

**EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DE BRCA1 EM
CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E
ASSOCIAÇÕES COM AS CARACTERÍSTICAS
CLINICOPATOLÓGICAS**

CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-
Graduação Interinstitucional em Oncologia da
Fundação Antônio Prudente em Parceria com
Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer,
para obtenção do título de Mestre em Ciências
Área de concentração: Oncologia**

Orientadora: Dra. Dirce Maria Carraro

**São Paulo
2019**

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Dutra, Cintia Maria da Silva

Expressão imuno-histoquímica de BRCA1 em câncer de mama triplo negativo e associações com as características clinicopatológicas / Cintia Maria da Silva Dutra. São Paulo, 2019

56p.

Dissertação (Mestrado)-Programa de Pós-Graduação Interinstitucional em Oncologia da Fundação Antônio Prudente em parceria com o Hospital de Câncer de Pernambuco

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

Orientadora: Dirce Maria Carraro

Descritores: 1. Câncer de mama/Breast cancer. 2. Triplo negativo/Triple negative. 3. Proteína BRCA1/BRCA1 protein

AGRADECIMENTOS

Agradeço acima de tudo **a Deus**, pois sem o seu consentimento nada poderia acontecer. **Aos meus pais**, que em nenhum momento deixaram de investir e acreditar em mim. Obrigada por todo amor, zelo e dedicação.

Ao meu marido, pelo amor, companheirismo e paciência ao longo desses anos.

As minhas filhas, **Giovana e Letícia**, que tornam meus dias mais felizes e me incentivam a cada dia, pois são a razão do meu viver.

Aos meus irmãos pelo amor, carinho e apoio de família tão necessário em minha vida. Agradecer especialmente a minha orientadora **Dra. Dirce Carraro** pela sua disponibilidade de me acolher como orientanda. Agradeço pelo apoio e dedicação e compreensão necessária para o êxito desse trabalho.

Um especial agradecimento ao **A.C.Camargo Cancer Center** por disponibilizar a infraestrutura do Laboratório de Anatomopatologia para realização das análises deste trabalho, sobretudo a **Dra. Karine Damasceno e Dra. Marina De Brot** que foram responsáveis por todas as análises histológicas e de imuno-histoquímica, sendo fundamentais para a conclusão deste trabalho.

A Dra. Leuridan Torres que sempre acreditou no meu potencial e dedicou seu tempo todas às vezes que foi necessário e usou de sua compreensão e sapiência. Agradeço também pelo incentivo e acolhimento de minhas inquietudes nos momentos difíceis. A ela, meu eterno agradecimento.

Ao Hospital de Câncer de Pernambuco pela grande oportunidade.

As colegas, **Valéria Lobo e Italany Silva**, do setor de pós-graduação Stricto sensu do Hospital de Câncer de Pernambuco por toda atenção e dedicação aos assuntos de banco de dados e seleção dos blocos no laboratório de patologia do HCP.

A minha amiga e incentivadora **Carina Paiva** que dedicou algumas de suas horas para estudarmos. Agradeço sua paciência e compreensão nos momentos de ausências no ambulatório.

Agradeço também **aos funcionários** do arquivo do Hospital de Câncer de Pernambuco **Ismar, Aldir, Rosiane**. Assim como as residentes de Fisioterapia do HCP, **Karol e Renata**, pelo envolvimento no projeto.

As minhas amigas do mestrado como **Gabriela, Edla, Ana Luísa, Juvanier, Ana Maria e Hander** pela amizade, momentos de aprendizagem compartilhados e descontração.

Com carinho! Muito obrigada!

Cintia Dutra

RESUMO

Dutra CMS. **Expressão imuno-histoquímica do BRCA1 em câncer de mama triplo negativo e associações com características clinicopatológicas.** São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer].

O câncer de mama triplo negativo (CMTN) é caracterizado pela ausência de expressão dos receptores hormonais de estrógeno (ER) e progesterona (PR), como também ausência de superexpressão e/ou amplificação do receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2). Conferindo a este subtipo um comportamento mais agressivo e pior prognóstico, pela ausência de uma terapia alvo específica em comparação com os outros subtipos de tumores. Em torno de 80% dos pacientes com câncer de mama e mutações *BRCA1* são do subtipo TN. Alguns estudos mostraram a associação de mutações no gene *BRCA1/2* em mulheres com CMTN e idade menor que 40 anos. Diante do comportamento clínico agressivo e o pior prognóstico do subtipo triplo negativo, e da íntima relação com a ação defectiva de *BRCA1*, a avaliação pormenorizada da expressão da proteína *BRCA1* e de sua associação com variáveis clinicopatológicas em grupos de mulheres com CMTN e idade ≤ 40 e > 40 anos, podem revelar associações importantes que contribuam para nosso conhecimento neste tema.

Objetivo: Avaliar as características clinicopatológicas e a expressão imuno-histoquímica de *BRCA1* no câncer de mama triplo negativo diagnosticado em mulheres com idade maior ou menor que 40 anos. **Método:** Foi uma coorte retrospectiva de mulheres com câncer de mama triplo negativo atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco, Recife – PE, período entre os anos de 2011 a 2014. Os dados clinicopatológicos, bem como a determinação do imunofenótipo TN foram obtidos através do laudo do exame de imuno-histoquímica realizado de rotina no Hospital de Câncer de Pernambuco, foram coletados nos prontuários dos pacientes. As análises de imuno-histoquímica da expressão de *BRCA1* foram realizadas Laboratório de Anatomia Patologia do A.C Camargo Cancer Center, São Paulo – SP. Na análise no núcleo e citoplasma, a expressão de *BRCA1* positiva foi dividida em fraca ou

BRCA1^{low} (Hscore ≥ 5 e < 100) e forte ou BRCA1^{high} (Hscore ≥ 100). As análises das variáveis categóricas foram realizadas pelos testes de Qui-Quadrado e Exato de Fisher. A estimativa de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD) foi calculada pelo método de *Kaplan-Meier* e comparativa entre os grupos pelo teste *Log-Rank*.

Resultados: A média de idade ao diagnóstico foi de 46,17 ($\pm 9,57$) anos. Dos 61 casos, 18 (29,5%) eram mulheres com idade ≤ 40 anos e 43 (70,4%) com idade ao diagnóstico > 40 anos. A maioria das pacientes apresentou tumores de grau histológico III (83,6%), tamanho do tumor T2 (68,25), estágio II (49,1%), linfonodos negativos (62,29%) e sem invasão angiolinfática (73,7%) e invasão perineural (88,5%). Foi observada diferença significativa com relação ao grau histológico, 100% das mulheres com idade ≤ 40 anos e 76,7% com idade > 40 apresentaram tumores com grau III ($p = 0,025$). Foi encontrada uma maior frequência de níveis de BRCA1^{low} no grupo de mulheres com idade ≤ 40 anos (35,4%) quando comparada ao > 40 anos (6,6%; $p = 0,03$). No grau histológico, foi observada uma maior frequência de mulheres com tumores de alto grau histológico no grupo BRCA1^{low} (93,6%) quando comparada ao grupo BRCA1^{high} (66,7%, $p = 0,01$). A mediana da SG das pacientes foi de 64 meses e de SLD das pacientes foi de 62 meses. A mediana da SG no grupo com idade ≤ 40 anos foi de 61 meses, enquanto no grupo > 40 anos foi de 71 meses. Em 60 meses, foi observado um menor tempo de SG no grupo com idade ≤ 40 anos quando comparada ao grupo > 40 anos ($p = 0,033$). Em 60 meses, a SG do grupo com idade ≤ 40 anos foi 53,5% e no grupo > 40 anos foi 67,3% (HR:3,07; IC95% 1,08-8,65).

Conclusão: Com os resultados deste estudo, foi possível mostrar que a idade ≤ 40 anos e a expressão de BRCA1 foram fatores de pior prognóstico no câncer triplo negativo.

Descritores: Câncer de mama, Triplo negativo, Proteína BRCA1;

SUMMARY

Dutra CMS. [Immunohistochemical expression of BRCA1 in triple negative breast cancer and associations with clinicopathological characteristics]. São Paulo; 2019. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente em Parceria com a Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer].

Background: Triple negative breast cancer (TNBC) is characterized by the absence of estrogen (ER) and progesterone (PR) hormone receptors, as well as the absence of human epidermal growth factor (HER2) receptor 2 overexpression. Giving this subtype a more aggressive behavior and worse prognosis due to the absence of a specific target therapy compared to the other tumor subtypes. About 80% of breast cancer patients with BRCA1 mutations are TN subtype. Some studies have shown the association of BRCA1 / 2 gene mutations in women with TNBC and younger than 40 years. Given the aggressive clinical behavior and the worse prognosis of the triple negative subtype, and the close relationship with the defective action of BRCA1, the detailed evaluation of BRCA1 protein expression and its association with clinical-pathological variables in groups of women with TNBC and age ≤ 40 and > 40 years, may reveal important associations that contribute to our knowledge on this subject.

