colby S, et al. Expression profiling of familial breast cancers demonstrates higher expression of FGFR2 in BRCA2-associated tumors. *Breast cancer res. treat.* 2009;117:183-91.

Barnes DM, Hanby AM. Oestrogen and progesterone receptors in breast cancer: past, present and future. *Histopathology.* 2001; 38:271-4.

Barry WT, Kernagis DN, Dressman KH, et al. Intratumor heterogeneity and precision of microarray-based predictors of breast cancer biology and clinical outcome. *J. clin. oncol.* 2010;28:2198-206.

Battifora H, Mehta P, Ahn C, et al. Estrogen receptor immunohistochemical assay in paraffin-embedded tissue: a better gold standard?. *Appl. immunohistochem.* 1993;1:34-45.

Berger R, Fiegl H, Goebel G, et al. Toll-Like receptor 9 expression in breast and ovarian cancer is associated with poorly differentiated tumors. *Cancer sci.* 2010;101:1059-66.

Bennett A. The production of prostanoids in human cancers, and their implications for tumor progression. *Prog. lipid res.* 1986;25:539-42.

Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int. j. clin. exp. pathol.* 2009;2:444-55.

Bosch A, Eroles P, Zaragoza, et al. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer treat. rev.* 2010;36:206-215.

Bos PD, Zhang X F, Nadal C, et al. Genes that mediate breast cancer metastasis to the brain. *Nature.* 2009;459:1005-9.

Bouchalova K, Cizkova M, Cwiertka K, et al. Triple negative breast cancer – current status and prospective targeted treatment based on HER1 (EGFR), TOP2A and C-MYC gene assessment. *Biomed. pap. med. Fac. Univ. Palacky Olomouc Czech Repub.* 2009;153:13-8.

Brandis A, [Mirzai S](#), [Tatagiba M](#), et al. Immunohistochemical detection of female sex hormone receptors in meningiomas: correlation with clinical and histological features. *Neurosurg* 1993;33:212-7.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2005: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2004.

Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, et al. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?. *J. clin. oncol.* 2005;23:7350-60.

Brot M, Soares FA, Stiepcich MM, et al. Carcinomas mamários de tipo basal: perfil clínico-patológico e evolutivo. *AMB rev. Assoc. Med. Bras.* 2009;55:529-34.

Brower V. Search for new treatments intensifies for triple-negative breast cancer. *J. natl. cancer inst.* 2009;101:1536-7.

Brown LF, Detmar M, Claffey K, et al. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor: a multifunctional angiogenic cytokine. *EXS.* 1997;79:233-69.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, et al. Tissue Microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J. pathol.* 2001;195:72-9.

Burstein HJ, Elias AD, Rugo HS, et al. Phase II study of sunitinib malate, an oral multitargeted tyrosine kinase inhibitor, in patients with metastatic breast cancer previously treated with an anthracycline and a taxane. *J. clin. oncol.* 2008;26:1810-16.

Cano G, [Milanezi F](#), [Leitão D](#), et al. Estimation of hormone receptor status in fine-needle aspirates and paraffin-embedded sections from breast cancer using the novel rabbit monoclonal antibodies SP1 and SP2. *Diagn. cytopathol.* 2003;29:207-11.

Cao Y, Pearman AT, Zimmerman GA, et al. Intracellular unesterified arachidonic acid signals apoptosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 2000;97:11280-5.

Carvalho FM. Histopatologia. In: Barros ACSD, Buzaid AC, editores. *Câncer de mama: tratamento multidisciplinar*. São Paulo: Dendrix Publicações; 2007. p. 3-25.

_____. Assinaturas genéticas no câncer de mama. *Rev. bras. mastol.* 2008;18:132-6.

Carey LA, Dess EC, Sawyer L, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin. cancer res.* 2007;13:2329-34.

Carey LA, Rugo HS, Marcom Pk, et al. TBCRC 001:EGFR inhibition with cetuximab added to carboplatin in metastatic triple-negative(basal-like) breast cancer. *J. clin. oncol.* 2008;26:1009.

Carvalho I, Milanezi F, Martins A, et al. Overexpression of platelet-derived growth factor receptor alfa in breast cancer is associated with tumor progression. *Breast cancer res.* 2005;7:R788-R795.

Cassali GD, Ferreira E, Lima AES, et al. Genética aplicada ao câncer de mama. *Prat. hosp.* 2008;57:15-7.

Castilla EJZ, Money ER, Hubbe MC, et al. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir. ciruj.* 2008;76:87-93.

Chandrasekharan NV, Dai H, Ross KL, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc. natl. acad. Sci. USA.* 2002;99:1326-1331.

Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin. cancer res.* 2008;14:1368-76.

Chen XL, Su BS, Sun RQ, et al. Relationship between expression and distribution of cyclooxygenase-2 and bcl-2 in human gastric adenocarcinoma. *World j. gastroenterol.* 2005 ;11 :1228-31.

Cheng T, Cao W, Wen R, et al. Prostaglandin E2 induces vascular endothelial growth factor and basic-fibroblast growth factor mRNA expression in cultured rat Muller cells. *Invest. Ophthalmol. vis. sci.* 1998;39:581-91.

Cifuentes N, Pickren JW. Metastases from carcinoma of mammary gland: an autopsy study. *J. surg. Oncol.* 1979;11:193-205.

[Clover J](#), [Oates J](#), [Edwards C](#). Anti-cytokeratin 5/6: a positive marker for epithelioid mesothelioma. *Histopathology.* 1997;31:140-3.

Colleoni M, Cole BF, Viale G, et al. Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J. clin. oncol.* 2010;28:2966-73.

Corkery B, Crown J, Clynes M, et al. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Ann. oncol.* 2009;20:862-67.

Cristofanilli M, Morandi P, Krishnamurthy S, et al. Imatinib mesylate (Gleevec) in advanced breast cancer-expressing C-Kit or PDGFR- β : clinical activity and biological correlations. *Ann. oncol.* 2008;19:1713-19.

Daniel TO, Liu H, Morrow JD, et al. Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer res.* 1999;59:4574-7.

Dawood S, Broglio K, Kau SW, et al. Triple receptor-negative breast cancer: the effect of race on response to primary systemic treatment and survival outcomes. *J. clin. oncol.* 2009;27:220-26.

Dent R, Hanna WM, Trudeau M, et al. Time to disease recurrence in basal-type breast cancers. *Cancer*. 2009;115:4917-23.

_____. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. *Breast cancer res. treat.* 2009;115:423-28.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. cancer res.* 2007;13:4429-34.

Dizdar O, Altundag K. Current and emerging treatment options in triple-negative breast cancer. *Oncol. rev.* 2010;4:5-13.

Dickler MN, Cobleigh MA, Miller KD, et al. Efficacy and safety of erlotinib in patients with locally advanced or metastatic breast cancer. *Breast cancer res. treat.* 2009;115:115-21.

Dickler MN, Rugo HS, Eberle CA, et al. Phase II trial of erlotinib in combination with bevacizumab in patients with metastatic breast cancer. *Clin. cancer res.* 2008;14:7878-83.

Dogu GG, Ozkan M, Ozturk F, et al. Triple-negative breast cancer: immunohistochemical correlation with basaloid markers and prognostic value of surviving. *Med. oncol.* In press. 2009.

Elashry-Stowers D, Zava DT, Speers EC, et al. Immunocytochemical localization of progesterone receptors in breast cancer with anti-human receptor monoclonal antibodies. *Cancer res.* 1988;48:6462-74.

Elias AD. Triple negative breast cancer: a short review. *Am. j. clin. oncol.* 2009;XX:000-000.

Ellis LM, Hicklin DJ. VEGF-targeted therapy: mechanisms of anti-tumour activity. *Nat. rev., Cancer*. 2008;8:579-91.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19:403-10.

Emlet DR, Brown KA, Kociban DL, et al. Response to trastuzumab, erlotinib, and bevacizumab, alone and in combination, is correlated with the level of human epidermal growth factor receptor-2 expression in human breast cancer cell lines. *Mol. cancer ther.* 2007;6:2664-74.

Emad AR, El-Rehim DA, Paish C, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur. j. cancer.* 2006;42:3149-56.

Fernandes GS, Calabrich A, Katz A. Câncer de mama triplo-negativo: aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos. *Rev. bras. mastol.* 2009;19:76-82.

Finn RS. Targeting Src in breast cancer. *Ann. oncol.* 2008;19:1379-86.

Finn RS, Press MF, Dering J, et al. Estrogen receptor, progesterone receptor, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), and epidermal growth factor receptor expression and benefit from lapatinib in a randomized trial of paclitaxel with lapatinib or placebo as first-line treatment in HER2-negative or unknown metastatic breast cancer. *J. clin. oncol.* 2009;27:3908-15.

Fisher B, Montague E, Redmond C, et al. Comparison of radical mastectomy with alternative treatments for primary breast cancer. A first report of results from a prospective randomized clinical trial. *Cancer* .1977;39:2827-39.

Fisher ER, Redmond CK, Liu H, et al. Correlation of estrogen receptor and pathologic characteristics of invasive breast cancer. *Cancer.* 1980;45:349-53.

Fosslien E. Biochemistry of cyclooxygenase (COX)-2 inhibitors and molecular pathology of COX-2 on neoplasia. *Crit. rev. clin. lab. sci.* 2000;37:431-502.

Fraschi G, Comella P, Rinaldo M, et al. Preoperative weekly cisplatin-epirubicin-paclitaxel with G-CSF support in triple-negative large operable breast cancer. *Ann. oncol.* 2009;20:1185-92.

Freedman GM, Anderson PR, Li T, et al. Locoregional recurrence of triple-negative breast cancer after breast-conserving surgery and radiation. *Cancer.* 2009;115:946-51.

Friesel RE, Maciag T. Molecular mechanisms of angiogenesis: fibroblast growth factor signal transduction. *FASEB j.* 1995;9:919-25.

Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*. 2006;49:22-34.

Gago FE, Tello OM, Diblasi AM, et al. Integration of estrogen and progesterone receptors with pathological and molecular prognostic factors in breast cancer patients. *J. steroid. biochem. mol. biol.* 1998;67:431-7.

Galvin BD, [Hart KC](#), [Meyer AN](#), et al. Constitutive receptor activation by Crouzon syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor (FGFR)2 and FGFR2/Neu chimeras. *Proc. natl. acad. Sci. USA*. 1996;93:7894-9.

Geller DA, Billiar TR. Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer metastasis rev.* 1998;17:7-23.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, et al. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int. j. cancer*. 1983;31:13-20.

Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, et al. Triple-negative breast cancer-current status and future directions. *Ann. oncol.* 2009;20:1913-27.

Goswami S, Sahai E, Wyckoff JB, et al. Macrophages promote the invasion of breast carcinoma cells via a colony-stimulating factor-1/epidermal growth factor paracrine loop. *Cancer res.* 2005;65:5278-83.

Haffty BG, Yang Q, Reiss M, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J. clin. oncol.* 2006;24:5652-57.

Hagemann T, Robinson SC, Schulz M, et al. Enhanced invasiveness of breast cancer cell lines upon co-cultivation with macrophages is due to TNF-alpha dependent up-regulation of matrix metalloproteases. *Carcinogenesis*. 2004;25:1543-9.

Hakha EA, ABD EL Rehim D, Pinder SE, et al. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology*. 2005;46:685-93.

Hardy KM, Booth BW, Hendrix MJ, et al. ErbB/EGF signaling and EMT in mammary development and breast cancer. 2010;15:191-9.

Harris RE, editor. COX-2 in cancer prevention and therapy. Totowa: Humana Press, 2003. 371 p.

Harris RE, Alshafie GA, Abou-Issa H, et al. Chemoprevention of breast cancer in rats by celecoxib, a specific cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitor. Cancer res. 2000;60:2101-3.

Harris RE, Robertson FM, Abou-Issa HM, et al. Genetic induction and upregulation of cyclooxygenase (COX) and aromatase (CYP-19): an extension of the dietary fat hypothesis of breast cancer. Med. hypotheses. 1999;52:291-2.

Harris LN, You F, Schnitt SJ, et al. Predictors of resistance to preoperative trastuzumab and vinorelbine for HER2-Positive early breast cancer. Clin. cancer res. 2007;13:1198-1207.

Hayat MA. DNA microarrays technology. In: _____, editor. Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas. Amsterdam: Elsevier; 2004. v.1, p. 49-55.

_____. Breast carcinoma: an introduction. In: Hayat MA, editor. Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas. Amsterdam: Elsevier; 2004. v.1, p. 233-48.

Hedenfalk I, Ringnér M, Ben-Dor A, et al. Molecular classification of familial non-BRCA1/BRCA2 breast cancer. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 2003;100:2532-7.

Hendrix MJC, Seftor EA, Kirschmann DA, et al. Molecular biology of breast cancer metastasis molecular expression of vascular markers by aggressive breast cancer cells. Breast cancer res. 2000;2:417-22.

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

Hicks DG, Short SM, Prescott NL, et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. Am. j. surg. pathol. 2006;30:1097-104.

Hida T, Yatabe Y, Achiwa H, et al. Increased expression of cyclooxygenase-2 occurs frequently in human lung cancer, specifically in adenocarcinoma. *Cancer res.* 1998;58:3761-4.

Homna N, Sakamoto G, Akiyama F, et al. Breast carcinoma in women over the age of 85: distinct histological pattern and androgen, estrogen, and progesterone receptor status. *Histopathology.* 2003;41:120-7.

Hombrey E, Han C, Roberts A, et al. The relationship of human wound vascular endothelial growth factor (VEGF) after breast cancer surgery to circulating VEGF and angiogenesis. *Clin. cancer res.* 2003;9:4332-9.

Horvath L, Henshall S. Timely topic: the application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology.* 2001;33:125-29.

Huang Z, ZHU, W.; MENG, Y. Novel rabbit monoclonal antibody to estrogen receptor (clone SP1): no heat pretreatment but effective on paraffin-embedded tissue. *Appl. immunohistochem. mol. morphol.* 2005;13:91-5.

Hugh J, Hanson J, Cheang MCU, et al. Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J. clin. oncol.* 2009;27:1168-76.

Huo D, Ikpatt F, Khramtsov A, et al. Population differences in breast cancer: survey in indigenous African women reveals over-representation of triple-negative breast cancer. *J. clin. oncol.* 2009;27:4515-21.

Hur M, Yoon C, Ko S, et al. Clinical characteristics of triple negative breast cancers. *Breast.* 2009 Supl 1; 18:S71.

Hurwitz H, Fehrenbacher, Novotny W, et al. Bevacizumab plus irinotecan, fluorouracil, and leucovorin for metastatic colorectal cancer. *N engl. j. med.* 2004;350:2335-42.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. [homepage na internet]. Censo demográfico do ano 2000. [acesso em 12 jun 2010]. Disponível em:<http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/populacao/censo2000/populacao/censo2000_populacao.pdf>

INCA. Instituto Nacional do Câncer. [homepage na internet]. Estimativas de mortes decorrentes de neoplasia de mama. [acesso em 4 jan 2010]. Disponível em: <http://www.cancer.org/downloads/STT/F861009_final%209-08-09.pdf>

Jain A, Lakshmaiah K, Sajeevan K, et al. Retrospective analysis of clinico-pathological trends of triple negative breast cancer: experience from a tertiary care center of South India. *Breast*. 2009 Supl 1; 18:S71.

Jechlinger M, Sommer A, Moriggl R, et al. Autocrine PDGFR signaling promotes mammary cancer metastasis. *J. clin. invest.* 2006;116:1561-70.

Jiang MC, Liao CF, Lee PH. Aspirin inhibits matrix metalloproteinase-2 activity, increases E-cadherin production, and inhibits in vitro invasion of tumor cells. *Biochem. biophys. res. commun.* 2001;282:671-7.

Jiralerspong S, Angulo AMG, Hung MC. Expanding the arsenal: metformin for the treatment of triple-negative breast cancer? [carta]. *Cell cycle*. 2009;8:2681-84.

Jukkola-Vuorinen A, Rahko E, Vuopala KS, et al. Toll-Like receptor-9 expression is inversely correlated with estrogen receptor status in breast cancer. *J. innate immun.* 2008;1:59-68.

Jumppanen M, Gruvberger-Saal S, Kauraniemi P, et al. Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast cancer res.* 2007;9:R16.

Kaptain S, Tan LK, Chen B. Her-2/neu and breast cancer. *Diag. mol. pathol* 2001;10:139-52.

Kobayashi S. Basal-like subtype of breast cancer: a review of its unique characteristics and their clinical significance. *Breast cancer*. 2008;15:153-58.

Koki AT, Leahy KM, Harmon JM, et al. Cyclooxygenase-2 and Cancer. In: Harris RE, editor. *n L. COX-2 blockade in cancer prevention and therapy*. Totowa: Humana Press, 2003. p. 185-203.

Koscielny S. Critical review of microarray-based prognostic tests and trials in breast cancer. *Curr. opin. obstet. gynecol.* 2008;20:47-50.

Kujubu DA, Fletcher BS, Varnum BC, et al. TIS10, a phorbol ester tumor promoter-inducible mRNA from Swiss 3T3 cells, encodes a novel prostaglandin synthase/cyclooxygenase homologue. *J. boil. chem.* 1991;266:12866-72.

Kuroda N, Ohara M, Inoue K, et al. The majority of triple-negative breast cancer may correspond to basal-like carcinoma, but triple-negative breast cancer is not identical to basal-like carcinoma. *Med. mol. morphol.* 2009;42:128-31.

Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, et al. Prediction of *BRCA1* status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin. cancer res.* 2005;11:5175-80.

Landis SH, Murray T, Bolden S, et al. Cancer statistics. *CA cancer j. clin.* 1998;48:6.

Leary AL, Sirohi B, Johnston SR. Clinical trials update: endocrine and biological therapy combinations in the treatment of breast cancer. *Breast cancer res.* 2007;9:112-22.

Leek RD, Lewis CE, Whitehouse R, et al. Association of macrophage infiltration with angiogenesis and prognosis in invasive breast carcinoma. *Cancer res.* 1996;56:4625-9.

Li L, Wang H, Yang ES, et al. Erlotinib attenuates homologous recombinational repair of chromosomal breaks in human breast cancer cells. *Cancer res.* 2008; 68: 9141-6.

Li Z, Schem C, Shi YH, et al. Increased COX2 expression enhances tumor-induced osteoclastic lesions in breast cancer bone metastasis. *Clin. exp. metastasis.* 2008;25:389-400.

Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J. clin. oncol.* 2008;26:1275-81.