Aim: To evaluate the clinical-pathological characteristics and immunohistochemical expression of BRCA1 in triple negative breast cancer diagnosed in young women aged 40 years or younger. **Method:** This was a retrospective cohort of women with triple negative breast cancer treated at Pernambuco Cancer Hospital (Recife) from 2011 to 2014. Clinical and pathological data, as well as the determination of TN immunophenotype were obtained through the report of routine immunohistochemical examination performed at the Cancer Hospital of Pernambuco, were collected from the patients' medical records. Immunohistochemical analysis of BRCA1 expression were performed at the Anatomic Pathology Laboratory at A.C Camargo Cancer Center Hospital, Sao Paulo - SP. In nucleus and cytoplasm analysis, positive BRCA1 expression was divided into weak or BRCA1^{low} (Hscore ≥ 5 and <100) and strong or BRCA1^{high} (Hscore ≥ 100). Categorical variables were analyzed by Chi-square and

Fisher's exact tests. Estimated overall (OS) and disease-free (DFS) survival were calculated by the Kaplan-Meier method and comparative between groups by the Log-Rank test. **Results:** The mean age at diagnosis was 46.17 ($\pm$ 9.57) years. Of the 61 cases, 18 (29.5%) were women aged $\leq$ 40 years and 43 (70.4%) aged at diagnosis $>$ 40 years. Most patients had histological grade III tumors (83.6%), tumor size T2 (68.25), stage II (49.1%), negative lymph nodes (62.29%) and no angiolymphatic invasion (73.7 %) and perineural invasion (88.5%). Significant differences were observed regarding histological grade, with 100% of cases aged $\leq$ 40 years and 76.7% aged $>$ 40 with grade III tumors ($p = 0.025$). A higher frequency of BRCA1^{low} levels was found in the group of women aged $\leq$ 40 years (35.4%) compared to $>$ 40 years (6.6%; $p = 0.03$). In the histological grade, a higher frequency of grade III women was observed in the BRCA1^{low} group (93.6%) when compared to the BRCA1^{high} group (66.7%, $p = 0.01$). The median SG of the patients was 64 months and the SLD of the patients was 62 months. The median of the SG in the age group $\leq$ 40 years was 61 months, while in the group $>$ 40 years was 71 months. At 60 months, a shorter SG time was observed in the group $\leq$ 40 years compared to the group $>$ 40 years ($p = 0.033$). At 60 months, the SG in the age group $\leq$ 40 years was 53.5% and in group $>$ 40 years was 67.3% (HR: 3.07; 95% CI 1.08-8.65). **Conclusion:** With the results of this study, it was possible to show that age $\leq$ 40 years and BRCA1 expression were worse prognostic factors in triple negative cancer.

Key-words: Breast cancer, negative triple and BRCA1 protein.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Distribuição de incidência e mortalidade dos 10 tipos de câncer mais comuns entre as mulheres em 2018 no mundo	2
Figura 2	Distribuição de incidência dos 10 tipos de câncer mais comuns no Brasil, exceto pele não melanoma	3
Figura 3	Ilustração dos subtipos de câncer de mama segundo o perfil IHQ relacionando com o prognóstico	8
Figura 4	Fluxograma de seleção das pacientes para análise de BRCA1	20
Figura 5	Curva de sobrevida global (SG; meses) de 61 mulheres com câncer de mama triplo negativo atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014.....	36
Figura 6	Curva de sobrevida livre de doença (SLD; meses) de 61 mulheres com câncer de mama triplo negativo atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014.....	37
Figura 7	Curva de sobrevida global (SG; meses) entre os grupos de câncer de mama triplo negativo e idade ≤ 40 anos e >40 anos (Teste de log-rank, $p=0,033$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014.....	38

Figura 8	Curva de sobrevida livre de doença (SLD; meses) entre os grupos de câncer de mama triplo negativo e idade ≤ 40 anos e >40 anos (Teste de log-rank, $p=0,033$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014	38
Figura 9	Curva de sobrevida global (SG; meses) nas mulheres com câncer de mama triplo negativo e expressão positiva de BRCA1 no núcleo, comparando com os grupos com idade ≤ 40 e >40 anos (Teste de log-rank, $p=0,163$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014	39
Figura 10	Curva de sobrevida global (SG; meses) nas mulheres com câncer de mama triplo negativo e expressão positiva de BRCA1 no citoplasma, comparando com os grupos com idade ≤ 40 e >40 anos (Teste de log-rank, $p=0,163$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014 ernambuco (HCP), 2011-2014.....	40
Figura 11	Curva de sobrevida livre de doença (SLD; meses) nas mulheres com câncer de mama triplo negativo e expressão positiva de BRCA1 no núcleo, comparando com os grupos com idade ≤ 40 e >40 anos (Teste de log-rank, $p=0,615$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014	41
Figura 12	Curva de sobrevida livre de doença (SLD; meses) nas mulheres com câncer de mama triplo negativo e expressão positiva de BRCA1 no citoplasma, comparando com os grupos com idade ≤ 40 e >40 anos. Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014	41

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1	Variáveis clínico-patológicas e de evolução da doença.....	21
Quadro 2	Escala semi-quantitativa referente à imunorreatividade de HER2	24
Tabela 1	Descrição das frequências absoluta e relativa das características clínicas dos casos de câncer de mama triplo negativo. Hospital de Câncer de Pernambuco	31
Tabela 2	Descrição das frequências das características clínico-patológicas das mulheres com câncer de mama triplo negativo com idade ≤ 40 e >40 anos.....	32
Tabela 3	Associação da expressão da proteína BRCA1 no núcleo e no citoplasma entre os grupos de mulheres com idade ≤ 40 e >40 anos ...	33
Tabela 4	Associação dos níveis de expressão no núcleo com as características clínico-patológicas em mulheres com câncer de mama triplo negativo	34
Tabela 5	Associação dos níveis de expressão de BRCA1 no núcleo com as características clínico-patológicas em mulheres com câncer de mama triplo negativo.....	35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ACS	do inglês, <i>American Cancer Society</i>
AJCC	do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
ASCO	do inglês, <i>American Society of Clinical Oncology</i>
BRCA1	do inglês, <i>Breast cancer 1, early onset</i>
BRCA2	do inglês, <i>Breast cancer 2, early onset</i>
CID	Código Internacional de Doenças
CK	Citoqueratina
CNS	Conselho Nacional de Saúde
DAB	Diaminobenzidina
DNA	do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>
DSB	do inglês, <i>Double strand breaks</i>
EGFR	do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ER	do inglês, <i>Estrogen receptor</i>
FISH	do inglês, <i>Fluorescence In Situ Hybridization</i>
HBOC	do inglês, <i>Hereditary Breast and Ovarian Cancer</i>
HCP	Hospital de Câncer de Pernambuco
HER1	do inglês, <i>Human epidermal growth factor receptor 1</i>
HER2	do inglês, <i>Human epidermal growth factor receptor 2</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ki67	do inglês, <i>Antigen identified by monoclonal antibody Ki-67</i>
PARP	do inglês, <i>poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase</i>
PBS	do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
PR	do inglês, <i>Progesterone receptor</i>
QT	Quimioterapia
RHC	Registro Hospitalar de câncer
RNA	do inglês, <i>Ribonucleic acid</i>
SCN	Sistema de Classificação de Nottingham
SG	Sobrevida global

SLD	Sobrevida livre de doença
TCLE	Termo de consentimento livre e esclarecido
TN	Triplo negativo
TNM	Sistema Tumor-Nódulo-Metástase (T-tumor primário, N-linfonodo, M-metástase)
TMA	do inglês, <i>Tissue Microarray</i>
WHO	do inglês, <i>World Health Organization</i>