Lim KH, Oh DY, Chie EK, et al. Metaplastic breast carcinoma: clinicopathologic features and prognostic value of triple negativity. *Jpn. j. clin. oncol.* 2010;40:112-8.

Lin C, Chien SY, Chen LS, et al. Triple negative breast carcinoma is a prognostic factor in Taiwanese women. *BMC cancer.* 2009;9:192.

Lin NU, Claus E, Sohi J, et al. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*. 2008;113:2638-45.

Linderholm BK, Lindh B, Beckman L, et al. Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. *Clin. breast can.* 2003;4:340-7.

Linderholm BK, Hellborg H, Johansson U, et al. Significantly higher levels of vascular endothelial growth factor (VEGF) and shorter survival times for patients with primary operable triple-negative breast cancer. *Ann. oncol.* 2009;20:1639-46.

Liu B, Fan Z, Edgerton SM, et al. Metformin induces unique biological and molecular responses in triple negative breast cancer cells. *Cell cycle*. 2009;8:2031-40.

Liu XH, Rose DP. Differential expression and regulation of cyclooxygenase-1 and -2 in two human breast cancer cell lines. *Cancer res.* 1996;56:5125-27.

Liu ZB, Wu J, Ping B, et al. Basal cytokeratin expression in relation to immunohistochemical and clinical characterization in breast cancer patients with triple negative phenotype. *Tumori*. 2009;95:53-62.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. pathol.* 2006;19:264-71.

Lu X, Kang Y. Epidermal growth factor signaling and bone metastasis. *Br. j. cancer.* 2010;102:457-61.

Lucci A, Krishnamurthy S, Singh B, et al. Cyclooxygenase-2 expression in primary breast cancers predicts dissemination of cancer cells to the bone marrow. *Breast cancer res. treat.* 2008;117:61-8.

Lund MJB, Butler EN, Bumpers HL, et al. High prevalence of triple-negative tumors in an urban cancer center. *Cancer*. 2008;113:608-15.

Lyman GH, Cosler LE, Kuderer NM, et al. Impact of a 21-gene RT-PCR assay on treatment decisions in early-stage breast cancer. *Cancer*. 2007;109:1011-18.

Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, et al. A Two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer cell*. 2004;5:607-16.

Malik ST, Naylor MS, East N, et al. Cells secreting tumour necrosis factor show enhanced metastasis in nude mice. *Eur. j. cancer*. 1990;26:1031-4.

MammaGene [homepage na internet]. São Paulo: Consultoria em Patologia, Laboratório de Referência Nacional para Diagnóstico em Anatomia Patológica. [acesso em 4 abril 2009]. Disponível em: <http://www.mammagene.com.br/>

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, et al. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. today*. 1992;13:265-70.

Marchionni L, Wilson RF, Wolff AC, et al. Systematic Review: Gene Expression Profiling Assays in Early-Stage Breast Cancer. [Ann. intern. med. 2008;148:358-69.](#)

[Masferrer JL](#), [Leahy KM](#), [Koki AT](#), et al. Antiangiogenic and antitumor activities of cyclooxygenase-2 inhibitors. *Cancer res*. 2000;60:1306-11.

Matkovic B, Juretic A, Separovic V, et al. Immunohistochemical analysis of ER, PR, HER-2, CK 5/6, p63 and EGFR antigen expression in medullary breast cancer. *Tumori*. 2008;94:838-44.

Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, et al. P63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows arch*. 2005; 447:688-94.

Mayer EL, Partridge AH, Harris LN, et al. Tolerability of and adherence to combination oral therapy with gefitinib and capecitabine in metastatic breast cancer. *Breast cancer res. treat*. 2009;117:615-23.

Mendelsohn J, Howley P, Israel M, et al. *The Molecular Basis of Cancer*. s.l.: Saunders ; 2008. 704p.

Merrell MA, Ilivesaro JM, Lehtonen N, et al. Toll-Like receptor 9 agonists promote cellular invasion by increasing matrix metalloproteinase activity. *Mol. cancer res*. 2006 ;4:437-447.

Miller K, Wang M, Gralow J, et al. A randomized phase III trial of paclitaxel versus paclitaxel plus bevacizumab as first-line therapy for locally recurrent or metastatic breast cancer: a trial coordinated by the Eastern Cooperative Oncology Group (E2100). *Breast cancer res. treat.* 2005;94:S6 (Abstract 3).

_____. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *N. engl. j. med.* 2007;357:2666-76.

Millikan RC, Newman B, Tse CK, et al. título do artigo. *Breast cancer res. treat.* 2008;109:123-39.

Mohammed RH, Lakatua DJ, Haus E, et al. Estrogen and progesterone receptors in human breast cancer. Correlation with histological subtype and degree of differentiation. *Cancer.* 1986;58:1076-81.

Moncada S, Palmer RMJ, Higgs EA. Nitric Oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. rev.* 1991;43:109-42.

Mote PA. Immunofluorescence and immunohistochemical localization of progesterone receptors in breast carcinoma. In: Hayat MA, editor. *Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas.* Amsterdam: Elsevier; 2004. v.1, p. 449-62.

Muñoz M, Fernández-Aceñero MJ, Martín S, et al. Prognostic significance of molecular classification of breast invasive ductal carcinoma. *Arch. gynecol. obstet.* 2008;280:43-8.

Nakopoulou L. Expression of vascular endothelial growth factor receptor-2/Flk-1/KDR in breast carcinoma. In: Hayat MA, editor. *Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas.* Amsterdam: Elsevier; 2004. v.1, p. 249-57.

Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, et al. Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women. *APMIS acta pathol. microbial. immunol. scand.* 2008;116:515-25.

Nam BH, Kim SY, Han HS, et al. Breast cancer subtypes and survival in patients with brain metastases. *Breast cancer res.* 2008;10:R20.

Nascimento I. Câncer de mama “triplo negativo” é mais freqüente em mulheres negras”. *Jornal do núcleo de oncologia da Bahia.* 2010. p.4.

National Cancer Institute [homepage na internet]. U.S.A: U.S. National Institutes of Health. [acesso em 4 jan 2010]. Disponível em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/types/breast/>

Nes JGH, Kruijf EM, Faratian D, et al. Cox2 expression in prognosis and in prediction to endocrine therapy in early breast cancer patients. *Breast can. res. treat.* In press. 2010.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. cancer res.* 2004;10:5367-74.

Nofech-Mozes S, Trudeau M, Kahn HK, et al. Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast cancer res. treat.* 2009;118:131-7.

Nogi H, Kobayashi T, Suzuki M, et al. EGFR as paradoxical predictor of chemosensitivity and outcome among triple-negative breast cancer. *Oncol. rep.* 2009;21:413-417.

Oliveira CT, Bertozzi APAP. O Conhecimento biológico do tumor de mama e as dúvidas na prática clínica. *Prat. hosp.* 2008;57:38-40.

Oliveras-Ferraros C, Vazquez-Martin A, López-Bonet E, et al. Growth and molecular interactions of the anti-EGFR antibody cetuximab and the DNA cross-linking agent cisplatin in gefitinib-resistant MDA-MB-468 cells: new prospects in the treatment of triple-negative/basal-like breast cancer. *Int. j. oncol.* 2008;33:1165-76.

Onitilo AA, Engel JM, Greenlee RT, et al. Breast cancer subtypes based on ER/PR and Her2 expression: comparison of clinicopathologic features and survival. *Clin. med. res.* 2009;7:4-13.

Ooi A. HER-2/neu gene amplification and protein overexpression in breast carcinoma: immunohistochemistry and fluorescence *in situ* hybridization. In:

O'Sullivan C, Lewis CE. Tumour-associated leucocytes: friends or foes in breast carcinoma. *J. pathol.* 1994;172:229-35.

O`Shaughnessy J, Weckstein DJ, Vukelja SJ, et al. Preliminary results of a randomized phase II study of weekly irinotecan/carboplatin with or without catuximab in patients with metastatic breast cancer. *Breast cancer res. treat.* 2007;106(suppl.1):532.

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

Packeisen J, Buerger H, Krech R, et al. Tissue microarrays: a new approach for quality control in immunohistochemistry. *J. clin. pathol.* 2002;55:613-5.

Paik S. Development and clinical utility of a 21-Gene recurrence score prognostic assay in patients with early breast cancer treated with tamoxifen. *Oncologist.* 2007;12:631-5.

_____. Molecular profiling of breast cancer. *Curr. opin. obstet. gynecol.* 2006;18:59-63.

Paik S, Shak S, Tang G, et al. A Multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N. engl. j. med.* 2004;351:2817-26.

Paik S, Tang G, Shak S, et al. Gene expression and benefit of chemotherapy in women with node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer. *J. clin. oncol.* 2006;24:3726-34.

Pal SK, Mortimer J. Triple-negative breast cancer: novel therapies and new directions. *Maturitas.* 2009;63:269-74.

Paulsson J, Sjoblom T, Micke P, et al. Prognostic significance of stromal platelet-derived growth factor b-receptor expression in human breast cancer. *Am. j. pathol.* 2009;175:334-341.

Paredes JCAF, Milanezi MFG, Reis-Filho JS, et al. Correlação entre as expressões de P-caderina e de receptores de estrógeno no câncer de mama. *J. bras. patol.* 2002;38:307-13.