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Câncer de mama.....	1
1.2	Câncer de mama triplo negativo	8
1.2.1	Aspectos clínicos, diagnóstico e de tratamento	8
1.2.2	Aspectos moleculares.....	11
1.3	O Gene BRCA1	12
1.3.1	BRCA1 e câncer de mama	13
2	OBJETIVOS.....	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Detalhes do estudo	16
3.2	Crerérios de elegibilidade	16
3.3	População de estudo.....	17
3.4	Procedimentos, seleção dos participantes e coleta dos dados clínicos e amostra biológica	17
3.5	Classificação e definição das variáveis clinicopatológicas e de evolução da doença	18
3.5.1	Classificação e definição.....	18
3.6	Análise do subtipo molecular de câncer de mama.....	21
3.6.1	Expressão de Receptor de Estrógeno e Receptor de Progesterona	22
3.6.2	Expressão do Fator de Crescimento Epidermal Humano-HER-2 neuoncogene.....	22
3.7	Avaliação do tipo histológico	23
3.8	Avaliação do grau histológico.....	24
3.9	Determinação da expressão de BRCA1 por imuno-históquímica (IHQ).....	25
3.9.1	Técnica de Tissue Microrrayer (TMA).....	25

3.9.2	Imuno-histoquímica	25
3.9.3	Leitura da reação IHQ de BRCA1	26
3.10	Análise Estatística	27
3.10.1	Análises descritiva e de associação	27
3.10.2	Análises de sobrevida global e livre de doença	27
4	RESULTADOS	29
4.1	Características clínicas	29
4.2	Características clinicopatológicas com idade ≤ 40 e >40 anos	31
4.3	Expressão de BRCA1 nos tumores triplo negativos de mulheres com idade ≤ 40 e >40 anos	32
4.4	Associação dos níveis de expressão de BRCA1 com as características clinicopatológicas e de evolução da doença	33
4.5	Análise de sobrevida	35
4.5.1	Análise de sobrevida global e livre de doença	35
4.5.2	Análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença entre os grupos com idade ≤ 40 e >40 anos	36
4.5.3	Análise de sobrevida global entre os grupos com idade ≤ 40 e >40 anos com expressão positiva de BRCA1 no núcleo e citoplasma	38
4.5.4	Análise de sobrevida livre de doença entre os grupos com idade ≤ 40 e >40 anos com expressão positiva de BRCA1 no núcleo e citoplasma	39
5	DISCUSSÃO	41
6	CONCLUSÃO	46
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

APÊNDICES

Apêndice 1 Dispensa do Termo de consentimento livre e esclarecido

Apêndice 2 Formulário clínico

ANEXOS

Anexo 1 Comprovação da aprovação pelo Comitê de Ética do HCP

Anexo 2 Comprovação da aprovação pelo Comitê de Ética do A.C.Camargo
Cancer Center

Anexo 3 Classificação TNM da AJCC 8ª Edição de câncer de mama

1 INTRODUÇÃO

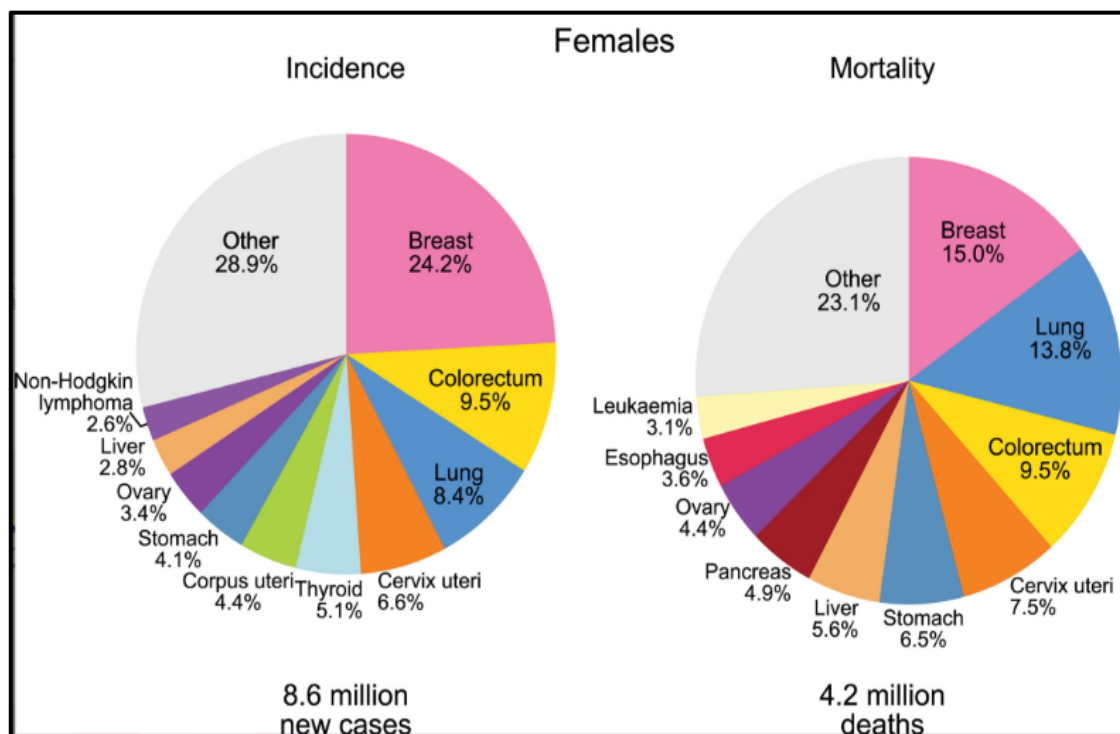
1.1 CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia de maior ocorrência entre as mulheres em países desenvolvidos ou em desenvolvimento e pode levar a altas taxas de morbimortalidade (DIELI-CONWRIGHT et al. 2014; Ministério da Saúde 2018). Esta doença compreende a principal causa de morte por câncer em mulheres em todo o mundo (KULIE et al. 2011; Ministério da Saúde 2018; American Cancer Society-ACS 2019). Por isso, o diagnóstico precoce seguido de um tratamento efetivo é uma medida de fundamental importância para a redução da mortalidade desta doença (KRAG et al. 2010; REDIG e MUNSHI 2010; Ministério da Saúde 2018).

Estimativas da GLOBOCAN 2018 de incidência e mortalidade por câncer produzidas pela Agência Internacional para pesquisa sobre câncer (IARC) indicaram uma incidência de 17 milhões de novos casos de câncer em todo mundo e 9,5 milhões de mortes por câncer excluindo câncer de pele não melanoma (BRAY et al. 2018). Entre as mulheres, o câncer de mama é o mais comumente diagnosticado com uma estimativa de 2,1 milhões de novos casos, seguido por câncer de colo retal, pulmão e colo uterino. Também representa a principal causa de morte por câncer entre as mulheres, seguidas por pulmão, colo retal e útero.

A Sociedade Americana de Câncer (do inglês *American Cancer Society-ACS*) para o ano de 2019, estimou cerca de 268.600 novos casos de câncer de mama invasivo em mulheres, com 42.260 casos de morte por câncer de mama. Representa a segunda

causa de morte entre as mulheres americanas, sendo superada apenas por câncer de pulmão e brônquios.



Fonte: Adaptado BRAY et al. (2018)

Figura 1 - Distribuição de incidência e mortalidade dos 10 tipos de câncer mais comuns entre as mulheres em 2018.

O Instituto Nacional de Câncer (INCA), para o biênio 2018 – 2019 estimou o surgimento de 600.000 novos casos de câncer no Brasil. O câncer de mama apresenta-se com maior incidência entre as mulheres e também corresponde a primeira causa de morte. Foram estimados 59.700 novos casos de câncer de mama para cada ano, correspondendo a 29,5% de todos os casos de câncer em mulheres no Brasil, seguidos pelo câncer de intestino, colo de útero e tireoide (Ministério da Saúde 2018) (Figura 2).

Para a região Nordeste foram estimados 11.860 novos casos correspondendo a 20,3% dos casos de câncer em mulheres, sendo 2.680 casos para o estado de Pernambuco o que significa aproximadamente 22% do total de câncer em mulheres (Ministério da Saúde 2018). Segundo dados do Registro Hospitalar de Câncer, Pernambuco é o terceiro estado do Nordeste que mais diagnosticou casos de câncer de mama no período de 2011 a 2017 com 10.628 casos (18,5%), ficando atrás apenas do Ceará (19,6%) e Bahia (27,5%). Em Pernambuco, segundo o mesmo registro, o Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP) surge como a unidade hospitalar que mais atende casos de câncer de mama de localização primária no mesmo período com 4.993 casos (Ministério da Saúde 2018).

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%			Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%			Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%			Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%			Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%			Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%			Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%			Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%			Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%			Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%			Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: Ministério da Saúde (2018).

Figura 2 - Distribuição de incidência dos 10 tipos de câncer mais comum no Brasil

Vários são os fatores de risco envolvidos no câncer de mama, dentre eles encontra-se: idade avançada, considerada o principal fator de risco, menstruação (idade menarca menor 12 anos e idade tardia da menopausa após 55 anos), reprodução (nuliparidade, menos filhos e primeiro filho com idade mais avançada), ingestão de hormônio (uso de anticoncepcionais e terapia hormonal na menopausa), nutrição,

aumento de peso, consumo de álcool, exposição a radiação ionizante e sedentarismo. Existem ainda os fatores que não podem ser alterados como os genéticos herdáveis. Mulheres com variantes patogênicas germinativas nesses genes (principalmente pelo *BRCA1* e *BRCA2*) tem risco maior de desenvolver tumores de mama e ovário, entre outros. Há estimativas que aproximadamente 10% dos tumores de mama são associados a mutações germinativas em genes de predisposição ao câncer (Ministério da Saúde 2018, BRAY et al. 2018, GAUDET et al. 2018; ACS 2019). No entanto, a medida que se identifica outros genes de predisposição ao câncer essas estimativas tendem a aumentar. A síndrome hereditária de câncer de mama e ovário (HBOC, do inglês, *Hereditary Breast and Ovarian Cancer*) é uma das principais e bem caracterizadas síndromes. Os genes *BRCA1* (*Breast cancer 1, early onset*) e *BRCA2* (*Breast cancer 2, early onset*) estão intimamente associados a esta síndrome, aumentando substancialmente o risco de câncer de mama (8 a 10 vezes) e ovário (até 20 vezes) em mulheres portadoras de variáveis patogênicas, quando comparados à população geral. Também conferem aumento no risco de desenvolver outros tipos de câncer como tubas uterinas e peritoneal primário, além de câncer de pâncreas (PETRUCELLI et al. 1993; DUROCHER et al. 1996; ANTONIOU et al. 2003).

Os genes *BRCA1* e *BRCA2* são classificados como genes supressores de tumor, atuando no reparo de quebra de fita dupla no DNA. A identificação das mutações desses genes é muito importante para a prevenção do câncer de mama e ovário, e/ou sua detecção precoce. As mulheres podem optar em realizar a mastectomia profilática ou procurar formas de rastreio precoce do câncer de mama e ovário (PLEVRITIS et al. 2006). Câncer de mama relacionado mutações de *BRCA1* são geralmente de início precoce, apresentam alto grau histológico e estão mais associados a tumores com

receptores hormonais negativos e não amplificação HER2, como os tumores triplo negativos (TN). Ainda há outros genes que quando mutados aumentam o risco de desenvolver câncer de mama como o TP53. SILVA et al. (2014) com critérios clínicos que suportam suspeita de câncer de mama detectaram 23% de mutações nos genes *BRCA1/2* sendo que a maior proporção foi em *BRCA1*, de forma semelhante como em estudos brasileiros realizados em pacientes com câncer de mama (FERNANDES et al. 2016; DE SOUZA TIMOTEO et al. 2018), assim como câncer de ovário (MAISTRO et al. 2016; COTRIM et al. 2019). No estudo de SILVA et al. (2014), também foi detectada variante patológica R337H no gene TP53 em três pacientes nessa população. O estudo sugere que mulheres brasileiras com critérios para HBOC e negativos para mutações de *BRCA1/2* deve ser investigado mutações para TP53.

O câncer de mama é uma doença heterogênea do ponto de vista biológico com comportamento clínico altamente variável e implicações diretas no tratamento (RAKHA et al. 2008, 2017). PEROU et al. (2000) propuseram uma classificação molecular para os tumores invasivos de mama baseada no padrão de expressão gênica. Baseia-se em 5 grupos: luminal A expressam genes próprios das células luminais, apresentam maior positividade para os receptores de estrógeno (ER) e receptores de progesterona (PR), expressão elevada de citoqueratinas (CK) 8 e 18, também apresentam geralmente um melhor desfecho clínico e uma boa resposta a terapia antiestrógeno. Luminal B compreendem tumores que expressam genes de células luminais com moderada positividade para os receptores hormonais (estrógeno e progesterona), superexpressão do HER2 e/ou Ki67 elevado, também apresentam alta expressão de citoqueratinas 8 e 18, porém, com um prognóstico mais reservado. HER2

positivo apresentam negatividade para os receptores de estrógeno e progesterona. Esses tumores respondem bem a terapia com trastuzumab, anticorpos que bloqueiam a atividade do HER2. Os tumores *Normal-like* são representados pelo grupo que expressa genes de células basais com pouca expressão de células luminais. Também é caracterizado pela ausência na expressão de: ER, PR, HER2, CK 5 e 6 e HER1. O grupo *basal-like* expressa genes que são característicos de células mioepiteliais basais como as citoqueratinas de alto peso molecular CK5, CK6, e CK17, apresentam baixa expressão dos genes ER, PR e HER2 e geralmente também são negativos para receptores hormonais e HER2 usando o método imuno-histoquímico. No entanto, nem todo tumor *basal-like*, conferido pelo perfil de expressão genica, é triplo negativo (TN), ou seja, apresenta negatividade para os ER, PR e HER2 assim como nem todos os tumores TN são *basal-like* (PRAT e PEROU 2011). Cerca de 75% dos tumores TN são *basal-like* com características biológicas e clínicas próprias, porém 25% dos tumores TN não são *basal-like*. A classificação de tumores TN é baseada no perfil imuno-histoquímico e nem todos os tumores TN apresentam características de *basal-like* (RASTELLI et al. 2010).

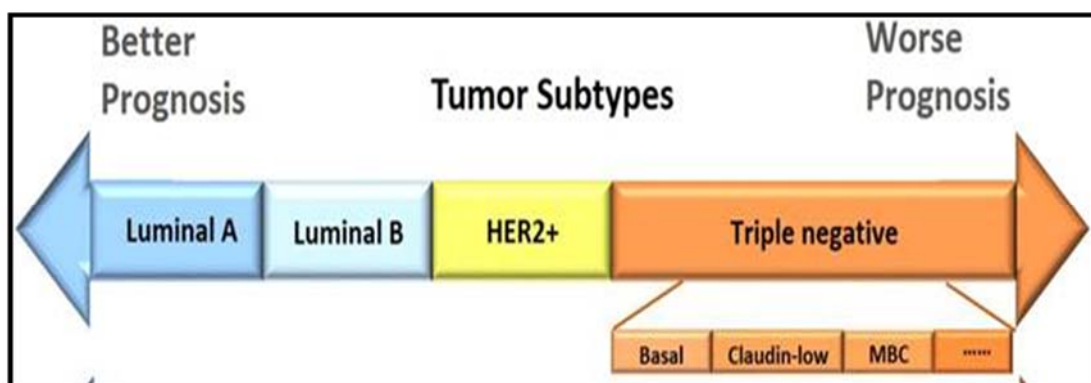
Em 2007, o mesmo autor e seus colaboradores identificaram um novo subtipo de tumor chamado de Claudin-low (claudina baixa). São essencialmente tumores triplos negativo com expressão elevada de genes envolvidos na transição epitélio-mesenquima e baixa expressão de genes relacionados a junções estreitas célula-célula. Esse grupo de tumores compartilham características de expressão gênica com o subtipo *basal-like*, incluindo baixa expressão de genes HER2 e luminal e as queratinas luminais 8 e 18. No entanto expressão baixa de gene de proliferação celular, sugerindo

que esses tumores podem ser de ciclagem lenta (HERSCHKOWITZ et al. 2007; PRAT e PEROU 2011).

Em 2015, o Consenso Internacional de Especialistas de Saint Gallen, adotou uma classificação molecular do carcinoma de mama segundo o perfil imuno-histoquímico. Esta classificação vem sendo bastante utilizada na prática clínica e é baseada na avaliação dos seguintes biomarcadores: receptores de estrógeno (ER); receptores de progesterona (PR); superexpressão ou amplificação do fator de crescimento humano epidérmico receptor-2 (HER2 - do inglês, *Human Epithelial growth factor Receptor 2*) e índice de proliferação celular Ki-67, anticorpo monoclonal que detecta um antígeno nuclear, expressando células que entram no ciclo celular e mede a fração de crescimento celular (KREIKE et al. 2007; GOLDBIRSCH et al. 2011). Segundo o mesmo consenso, foi considerado um novo valor para ponto de corte no índice de atividade proliferativa (Ki-67 20%), contudo, ainda existe divergência no que se refere a esse ponto de corte na comunidade científica.