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

Perrier S, Caldefie-Chézet F, Vasson MP, et al. Il-1 family in breast cancer: potential interplay with leptin and other adipocytokines. *FEBS Letters*. 2009;583:259-65.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, et al. Molecular portraits of human breast tumours [carta]. *Nature*. 2000;406:747-52.

Perez EA, Moreno-Aspitia A, Thompson EA, et al. Adjuvant therapy of triple negative breast cancer. *Breast cancer res. treat.* 2010;120:285-91.

Pinho MSL. Imunohistoquímica: O estudo da biologia molecular ao alcance de todos. *Rev. bras. colo-proctol.* 2005;25:188-91.

Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat. med.* 2009;15:907-13.

Prueitt RL, Boersma BJ, Howe TM, et al. Inflammation and IGF-I activate the Akt pathway in breast cancer. *Int. j. cancer.* 2006;120:796-805.

Raica M, Jung I, Cîmpean AM, et al. From conventional pathologic diagnosis to the molecular classification of breast carcinoma: are we ready for the change?. *Rom. j. morphol. embryol.* 2009;50:5-13.

Rajkumar T. Growth factors and growth factor receptors in cancer. *Curr. sci.* 2001;81:535-41.

Rajnakova A, Moochhala S, Goh PM, et al. Expression of nitric oxide synthase, cyclooxygenase, and p53 in different stages of human gastric cancer. *Cancer lett.* 2001;172:177-85.

Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, et al. Basal Phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur. j. cancer.* 2006;42:3149-56.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007;109:25-32.

Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, et al. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast cancer res. treat.* 2009;113:411-22.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J. clin. oncol.* 2008;26:2568-81.

_____. Impact of basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology.* 2008;75:95-103.

Rakha EA, Tan DSP, Foulkes WD, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? [carta]. *Breast cancer res.* 2007;9:404.

Rakoff-Nahoum S, Medzhitov R. Toll-like receptors and cancer. *Nat. rev. cancer.* 2009;9:57-63.

Rang HP, Dale EMM, Ritter JM, et al. *Farmacologia*; 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2001. 692p.

Reed JR, Leon RP, Hall MK, et al. Interleukin-1 beta and fibroblast growth factor receptor 1 cooperate to induce cyclooxygenase-2 during early mammary tumorigenesis. *Breast can. res.* 2009;11:R21.

Reis-Filho JS. Triple negative and basal-like breast câncer: one or many diseases?: implications for surgical pathologists. In: *Anais da 98th Annual Meeting. United States & Canadian Academy of Pathology.* [evento na internet]; 2009; Boston, USA. Boston: USCAP; 2009. [acesso em: 20 abr. 2010]. Disponível em: <<http://www.uscap.org/site~/98th/pdf/companion03h03.pdf>>

Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumors: a critical review. *Histopathology.* 2008;52:108-118.

Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga J-Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J. clin. pathol.* 2006;59:225-31.

Relf M, Lejeune S, Scott PA, et al. Expression of the angiogenic factors vascular endothelial cell growth factor, acidic and basic fibroblast growth factor, tumor growth factor B-1, platelet-derived endothelial cell growth factor, placenta growth factor, and pleiotrophin in human primary breast cancer and its relation to Angiogenesis. *Cancer res.* 1997;57:963-9.

Reveneau S, Arnould L, Jolimoy G, et al. Nitric oxide synthase in breast cancer is associated with tumor grade, proliferation rate, and expression of progesterone receptors. *Lab. invest.* 1999;79:1215-25.

N J, Han SW, Oh DY, et al. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer. *BMC cancer*. 2008;8:307.

van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am. j. pathol.* 2002;161:1991-96.

Rhee J, Han SW, OH DY, et al. The clinicopathologic characteristics and prognostic significance of triple-negativity in node-negative breast cancer. *BMC cancer*. 2008;8:307.

Ristimaki A, Sivula A, Lundin J, et al. Prognostic significance of elevated cyclooxygenase-2 expression in breast cancer. *Cancer res.* 2002;62:632-5.

Rose DP, Connolly JM, Liu XH. Effects of linoleic acid on the growth and metastasis of two human breast cancer cell lines in nude mice and the invasive capacity of these cell lines in vitro. *Cancer res.* 1994;54:6557-62.

Rosen PP. *Rosen's breast pathology*. 3.ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; [2009].

Ross JS, Cordon-Cardo C. Cell proliferation markers and cell cycle regulators in breast cancer. In: Ross JS, Hortobagyi GN, editores. *Molecular oncology of breast cancer*. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2004. p.169-91.

Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. cancer res.* 2005;11:5678-85.

Rydén L, Jirström K, Haglund M, et al. Epidermal growth factor receptor and vascular endothelial growth factor receptor 2 are specific biomarkers in triple-negative breast cancer. Results from a controlled randomized trial with long-term follow-up. *Breast cancer res. treat.* In press. 2010.

Ryu WS, Son GS. Cancer vaccines targeting HER2/neu for early breast cancer. *J. breast cancer.* 2010;13:5-13.

Sanoff HK, Davies JM, Walko C, et al. A phase I evaluation of the combination of vinflunine and erlotinib in patients with refractory solid tumors. *Invest. new drugs*. In press. 2010.

Sanz MI, Maqueda AA, Riera MC, et al. The clinical features and prognosis of triple negative breast cancer. *Breast*. 2009 Supl 1; 18:S71.

Sasa M, Bando Y, Takahashi M, et al. Screening for basal marker expression is necessary for decision of therapeutic strategy for triple-negative breast cancer. *J. surg. oncol.* 2007;97:30-4.

Sandler A, Gray R, Perry MC, et al. Paclitaxel-carboplatin alone or with bevacizumab for non-small-cell lung cancer. *N engl. j. med.* 2006;355:2542-50.

Saunders PTK. Immunohistochemistry of estrogen receptor expression in breast carcinoma. In: Hayat MA, editor. *Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas*. Amsterdam: Elsevier; 2004. v.1, p. 439-48.

Savage K, Leung S, Todd SK, et al. Distribution and significance of caveolin 2 expression in normal breast and invasive breast cancer: an immunofluorescence and immunohistochemical analysis. *Breast cancer res. treat.* 2008;110:245-56.

Schneider BP, Winer EP, Foulkes WD, et al. Triple negative breast cancer: risk factors to potential targets. *Clin. cancer res.* 2008;14:8010-8.

Schonk DM, Kuijpers HJ, van Drunen E, et al. Assignment of the gene(s) involved in the expression of the proliferation-related Ki-67 antigen to human chromosome 10. *Hum. genet.* 1989;83:297-9.

Shklar Z, Steiner M, Rabkin A, et al. Triple negative breast cancer: a retrospective analysis. *Breast*. 2009 Supl 1; 18:S71.

Shou M, Korzekwa KR, Krausz KW, et al. Specificity of cDNA-expressed human and rodent cytochrome P450s in the oxidative metabolism of the potent carcinogen 7,12-dimethyl-benzanthracene. *Mol. carcinog.* 1996;17:241-9.

Silva F, Carvalho S, Milanezi F, et al. Carcinoma de mama de tipo basal. *Acta med. port.* 2008;21:373-78.

Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, et al. Efficacy of neoadjuvant cisplatin in triple-negative breast cancer. *J. clin. oncol.* In press. 2010.

Simon R, Nocito A, Hübscher T, et al. Patterns of HER-2/neu amplification and overexpression in primary and metastatic breast cancer. *J. natl. cancer inst.* 2001; 93:1120-1.

Singh B, Cook KR, Vincent L, et al. Cyclooxygenase-2 induces genomic instability, BCL2 expression, doxorubicin resistance, and altered cancer-initiating cell phenotype in MCF7 breast cancer cells. *J. surg. res.* 2008;147:240-6.

Skacel M, Hicks DG, Tubbs RR. Tissue microarrays and their modifications in high-throughput analysis of clinical specimens. In: Hayat MA, editor. *Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas*. Amsterdam: Elsevier; 2004. v.1, p. 57-65.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against her2 for metastatic breast cancer that overexpresses her2. *N. Engl. j. med.* 2001;344:783-92.

Soares R, Pereira MB, Silva C, et al. Expression of TGF- α and EGFR in breast cancer and its relation to angiogenesis. *Breast j.* 2000;6:171-7.

Sobin LH, Wittekind Ch, editores. *TNM: classification of malignant tumours*. International Union Against cancer (UICC). 6.ed. New York: Wiley-Liss, 2002. 253p.

Sobrinho Simões M & Oliveira C. Different types of epithelial cadherin alterations play different roles in human carcinogenesis. *Adv. anat. pathol.* 2002;9:329-37.

Soonmyung P. Molecular profiling of breast cancer. *Curr. opin. obstet. gynecol.* 2006;18:59-63.

[Sørliie T](#). Molecular portraits of breast cancer: tumor subtypes as distinct disease entities. *Eur. j. cancer.* 2004;40:2667-75.

[Sørliie T](#), Perou CM, Tibshirani R, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. natl. acad. sci. USA.* 2001;98:10869-74.

[Sørli T](#), Tibshirani R, Parker J, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. natl. acad. sci. USA*. 2003;100:8418-23.

[Sørli T](#), Wang Y, Xiao C, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC genomics*. 2006;7:127.

Solin LJ, Hwang WT, Vapiwala N. Outcome after breast conservation treatment with radiation for women with triple-negative early-stage invasive breast carcinoma. *Clin. breast cancer*. 2009;9:96-100.