Desta forma, são classificados quatro subtipos de câncer de mama por imuno-histoquímica, são eles: Luminal A que apresenta a expressão de receptores hormonais de estrógeno ER(+) e de progesterona PR(+), falta da superexpressão do HER2(-) e índice de proliferação celular Ki-67 < 20%, apresentando melhor prognóstico; Luminal B constituído por três grupos, sendo eles: RE e RP positivos com expressão elevadas, HER2 negativo e Ki-67 $\geq$ 20%; ER positivo, PR positivo com expressão < 20%, HER2 negativo e qualquer valor de Ki67; ER positivo, PR e Ki67 com qualquer valor e HER2 positivo. O subtipo HER2+, apresenta superexpressão de HER2 e negativo para receptores hormonais, e Triplo Negativo (TN) definido pela ausência de expressão de receptores hormonais de estrógeno e progesterona, e HER2 (RASTELLI

et al. 2010; PRAT et al. 2010; GOLDBIRSCH et al. 2011; MORRISON et al. 2012; COATES et al. 2015).



Fonte: Adaptado de DAI et al. (2017).

Figura 3 - Ilustração dos subtipos de câncer de mama segundo perfil IHQ relacionado com prognóstico.

1.2 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

1.2.1 Aspectos clínicos, diagnóstico e de tratamento

O câncer mama de triplo negativo compreende um grupo heterogêneo de tumores, corresponde a aproximadamente 10 a 20% de todas as neoplasias malignas de mama e são mais frequentes em mulheres jovens. São imunohistoquimicamente caracterizados pela ausência da expressão de receptores de estrógeno (ER), de receptores de progesterona (PR) e também pela ausência de superexpressão e/ou amplificação o receptor do fator de crescimento epidermal 2 (HER2). Conferindo a este grupo um padrão triplamente negativo. Esse subtipo abriga um comportamento mais agressivo e pior prognóstico, pela ausência de uma terapia alvo específica em comparação com os outros subtipos de tumores uma vez que a terapia hormonal e

molecular não é eficaz para os tumores TN. Assim, o tratamento padrão realizado é a quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante. Os tumores de mama TN acometem mulheres mais jovens, apresentam tumor de diâmetro maior e alto grau histológico, além de ter comportamento clínico mais agressivo. Essas mulheres apresentam altas taxas de recorrência da doença, com predileção para órgãos como pulmão e cérebro (PEROU et al. 2000; CAREY et al. 2006; RODRÍGUEZ-PINILLA et al. 2006; REIS-FILHO e TUTT 2008; DENT et al. 2009; AMIRIKIA et al. 2011; STEWARD et al. 2014; ZHANG et al. 2015; YAO et al. 2016).

A quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante baseado nas antraciclinas (doxorrubicina, epirrubicina) e/ou taxanos (docetaxel, paclitaxel), constituem o tratamento padrão para os tumores TN sendo determinado pelo seu estadiamento clínico ou patológico (ROUZIER et al 2005; CAREY et al. 2007). LIEDTKE et al. (2008), em um grande estudo com pacientes TN observaram que os pacientes submetidos a quimioterapia neoadjuvante apresentaram uma taxa de resposta patológica completa (RPC) de 40% quando comparados a tumores de outros subtipos e ainda apresentaram excelente tempo de sobrevida. Também observaram que as pacientes que apresentaram doença residual após quimioterapia neoadjuvante tiveram sobrevida global e sobrevida pós-recidiva menor, principalmente nos primeiros três anos (LIEDTKE et al. 2008).

Em torno de 80% dos pacientes com câncer de mama e mutações *BRCA1* são do subtipo TN. São caracterizados por apresentarem deficiência no reparo ao dano do DNA por quebra de fita dupla, tornando sensíveis as agentes de platina (TURNER e TUTT 2012). Vários são os estudos que avaliaram os benefícios dos agentes de platina em mulheres com câncer de mama TN com mutações de *BRCA1/2*. ISAKOFF et al.

(2015) analisaram 86 pacientes com câncer de mama TN metastático que recebeu cisplatina ou carboplatina e sugeriram que os agentes de platina são ativos para mulheres portadoras de câncer de mama TN metastático, em especial aquelas pacientes com mutações germinativas de *BRCA1/2*. Outro ensaio clínico randomizado reunindo 376 pacientes comparou os efeitos da carboplatina com docetaxel em mulheres com tumores de mama TN metastáticos ou pacientes mutações *BRCA1/2*, conferindo eficácia (ISAKOFF et al. 2015; TOVEY et al. 2015).

Vários são os estudos que estão avaliando os inibidores de PARP (PARP – do inglês, *poly (adenosine diphosphate-ribose) polymerase*) no câncer de mama TN no cenário adjuvante, neoadjuvante e metastático. Novas evidências científicas vêm sugerindo os benefícios do tratamento com inibidor de polimerase em pacientes com tumores de mama TN com mutação em *BRCA1/2*. PARP compreende uma família de enzimas com 18 componentes identificados, porém o PARP1 representa aproximadamente 90% da atividade total do PARP com papel chave no reparo ao dano do DNA por excisão de base do DNA e reparo ao dano em locais de quebra de fita simples (ROULEAU et al. 2010). Em tumores com mutação patogênica de *BRCA1/2*, apresentam eficácia no reparo de fita dupla no DNA por recombinação homóloga. O tratamento com inibidor de PARP e agentes que causam danos ao DNA nas células com mutação em *BRCA1/2*, portanto, que apresentam deficiência na recombinação homóloga e consequentemente deficiência no reparo de quebra de fita dupla, são mais eficientes a esse inibidor. Esse mecanismo é denominado de letalidade sintética (TUTT et al. 2010; O'SHAUGHNESSY et al. 2011, 2014). Foi verificada uma taxa de 59,5% de taxa objetiva de resposta e uma melhor média de sobrevida livre de progressão (7 meses contra 4,2 meses) nos subgrupos de mulheres com câncer de mama TN e HER2-

metastáticos com mutações de *BRCA1/2* que usaram olaparibe (o inibidor de PARP) quando comparado ao grupo que recebeu tratamento de quimioterapia padrão (ROBSON et al. 2017; PARK et al. 2018). Com base nesses resultados, o uso de olaparibe em pacientes com tumores TN e HER2- com mutação de *BRCA1/2* e que se mostrem resistente ao tratamento com platina foi aprovado em 2018.

1.2.2 Aspectos Moleculares

Os tumores de mama triplos negativo são biologicamente heterogêneos com subtipos moleculares intrínsecos. O objetivo do melhor entendimento desses subtipos é identificar as melhores terapias baseadas nas moléculas para esse grupo tão particular de tumores. LEHMANN et al. (2011) identificaram 6 diferentes tipos de tumores analisando o perfil de expressão gênica de 587 tumores TN: *basal-like 1* (BL1), *basal-like 2* (BL2), *imunomodulador* (IM), *mesenchimal* (M), *mesenquimal stem-like* (MSL) e luminal receptor de andrógeno (LRA).

O tipo *basal-like 1* mostrou expressão de genes envolvidos ao ciclo celular, a proliferação celular e de resposta ao dano do DNA. O subtipo *basal-like 2* expressa genes relacionados com a sinalização de fator de crescimento (EGFR – do inglês, *vascular endothelial growth factor*). Os tumores TN do subtipo basal por sua natureza proliferativa respondem bem a componentes anti-mitóticos como os taxanos. (LEHMANN et al. 2011; PRAT et al. 2013).

O subtipo *mesenchimal*, estão associados a transição epitélio-mesênquima e quimiorresistência relativa e associado a expressão de genes enriquecidos em componentes e vias que participam na motilidade celular e nas vias de diferenciação celular. Os *mesenquimal stem-like*, compartilham os mesmos genes do subtipo

mesenquimal e vias de crescimento acrescidos de genes envolvidos no processo de angiogênese assim como na sinalização imunológica. Este subtipo ainda apresenta baixa expressão de genes de proliferação celular e baixa expressão citoqueratina e CD24 (LEHMANN et al. 2011).

O grupo do luminal receptor de andrógeno expressa em abundância genes receptores de andrógeno e padrão de expressão gênica luminal. A expressão de genes envolvidos nas vias reguladas por hormônios incluindo síntese de esteroides e andrógenos (LEHMANN et al. 2011). BURSTEIN et al. (2015), realizaram uma revisão da classificação utilizando o perfil de RNA e DNA de 198 tumores de mama TN, e com isso os tumores de mama TN foram classificados em 4 subtipos: luminal receptor de andrógeno (LAR), mesenquimal (MES), basal-like imunossuprimido (BLIS) que apresentou um pior prognóstico, e basal-like imuno-ativado (BLIA). Estes apresentam níveis elevados de linfócitos no infiltrado tumoral e foram associados a menor taxa de recorrência a distância em tumores de mama TN primário (BURSTEIN et al. 2015).