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

Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A*. 2003;100:10393-8.

Stead LA, Lash TL, Sobieraj JE, et al. Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast cancer res*. 2009;11:R18.

Steeg PS. Molecular biology of breast cancer metastasis 'Has it spread?': disarming one of the most terrifying questions. *Breast cancer res*. 2000;2:396-9.

Stockmans G, Deraedt K, Wildiers H, et al. Triple-negative breast cancer. *Curr. opin. oncol*. 2008; 20:614-20.

Symmans WF. Histopathology of breast cancer: correlation with molecular markers. In: Ross JS, Hortobagyi GN, editors. *Molecular oncology of breast cancer*. Boston: Jones and Bartlett Publishers; 2004. p.106-16.

Tan DSP, Marchió C, Jones RL, et al. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast cancer res. treat*. 2008;111:27-44.

Tang CK. Role of epidermal growth factor receptor in breast carcinoma. In: Hayat MA, editor. *Immunohistochemistry and in situ hybridization of human carcinomas*. Amsterdam: Elsevier; 2004. v.1, p. 415-24.

Tannheimer SL, Rehemtulla A, Ethier SP. Characterization of fibroblast growth factor receptor 2 overexpression in the human breast cancer cell line SUM-2PE. *Breast cancer res.* 2000;2:311-20.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science.* 1991; 251:1451-5.

Taylor-Papadimitriou J, Stampfer M, Bartek J, et al. Keratin expression in human mammary epithelial cells cultured from normal and malignant tissue: relation to in vivo phenotypes and influence of medium. *J. cell. sci.* 1989;94:403-13.

Telles OS. Metiformina na prevenção e tratamento do câncer de mama. Sociedade Brasileira de Mastologia [homepage na internet]. [2008] [acesso em 10 jan 2010]. Disponível em:
http://www.sbmastologia.com.br/downloads/avancos_na_mastologia/metiformina_na_prevencao_e_tratamento_do_cancer_de_mama.pdf

The role of VEGF in triple-negative breast cancer: were do we go from here? [editorial]. *Ann. oncol.* 2009;20:1615-7.

Thike AA, Check PY, Jara-Lazaro AR, et al. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod. pathol.* 2010;23:123-33.

Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumor progression: lessons from human tumours. *Cancer metastasis rev.* 1998;17:107-18.

Thomsen LL, Miles DW, Happerfield L, et al. Nitric oxide synthase activity in human breast cancer. *Br. j. cancer.* 1995;72:41-4.

Tischkowitz M, Brunet JS, Bégin LR, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC cancer.* 2007;7:134.

Toyama T, Yamashita H, Kondo N, et al. Frequently increased epidermal growth factor receptor (EGFR) copy numbers and decreased BRCA I mRNA expression in Japanese triple-negative breast cancers. *BMC cancer.* 2008;8:309.

Trivers KF, Lund MJ, Porter PL, et al. The epidemiology of triple-negative breast cancer, including race. *Cancer causes control.* 2009;20:1071-82.

Tschugguel W, Schneeberger C, Unfried G, et al. Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer depends on tumor grade. *Breast cancer res. treat.* 1999;56:145-51.

Tsujii M, Kawano S, Tsuji S, et al. Cyclooxygenase regulates angiogenesis induced by colon cancer cells. *Cell.* 1998;93:705-16.

Tsujii M, Kawano S, DuBois RN. Cyclooxygenase-2 expression in human colon cancer cells increases metastatic potential. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1997;94:3336-40.

Turner N, Grose R. Fibroblast growth factor signalling: from development to cancer. *Nat. rev. cancer.* 2010;10:116-29.

Uhm JE, Park YH, Yi SY, et al. Treatment outcomes and clinicopathologic characteristics of triple-negative breast cancer patients who received platinum-containing chemotherapy. *Int. j. cancer.* 2009;124:1457-62.

Vakkala M, Kahlos K, Lakari E, et al. Inducible nitric oxide synthase expression, apoptosis, and angiogenesis in *in situ* and invasive breast carcinomas. *Clin. cancer res.* 2000;6:2408-16.

Van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer [carta]. *Nature.* 2002;415:530-36.

Vrekoussis T, Stathopoulos EN, Kafousi M, et al. Expression of endothelial PDGF receptors a and b in breast cancer: up-regulation of endothelial PDGF receptor beta. *Oncol. rep.* 2007;17:1115-9.

Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast cancer res. treat.* 2009;116:317-28.

Van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N. Engl. j. med.* 2002;347:1999-2009.

Vuorinen AJ, Rahko E, Vuopala KS, et al. Toll-like receptor-9 expression is inversely correlated with estrogen receptor status in breast cancer. *J. innate. immun.* 2009;1:59-68.

Jenkinson WE, Rossi SW, Parnell SM, et al. PDGFR α -expressing mesenchyme regulates thymus growth and the availability of intrathymic niches. *Blood*. 2007;109:954-60.

Wilson KJ, Gilmore JL, Foley J, et al. Functional selectivity of EGF family peptide growth factors: implications for cancer. *Pharmacol. ther.* 2009;122:1-8.

Wykoff CC, Sotiriou C, Cockman ME, et al. Gene array of VHL mutation and hypoxia shows novel hypoxia-induced genes and that cyclin D1 is a VHL target gene. *Br. J. cancer*. 2004;90:1235-43.

World Health Organization. *World Health Statistics Annual*. Geneva: WHO, 1998. 75p.

Wu ZY, Zhang XJ, Wang SN, et al. Growth inhibition and apoptosis induction of Sulindac on Human gastric cancer cells. *World j. gastroenterol.* 2001;7:796-800.

Zamzami N, Marchetti P, Castedo M, et al. Sequential reduction of mitochondrial transmembrane potential and generation of reactive oxygen species in early programmed cell death. *J. exp. med.* 1995;182:367-77.

Yang H, Cui B, Liu H, et al. Blocking TLR2 activity attenuates pulmonary metastases of tumor. *PLoS ONE*. 2009;5:6520-32.

Yamasaki F, Zhang D, Bartholomeusz C, et al. Sensitivity of breast cancer cells to erlotinib dependson cyclin-dependent kinase 2 activity. *Mol. cancer ther.* 2007;6:2168-77.

Xie W, Wang Y, Huang Y, et al. Toll-like receptor 2 mediates invasion via activating NF- κ B in MDA-MB-231 breast cancer cells. [Biochem. biophys. res. commun.](#) 2009;379:1027-32.

Zeng Q, Yang Z, Gao YJ, et al. Treating triple-negative breast cancer by a combination of rapamycin and cyclophosphamide: an in vivo bioluminescence imaging study. *Eur. j. cancer*. 2010;46:1132-43.

Zepeda-Castilla EJ, Recinos-Money E, Cuéllar-Hubbe M, et al. Clasificación molecular del cáncer de mama. *Cir. ciruj.* 2008;76:87-93.

Zhou Y, Ran J, Tang C, et al. Effect of celecoxib on E-cadherin, VEGF, Microvessel density and apoptosis in gastric cancer. *Cancer boil. ther.* 2007;6:269-75.

ANEXO I – Ficha de Coleta de Dados

PROJETO DE PESQUISA – TRIPLO NEGATIVO

Orientador: Dr. Vladmir Claudio Oliveira

Co-orientador: Dr. Ronaldo Ribeiro

Aluno: Antonio Fernando Melo Filho

1. Ficha N. _____ Pront. _____ Iniciais. _____
2. Idade: _____
3. Raça: Branca (1) negra (2) amarela (3) parda(4) NA (999)
4. História Familiar – Câncer de mama/ovário: Sim (1) Não (2) NA (999)
5. Localização do tumor _____
6. Grau de parentesco: Primeiro grau (1) Segundo grau (2) NA (999)
7. Data do diagnóstico: ____/____/____
8. Perfil: Basalóide (1) Normal *like* (2)
9. Tipo histológico ductal (1) lobular (2) medular (3) colóide (4) mucinoso (5) metaplásico (6) outro (999)
10. Grau histológico (1) (2) (3)
11. Bem diferenciado (1) Moderadamente (2) Indiferenciado (3)
12. Invasão linfática presente (1) ausente (2) NA (999)
13. Invasão vascular presente (1) ausente (2) NA (999)
14. Estadiamento clínico: I (1) IIA (2) IIB (3) IIB (4) IIIA (5) IIIB (6) IV (7) NA (999)
15. T: 1A (1) 1B (2) 1C (3) 2 (4) 3 (5) 4A (6) 4B (7) 4C (8) 4D (9) NA (999)
16. N: 0 (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4)
17. M: 0 (1) 1 (2)
18. Estadiamento patológico : I (1) IIA (2) IIB (3) IIB (4) IIIA (5) IIIB (6) IV (7) NA (999)
19. pT: 1 (1) 2 (2) 3 (3) 4 (4)