1.3 O GENE BRCA1

O gene *BRCA1* foi pela primeira vez mapeado no cromossomo 17 em 1990 e clonado em 1994. É qualificado como um gene supressor de tumor e está localizado no braço longo do cromossoma 17 na posição 21 (17q21). É constituído por 5.592 pares de bases, apresenta 24 éxons dos quais 22 codificam a proteína *BRCA1* altamente complexa formada por 1.863 aminoácidos (MIKI et al. 1994; FABBRO et al. 2002). A proteína *BRCA1* apresenta em sua estrutura vários domínios, dando a capacidade de

interagir com outras proteínas e formar complexos, assim tem a capacidade de controlar e influenciar várias funções celulares através da modulação de sua interação com as diversas proteínas as quais interagem (JHANWAR-UNIYAL 2003; HUEN et al. 2010). Essa proteína desempenha papel fundamental na estabilidade gênica e está envolvida no controle do ciclo celular, na ubiquitinação de proteínas, na regulação transcricional e no reparo ao dano do DNA por quebra de fita dupla (DSB, do inglês *double-strand break*), lesão altamente danosa à célula, principalmente através do reparo de recombinação homóloga. O reparo no ponto de DSB se dá através do mecanismo de recombinação homóloga é promovido nas fases S e G2 do ciclo celular e dependente das proteínas *BRCA1* e *BRCA2*. O reparo por recombinação homóloga constitui uma das funções mais importantes do *BRCA1*. É um mecanismo de reparo seguro, livre de erros em que a célula repara o dano da quebra de fita dupla do DNA (HUEN et al. 2010).

1.3.1 BRCA1 e câncer de mama

Dados na literatura têm demonstrado que mulheres diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo com idade até 40 anos apresentam uma maior probabilidade de mutação germinativa do *BRCA1* (CARRARO et al. 2013; SCHARL et al. 2016; BRIANESE et al. 2018).

Tem-se estudado a associação da mutação germinativa de *BRCA1* e outros eventos somáticos com a perda de função de *BRCA1* em mulheres com tumores TN. Um estudo com 131 casos de câncer de mama TN avaliados demonstrou que 12,2% (16/131) das pacientes apresentaram mutação de *BRCA1/2* com perda de função, sendo que 81,2% (13/16) das mutações eram de origem germinativa de *BRCA1*. Em uma

análise mais ampla com a investigação dos eventos somáticos de silenciamento de *BRCA1* por hipermetilação do promotor desse gene, observou-se que uma parcela significativa dos tumores apresentava o promotor hipermetilado, sendo indicativo de silenciamento gênico. Interessantemente, avaliando sob a perspectiva de idade ao diagnóstico, foi observado que inativação de *BRCA1* por mutação patogênica, de origem germinativa ou somática ou hipermetilação do promotor foi significativamente associada com melhor sobrevida em mulheres jovens, diagnosticados antes dos 40 anos de idade (BRIANESE et al. 2018).

Os tumores de mama com mutação de *BRCA1* têm características clinicopatológicas distintas, como idade jovem ao diagnóstico, maior prevalência de câncer de mama bilateral, presença de tumores de mama e ovário associada. São tumores altamente proliferativos, histologicamente menos diferenciados (Grau 3) e apresentando também o subtipo medular (BERNS et al. 2001).

Diante do comportamento clínico agressivo e o pior prognóstico do subtipo triplo negativo, e da íntima relação com a ação defectiva de *BRCA1*, a avaliação pormenorizada da expressão da proteína *BRCA1* e de sua associação com variáveis demográficas, clínicas e anatomopatológicas podem revelar associações importantes que contribuam para nosso conhecimento neste tema. Com isso, nossa pretensão foi investigar a expressão de *BRCA1*, estratificando grupos de mulheres com idade até 40 anos e maior de 40 anos e consequentemente avaliar o papel prognóstico de *BRCA1* de forma específica. Além disso, a avaliação pormenorizada da expressão de *BRCA1* pode auxiliar na compreensão das curvas de sobrevida, livre de doença e sobrevida global, destes dois grupos de pacientes atendidas em hospital de referência no tratamento oncológico da rede SUS do Estado de Pernambuco.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características clinicopatológicas e a expressão imuno-histoquímica de *BRCA1* no câncer de mama triplo negativo diagnosticado em mulheres com idade maior ou menor que 40 anos.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Descrever as frequências das características clinicopatológicas e associa-las aos grupos de mulheres com idades ≤ 40 e > 40 anos;
- Determinar a expressão proteica de *BRCA1* e a localização subcelular e associá-la as características clinicopatológicas dos grupos de mulheres com idades ≤ 40 e > 40 anos;
- Avaliar a sobrevida global e livre de doença de acordo os grupos etários estudados e com o perfil de expressão de *BRCA1*^{low} e *BRCA1*^{hgh} no núcleo e citoplasma.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 DETALHAMENTO DO ESTUDO

Foi uma coorte retrospectiva de mulheres com câncer de mama triplo negativo atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco (Recife) período entre os anos de 2011 a 2014. As análises de imuno-histoquímica da expressão de BRCA1 foram realizadas no Laboratório de Anátomo Patologia do A.C.Camargo Cancer Center, São Paulo – SP O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa m seres humanos do Hospital de Câncer de Pernambuco sob o CAEE 66221717.1.0000.5205 e da Fundação Antônio Prudente sob o CAEE 66221717.1.3001.5432 (Anexo 1), seguindo a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde. A aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE – Apêndice 1) foi dispensada devido à dificuldade de contatar as participantes por se tratar de uma pesquisa retrospectiva.

3.2 CRITÉRIOS DE ELEGIBILIDADE

Os critérios de inclusão foram:

- Idade ≥ 18 e < 65 anos
- Ter diagnóstico histológico confirmado de câncer de mama subtipo tumoral triplo negativo;
- Pacientes sem tratamento prévio de quimioterapia ou radioterapia;

- Ter material biológico apropriado para a realização da análise;
- Ter informações completas no prontuário necessárias ao estudo.

Os Critérios de exclusão foram:

- Metástase no momento do diagnóstico;
- Casos de câncer de mama masculino;
- Neoplasia prévia, exceto câncer de pele não melanoma.

3.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

A população de estudo foi composta por 61 mulheres com câncer de mama do triplo negativo (CMTN) tratadas no Hospital de Câncer de Pernambuco no período de 2011 a 2014.

3.4 PROCEDIMENTOS, SELEÇÃO DOS PARTICIPANTES E COLETA DOS DADOS CLÍNICOS E AMOSTRA BIOLÓGICA

Foram identificados 204 registros de mulheres com diagnóstico de câncer de mama triplo negativo atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco no período de 2011 a 2014.

A seleção das amostras de tecido tumoral foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do HCP. Foram incluídas no estudo as amostras negativas para receptores de estrógenos (ER) e progesterona (PR), utilizando o score 0/ 1+ para HER2 pelo método de imuno-histoquímica (IHQ). Para as amostras que apresentaram HER2

com score 2+, foi realizada a confirmação pelo teste de FISH. A partir desta seleção, foi realizado o preenchimento do formulário clínico (Apêndice 2) por meio da busca de informações nos prontuários das pacientes.

Para os pacientes com câncer de mama triplo negativo que atendiam aos critérios de elegibilidade, foram selecionados os blocos parafinados de peça cirúrgica dos pacientes ao Laboratório de Anatomia Patológica do HCP. Nenhum dos pacientes selecionados no estudo foi submetido a tratamento de quimioterapia ou radioterapia no pré-operatório. A determinação do imunofenótipo TN foi seguida conforme as informações contidas no laudo dos exames de imuno-histoquímicas realizados do Laboratório de Anatomia Patológica do HCP. A análise de expressão de BRCA1 por imuno-histoquímica foi realizado no A.C.Camargo Cancer Center. O fluxograma descreve as etapas de seleção das pacientes (Figura 4).

3.5 CLASSIFICAÇÃO E DEFINIÇÃO DAS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS E DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA

3.5.1 Classificação e definição

As variáveis clinicopatológicas e evolução da doença foram coletadas no prontuário do paciente, incluindo exames complementares e fichas de procedimentos. As descrições das variáveis constam no Quadro 1.