20. pN: 0 (1) 1 (2) 2 (3) 3 (4)
21. Cirurgia: Sim (1) Não (2) NA (999)
22. Mastectomia radical (1) Segmentactomia (2) Quadrantectomia (3)
Nodulectomia (4)
Mastectomia subcutânea (5) NA (999)
23. Linfadenectomia: Sim (1) Não (2) NA (999)
24. Linfadectomia axilar radical (1) Linfadenectomia axilar NI e II (2) Linfadenectomia axilar NI (3) NA (999)
25. Pesquisa de linfonodo sentinela positivo (1) bls negativo (2) NA (999)
26. QT Neo: Sim (1) Não (2) NA (999)
27. Protocolo: AC (1) AC-T (2) FAC (3) AC-D (4) FEC (5) FAC-T (6) Outro (7) NA (999)
28. Resposta clínica ao tratamento quimioterápico R .o. p. (1) R. o. c. (2) D. e. (3) Progressão (4)
29. Resposta patológica ao tratamento quimioterápico R . p. c. (1) R. p. p. (2) Apenas CDIS (3)
30. QT adjuvante: sim (1) não (2)
31. Protocolo _____
32. Radioterapia sim (1) não (2)
33. Evolução: Sem evidência de doença (1) Recidiva loco-regional (2) Recidiva sistêmica (3) NA (999)
34. Data da recidiva: _____
35. Sítio da recidiva: Cérebro (1) Pleuro-pulmonar (2) Hepática (3) Óssea (4) Linfonodo (5) Pele (6) Peritônio (7) Outra (8) Sítio: _____
36. Status final: Vivo sem doença (1) Vivo com doença (2) Morte por câncer (3)
Morte por outras causas (4) Perdido de vista (5)
37. Último *follow-up* data: ____/____/____

ANEXO III – Tabela TMA

mm	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	mm	
	0	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4	9.6	10.8	12.0	13.2	14.4	15.6	16.8	18.0		
0	0	Placenta C	3488/99 C	11826/99 C	1109/99 C	1160/00 D	1753/00 C	1763/00 C	2578/00 C	4569/00 C1	5923/00 C	139/01 C	945/01 C	1755/01 C	3011/01 C	5461/01 C	5765/01 C	0
1	1.2	658/02 C	1145/02 C	1196/02 C	1452/02 C	5244/02 C	6850/02 C	7779/03 C	8004/02 C	10436/03 C4	274/04 C	418/04 C	1404/04 II	4752/04 C	5883/04 C	8389/09 T	9629/04 C	1.2
2	2.4	11506/04 C	4317/05 C	5101/05 T	8351/05 C	8689/05 C	9054/05 C	12415/05 C	12979/05 C	13738/05 C	14117/05 C	15912/05 C	638/06 B	777/06 C	3701/06 C4	4856/06 C	2.4	
3	3.6	5412/06 C	6036/06 C	6906/06 C	7977/06 C	8973/06 C	10241/06 C	10922/06 C	11456/06 C4	11506/06 C	12515/06 C	13061/06 C	14154/06 C	14318/06 C	15612/06 C	15902/06 C	15965/06 C	3.6
4	4.8	17601/06 C	15468/05 C	9261/03 C	1192/05 C	5038/05 C	11925/05 C	12930/06 C	1536/02 C	42753/06 C								4.8
5	6.0																	6.0
6	7.2	103/00 C1	384/00 C1	1161/00 C	1210/00 C	1216/00 C	1509/00 I	2821/00 C	3137/00 C	3175/00 C2	3877/00 C	4165/00 C	8471/06 C	4938/00 C	372/01 C	1967/01 C	2700/01 C	7.2
7	8.4	3611/01 C	3760/01 C	5630/01 C	5993/01 C	7403/01 C	7718/01 C	10057/04 C	1892/02 C	7023/02 C	3000/03 C	3427/03 C	3710/03 C	3779/03 C	6982/03 C	7576/03 C	8260/03 C	8.4
8	9.6	4009/04 C5	9433/04 C2	5003/05 I														9.6
9	10.8																	10.8
10	12.0	Placenta C	3488/99 C	11826/99 C	1109/99 C	1160/00 D	1753/00 C	1763/00 C	2578/00 C	4569/00 C1	5923/00 C	139/01 C	945/01 C	1755/01 C	3011/01 C	5461/01 C	5765/01 C	12.0
11	13.2	658/02 C	1145/02 C	1196/02 C	1452/02 C	5244/02 C	6850/02 C	7779/03 C	8004/02 C	10436/03 C4	274/04 C	418/04 C	1404/04 II	4752/04 C	5883/04 C	8389/09 T	9629/04 C	13.2
12	14.4	11506/04 C	4317/05 C	5101/05 T	8351/05 C	8689/05 C	9054/05 C	12415/05 C	12979/05 C	13738/05 C	14117/05 C	15912/05 C	638/06 B	777/06 C	3701/06 C4	4856/06 C	14.4	
13	15.6	5412/06 C	6036/06 C	6906/06 C	7977/06 C	8973/06 C	10241/06 C	10922/06 C	11456/06 C4	11506/06 C	12515/06 C	13061/06 C	14154/06 C	14318/06 C	15612/06 C	15902/06 C	15965/06 C	15.6
14	16.8	17601/06 C	15468/05 C	9261/03 C	1192/05 C	5038/05 C	11925/05 C	12930/06 C	1536/02 C	42753/06 C								16.8
15	18.0																	18.0
16	19.2	103/00 C1	384/00 C1	1161/00 C	1210/00 C	1216/00 C	1509/00 I	2821/00 C	3137/00 C	3175/00 C2	3877/00 C	4165/00 C	8471/06 C	4938/00 C	372/01 C	1967/01 C	2700/01 C	19.2
17	20.4	3611/01 C	3760/01 C	5630/01 C	5993/01 C	7403/01 C	7718/01 C	10057/04 C	1892/02 C	7023/02 C	3000/03 C	3427/03 C	3710/03 C	3779/03 C	6982/03 C	7576/03 C	8260/03 C	20.4
18	21.6	4009/04 C5	9433/04 C2	5003/05 I														21.6
mm	22.8																	22.8

Título: Mama-Instituto Câncer do Ceara
Autor: Dr.Fernando Soares/Dr.Fernando Melo

 Triplo Negativo
 RE Negativo

Outubro.2009

ANEXO III – Microfotografias representativas das reações de imunoistoquímica.

CARACTERIZAÇÃO DE TUMORES TRIPLO-NEGATIVOS

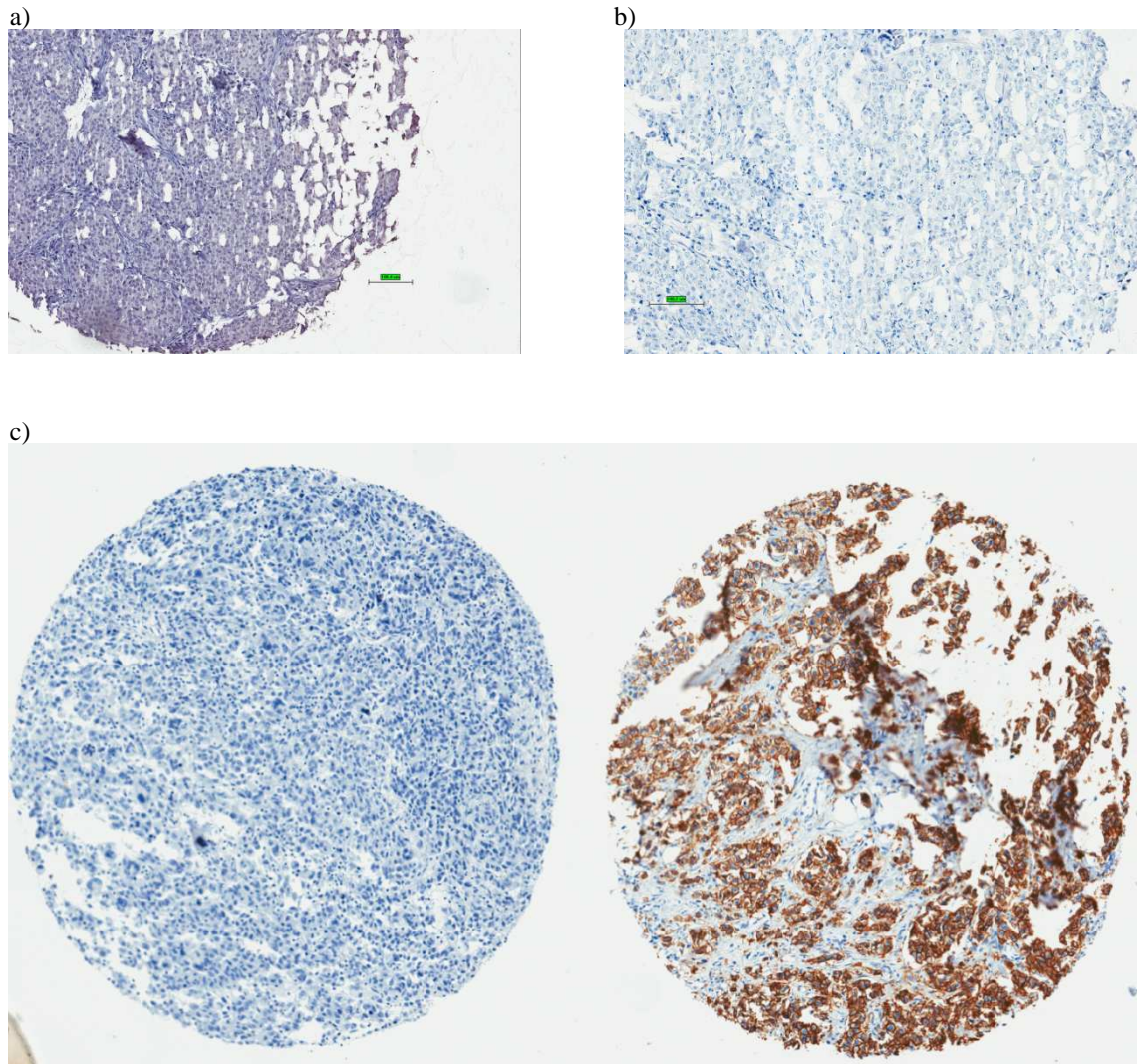


Figura 1 – Fotos representativas das marcações imunoistoquímica para caracterização dos tumores triplo-negativos. As amostras (N=74) foram organizadas em um TMA (tissue microarray) e testadas simultaneamente para presença dos marcadores de interesse. a) RE, b) RP e c) ERBB2 com seu respectivo controle positivo. As imagens foram capturadas no Aperio Scascope XR. No canto inferior das fotos é possível se identificar a barra de escala destacada em verde.

MARCADORES BASAIS

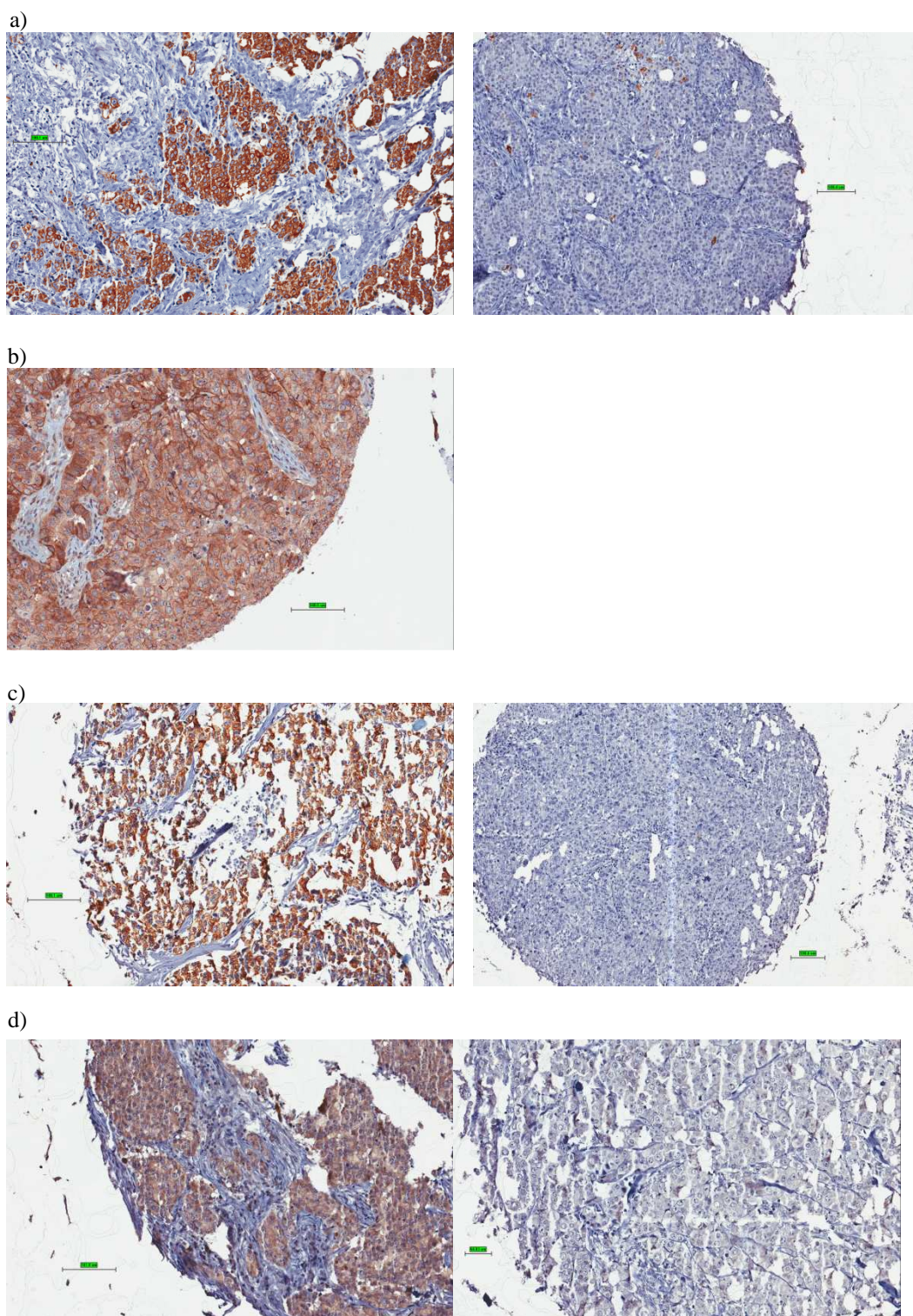
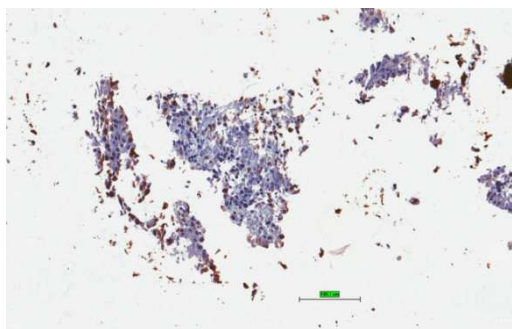
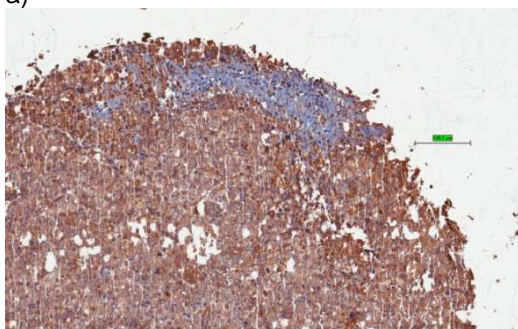


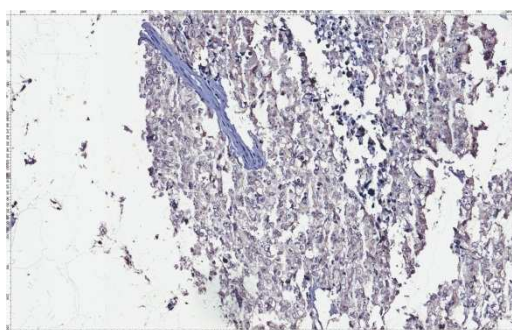
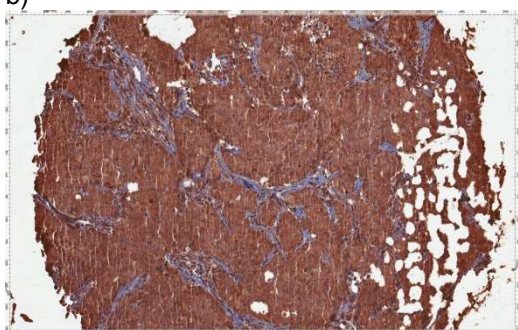
Figura 2 – Fotos representativas das marcações imunoistoquímica para caracterização dos tumores basais. As amostras (N=74) foram organizadas em um TMA (tissue microarray) e testadas simultaneamente para presença dos marcadores de interesse. a) CK5 e seu controle negativo b) EGFR c) CK14 e seu controle negativo e d) p63 e seu respectivo controle negativo. As imagens foram capturadas no Aperio Scanscope XR. No canto inferior das fotos é possível se identificar a barra de escala destacada em verde.

MARCADORES DE FATORES DE CRESCIMENTO

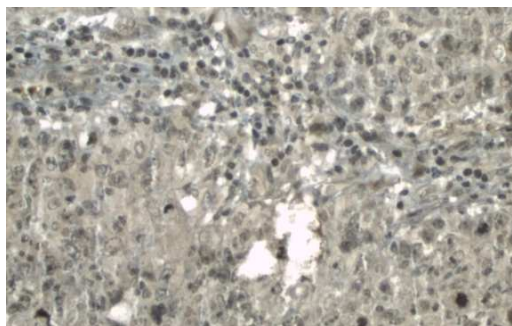
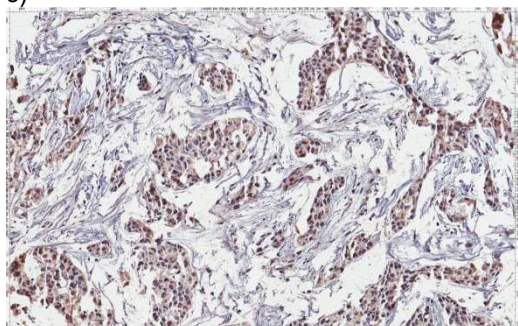
a)



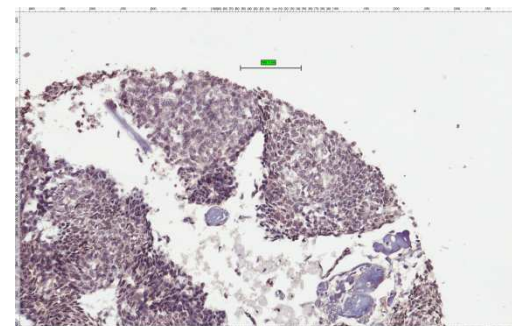
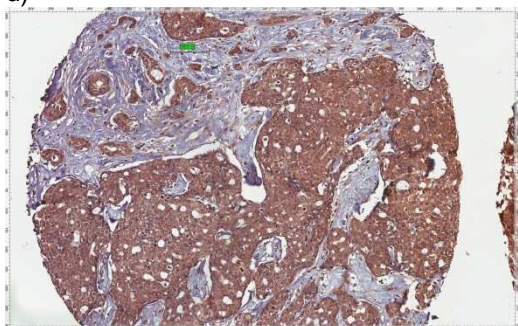
b)



c)



d)