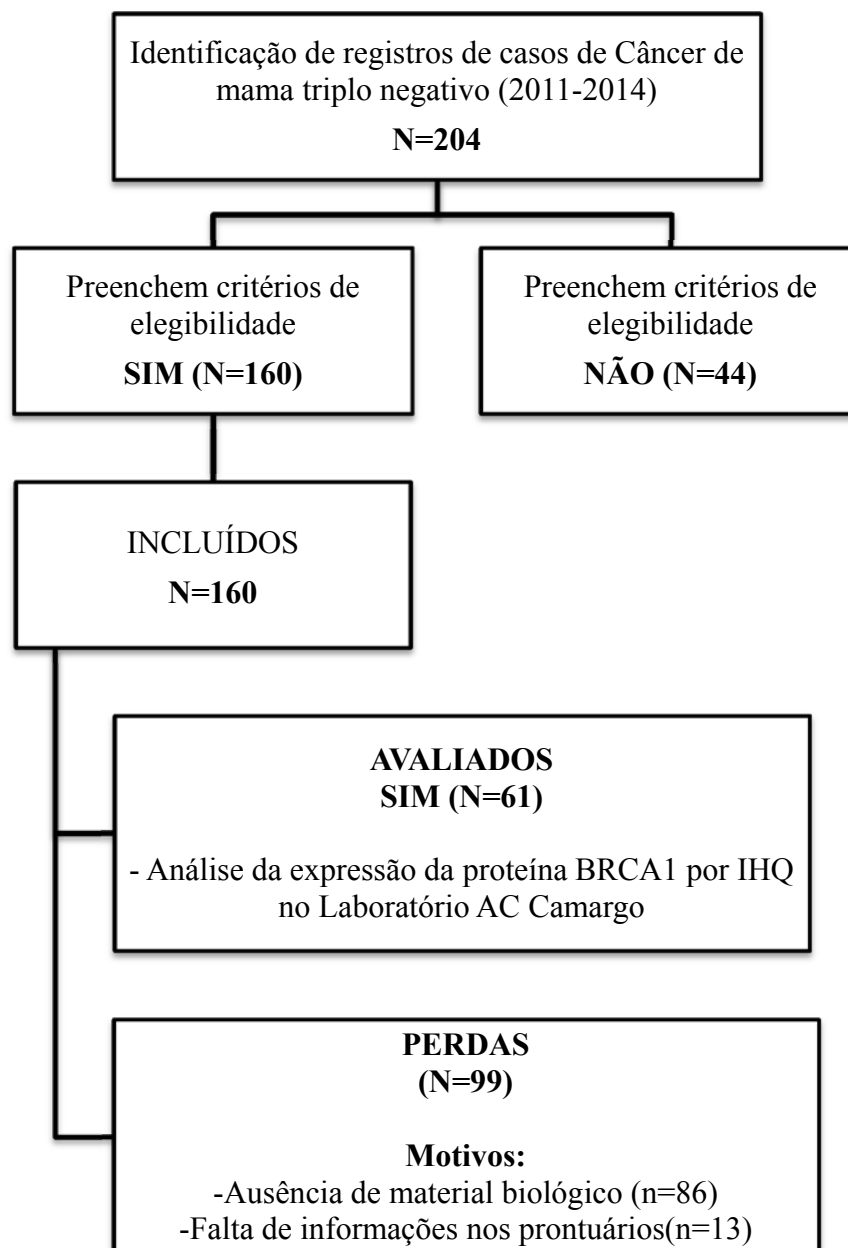


Figura 4 - Fluxograma de identificação e inclusão dos pacientes.

Quadro 1 - Variáveis clínico-patológicas e de evolução da doença.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Estágio patológico(T)	Mama TX: tumor primário não pode ser avaliado T0: Sem evidência de tumor primário Tis: Carcinoma <i>in situ</i> T1: tumor ≤ 2 cm em sua maior dimensão T2: tumor > 2 cm ≤ 5 cm em sua maior dimensão T3: tumor > 5 cm na maior dimensão T4: tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e/ou pele (ulceração ou nódulos macroscópicos) e/ou carcinoma inflamatório.	Variável nominal policotômica 1. TX 2. T0 3. Tis 4. T1 5. T2 6. T3 7. T4
Estágio patológico (N)	NX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados N0: Linfonodos sem evidência de metástase N0i(+): Células tumorais isoladas não superiores a 0,2mm N1: Micrometástases ou metástase em 1 a 3 linfonodos axilares; e/ou linfonodos mamários internos negativos com micrometástase ou macrometástase na biópsia do linfonodo sentinela N1mi: Micrometástases até 2 mm N1a: Metástase em 1-3 linfonodos axilares com pelo menos 1 metástase maior que 2cm N1b: Metástase em linfonodo mamário interno ipsilateral N1c: Combinação N1a e N1b N2: Metástase em 4-9 linfonodos axilares ou linfonodo mamário interno positivo ipsilateral por imagem e ausência de metástase no linfonodo axilar N2a: Metástase 4-9 linfonodos axilares com pelo menos um linfonodo maior que 2 cm em sua maior dimensão N2b: Metástase em linfonodos mamários internos detectados clinicamente com ou sem confirmação microscópica; com linfonodos axilares negativos patologicamente N3: Metástase em 10 ou mais linfonodos axilares; ou linfonodos infraclavicular ou linfonodos mamários internos ipsilateral N3a: Metástase em 10 ou mais linfonodos (pelo menos 1 > 2 cm); ou metástases para linfonodos intra-claviculares N3b: pN1a ou pN2a na presença de cN2b (linfonodos mamários internos positivos por imagem) ou pN2a na presença de pN1b N3c: Metástases em linfonodos supra-claviculares ipsilateral	Variável nominal policômica 1. pNX 2. pN0 3. pN0i(+) 4. pN1 5. pN1mi 6. pN1a 7. pN1b 8. pN1c 9. pN2 10. pN2a 11. pN2b 12. pN3 13. pN3a 14. pN3b 15. pN3c
Metástase (M)	Presença de metástases à distância	Variável nominal dicotômica 1. Não 2. Sim

Cont/ Quadro 1

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO OPERACIONAL	CATEGORIZAÇÃO
Grau histológico	Diagnóstico de carcinoma invasivo de mama confirmado por exame histopatológico da peça cirúrgica: G1 –baixo grau histológico (favorável); SBR score 3-5 pontos G2 – Grau histológico intermediário (moderadamente favorável); SBR score 6-7 pontos G3- Alto grau histológico (desfavorável); SBR 8-9 pontos	Variável nominal policotômica 1. G1 2. G2 3. G3
Invasão perineural	De acordo com a descrição microscópica foi observada invasão neural (invasão de nervo)	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim
Invasão angiolinfática	De acordo com a descrição microscópica foi observada invasão vascular (invasão dos vasos sanguíneos ou angiolinfática)	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim
Recorrência locorregional	Retorno do câncer após o tratamento com intuito curativo.	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim
Recorrência à distância	Retorno do câncer após o tratamento com intuito curativo.	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim
Óbito	Estado vital por ocasião do término de acompanhamento da coorte	Variável nominal dicotômica 1 Não 2 Sim

3.6 ANÁLISE DO SUBTIPO MOLECULAR DE CÂNCER DE MAMA POR IMUNOHISTOQUIMICA

As amostras teciduais do carcinoma mamário foram incluídas em bloco de parafina e submetidas a cortes de 2 a 3 micra em micrótomo e coradas pelo método do complexo avidina-biotina-peroxidase montadas em lâminas silanizadas que foram da marca STARFROST extremidade branca.

Os anticorpos utilizados de rotina anti-receptores hormonais de estrogênio e progesterona, e anti-receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, o marcador de proliferação celular Ki-67.

A recuperação antigênica foi realizada em tampão de citrato (T-fal Steam Cuisine 700 – 10mM, pH 9,0 e 90°C). A amplificação da reação foi realizada no Dakoautostainer (Universal Staining System – Dako). O controle negativo foi obtido substituindo-se o anticorpo primário por solução salina tamponada. Os controles positivos e negativos foram utilizados para cada teste.

3.6.1 Expressão de Receptor de Estrógeno e Receptor de Progesterona

O status dos receptores de estrógeno e progesterona é avaliado pela técnica de imuno-histoquímica. Os receptores hormonais foram considerados positivos com uma expressão de ER ou PR maior ou igual a 1% de coloração nuclear (o que corresponderia a um *Allred* ≥ 3), representa RE e RP positivos (HAMMOND et al. 2010).

O anticorpo anti-humano monoclonal primário anti-receptor de estrógeno (clone/SP1) na diluição de 1:250.

O anticorpo primário para o receptor de progesterona foi o clone PgR 636 que é um anticorpo anti-humano monoclonal de camundongo, em diluição de 1:80.