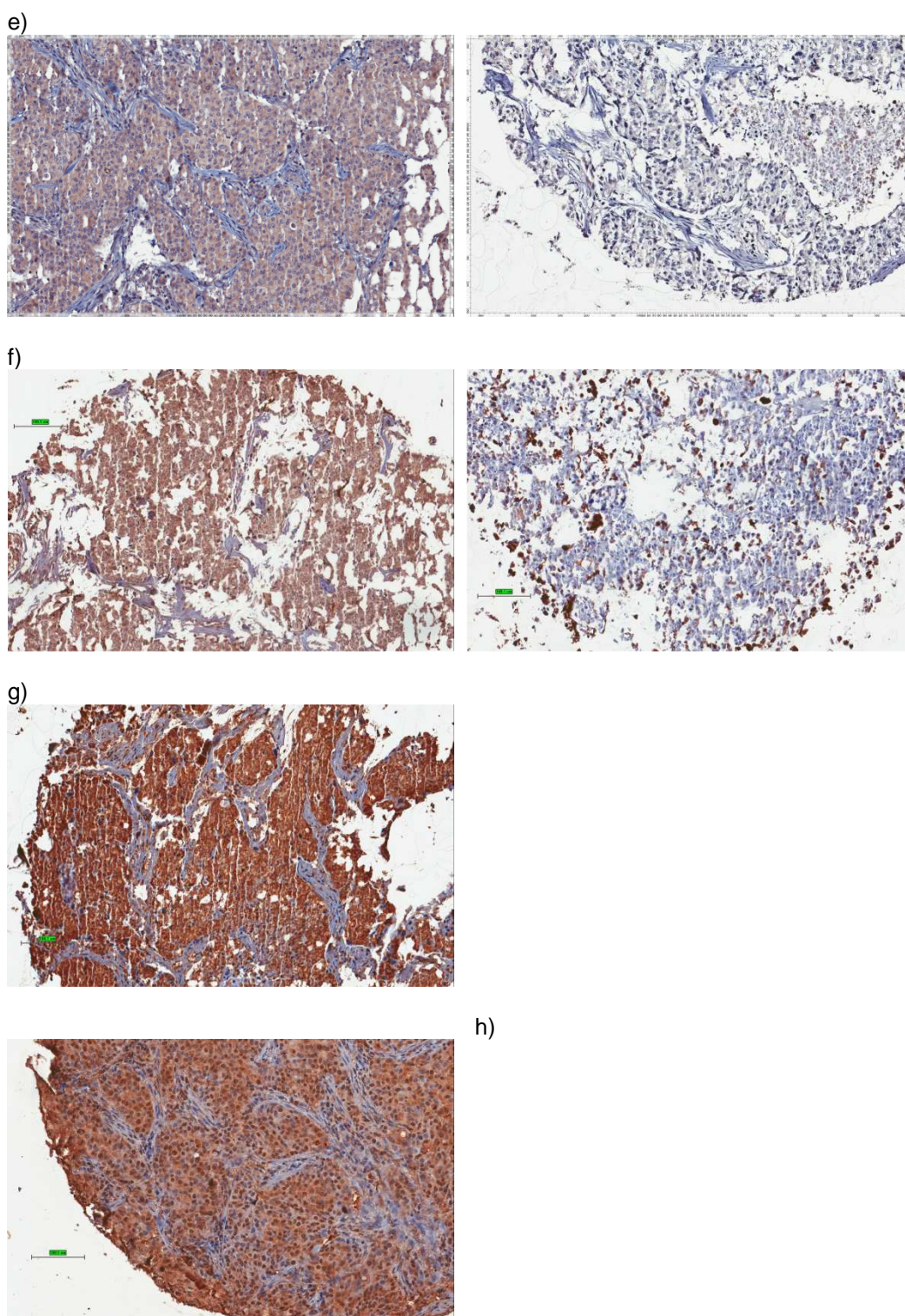


Figura 3 – Fotos representativas das marcações imunoistoquímica para análise de fatores de crescimento e os respectivos receptores. As amostras (N=74) foram organizadas em um TMA (tissue microarray) e testadas simultaneamente para presença dos marcadores de interesse. a) PDGF e seu controle negativo b) PDGFRA e seu controle negativo c) PDGFRB d) EGF e seu controle negativo, e) VEGFA e seu controle negativo, f) VEGFR2, g) FGF2 e h) FGFR2. As imagens foram capturadas no Aperio Scanscope XR. No canto inferior das fotos é possível se identificar a barra de escala destacada em verde.

MARCADORES RELACIONADOS À INFLAMAÇÃO

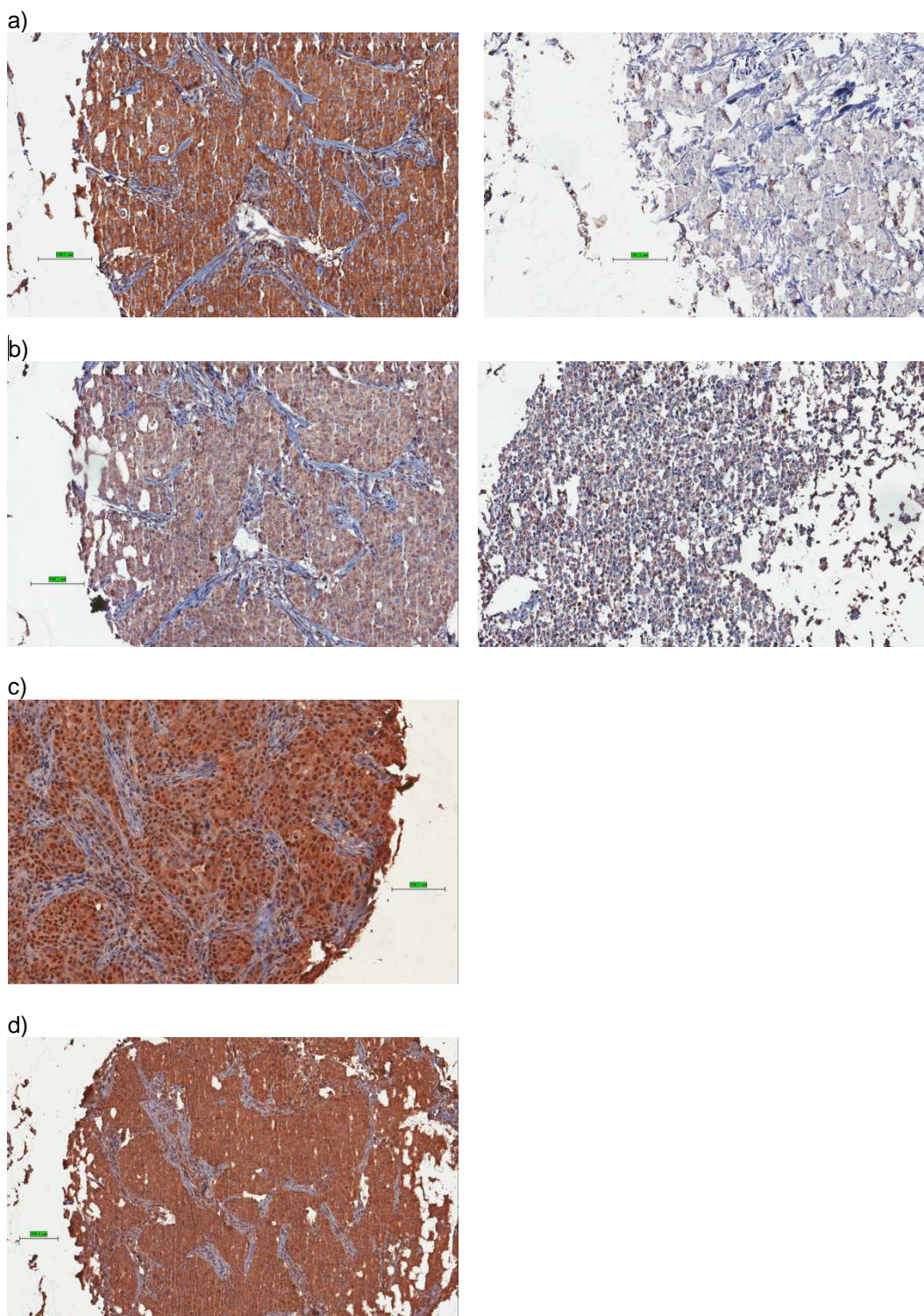


Figura 4 – Fotos representativas das marcações imunoistoquímica para análise de fatores relacionados ao processo inflamatório. As amostras (N=74) foram organizadas em um TMA (tissue microarray) e testadas simultaneamente para presença dos marcadores de interesse. a) COX2 e seu controle negativo b) NOS2 e seu controle negativo c) IL1B e d) TLR9. As imagens foram capturadas no Aperio Scanscopr XR. No canto inferior das fotos é possível se identificar a barra de escala destacada em verde.