3.6.2 Expressão Fator de Crescimento Epidermal Humano-HER-2 neuoncogene

O HER-2 é um receptor transmembranico de tirosina quinase pertencente à família dos receptores do fator de crescimento epidermal humano (EGFR). O oncogene ERBB/HER2 está localizado no cromossomo 17q21. Este oncogene é amplificado em 20 a 30% dos cânceres de mama e é considerado um marcador de pior prognóstico (BANIN HIRATA et al. 2014).

A superexpressão do HER2 é confirmada com a coloração das membranas celulares em cor castanha. O anticorpo primário para o HER2 ou c-erbB2 foi o clone SP3 anticorpo monoclonal em diluição de 1:400.

Os resultados foram analisados através da escala semi-quantitativa seguindo as recomendações da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) e *College of American Pathologists* (CAP). O HER2 foi considerado positivo quando o escore foi 3+ ou amplificação pelo método FISH (WOLFF et al. 2018). Utilizando-se os seguintes parâmetros a seguir (Quadro 2).

Quadro 2 - Escala semi-quantitativa referente à imunorreatividade de HER2

ESCORE	CARACTERÍSTICAS
0	nenhuma célula positiva
1+	imunorreatividade de membrana, fraca e irregular em pelo menos 10% das células.
2+	imunorreatividade de membrana, de intensidade fraca a moderada, porém regular em mais de 20% das células.
3+	imunorreatividade de membrana, com forte intensidade, em pelo menos 30% das células.

*Foi considerado HER-2 positivo as colorações que apresentarem escore 3+ ou amplificação pelo método FISH.

3.7 AVALIAÇÃO DO TIPO HISTOLÓGICO

A classificação dos tumores de mama proposta pela *World Health Organization* (WHO) abrange os cânceres de mama invasivos, lesões precursoras, lesões de baixo potencial maligno, proliferações epiteliais benignas além das neoplasias fibroepiteliais, mioepiteliais e mesenquimais (LAKHANI et al. 2012). A WHO descreve mais de 40 tipos de carcinomas de mama invasivos entre tipos e subtipos.

O carcinoma invasivo do tipo não especial (NST) é o tipo histológico mais frequente (40-80%), compreende todos os tumores que não apresentam características diferenciadoras específicas que caracterizam os outros tipos de câncer de mama. Os carcinomas do tipo misto apresentam um padrão especializado em pelo menos 50% do tumor e um padrão não especializado em 10 e 49% do tumor.

Os carcinomas invasivos de mama apresentam subtipos especiais incluindo os carcinomas lobulares invasivos, tubulares, cribiforme, metaplásico, apócrino, mucinoso, papilar e micropapilar. Inclui também os carcinomas com características medulares e neuroendócrinas (LAKHANI et al. 2012; SINN et al. 2013).

3.8 AVALIAÇÃO DO GRAU HISTOLÓGICO

Os aspectos morfológicos analisados foram o grau histológico que foi baseado na Escala de *Scarff-Bloom-Richardson* modificada por *Elston-Ellis* conhecida como Sistema de Classificação de *Nottingham* (SCN). Os tumores foram definidos como grau histológico 1, 2 e 3. Esse grau se baseia no percentual de diferenciação tubular, ou seja, formação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico (microscópio Olympus CX 22 led) para cada aspecto analisado e os escores variam da pontuação de 1 a 3, sendo o escore 1 indicativo de melhor prognóstico para os pacientes (AMIN et al. 2017).

Além disso, foi analisado o *status* da cadeia linfonodal que compreende o número de linfonodos dissecados, número de linfonodos comprometidos, ou seja, contagem linfonodos axilares comprometidos por células do carcinoma mamário através de evidências histológicas e tamanho do maior foco metastático. Análise do

processo de invasão linfovascular e invasão perineural. Mensurado tamanho do tumor, medida obtida pelo maior diâmetro do componente invasivo do tumor e realizado o estadiamento patológico baseado de acordo com o Sistema TNM (Tumor-Nódulo-Metástase) (AMIN et al. 2017). Estes procedimentos de análise histopatológica são realizados de rotina no hospital de Câncer de Pernambuco, e os resultados foram anexados em prontuários e assim utilizados para esta pesquisa.

3.9 DETERMINAÇÃO DA EXPRESSÃO DE BRCA1 POR IMUNO-HISTOQUÍMICA

3.9.1 Técnica de *Tissue Microarray* (TMA)

A construção do TMA se deu após a seleção e identificação das áreas mais representativas do tumor, quantitativa e qualitativa, de cada bloco doador. Foi utilizado o *tissue microarrayer* (Beecher Instruments, Silver Spring, Maryland) e a área de interesse foi retirada a partir de uma região circular de 1mm de cada bloco doador e transferida para um bloco receptor. Os TMAs foram construídos em duplicata de cada caso, cada um contendo amostra de uma região diferente do tumor. A partir do bloco receptor foram preparados os cortes histológicos, secções de 4µm foram cortadas e coletadas sobre lâminas com carga.

3.9.2 Imuno-histoquímica

A técnica de IHQ foi realizada usando lâminas do TMA com cortes de 4µm contendo todos os casos e controles. As lâminas foram desparafinizadas, reidratadas em uma série de álcoois progressivamente diluídos, e submetidas à recuperação antigênica pelo calor (panela de pressão a 125° por 10 minutos) com solução de citrato

de sódio pH 6.0. Posteriormente as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 3% em metanol para o bloqueio da atividade da peroxidase endógena por 15 minutos. Após o resfriamento, as lâminas foram cobertas com solução de bloqueio por 30 minutos. Em seguida as lâminas foram incubadas com o anticorpo primário (anti-*BRCA1*, clone MS110, 1:100, Calbiochem Merck) por uma hora a temperatura ambiente. Vários estudos mostraram a confiabilidade e reprodutibilidade deste anticorpo quando usados em material fixado em formalina. Após lavagem com tampão fosfato (PBS), foi aplicado o método de amplificação com identificação a partir de anticorpo secundário e revelação polimérica (ADVANCE HRP-ready to use—DakoCytomation). Por último, as secções foram expostas ao cromógeno 3,3 – diaminobenzidina 4 HCL (DAB) e contra-coradas com hematoxilina de Mayer's. Corte de glândula mamária normal foi utilizado como controle positivo. Controles negativos foram obtidos pela substituição do anticorpo primário por soro normal de coelho.

3.9.3 Leitura da reação imuno-histoquímica de *BRCA1*

A avaliação imuno-histoquímica foi realizada segundo RAHKA et al. (2008), onde foi incluída a avaliação de intensidade de marcação e porcentagem de células marcadas. Para a intensidade, foi utilizado o escore de 0, 1, 2 e 3, correspondendo a negativo, fraco, moderado e intenso. A porcentagem de células positivas foi estimada subjetivamente. Ao final, um escore de 0 a 300 foi obtido pela multiplicação da intensidade e porcentagem. Além disso, foi avaliada a localização subcelular e o padrão de expressão foi citoplasmático e nuclear. O *Tissue Microarray* foi construído em dois cores de cada caso e avaliado para cada tumor. Cada core foi avaliado

individualmente e calculada a média. Se uma das cores foi perdida ou não apresentava tumor, o escore global foi aplicado apenas no core remanescente. O caso foi considerado positivo quando pelo menos 5% das células neoplásicas revelavam expressão de *BRCA1*. A expressão nuclear foi estratificada em três grupos a partir do *cut off* - Hscore = 100), definido por RAHKA et al. (2008) sendo considerado negativo (< 5) e positivo (≥ 5). Na análise no núcleo, a expressão de *BRCA1* positiva foi dividida em fraca ou *BRCA1^{low}* (Hscore ≥ 5 e < 100) e forte ou *BRCA1^{high}* (Hscore ≥ 100). A expressão citoplasmática de *BRCA1* positiva foi dividida em dois grupos: Hscore > 5 e ≤ 100 (*BRCA1^{low}*) e > 100 (*BRCA1^{high}*).

3.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.10.1 Análises descritiva e de associação

A estatística descritiva das variáveis categóricas foi representada em tabelas com distribuição das frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis contínuas foram apresentadas como medidas de tendência central (mediana e interquartil 25-75 ou média e desvio padrão). Para a avaliação da distribuição das variáveis contínuas foi realizado o teste de *Shapiro Wilk*. Para verificação da existência de associação entre variáveis categóricas foram usados o Teste de Qui-Quadrado e o Teste Exato de Fisher quando adequado.

3.10.2 Análise de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD)

Todas as curvas de sobrevida foram expressas em percentuais versus tempo em meses. O óbito foi considerado o evento final. A SG foi considerada como o período

de tempo em meses entre o diagnóstico patológico e a ocorrência do óbito por qualquer causa. As pacientes vivas foram censuradas até o último seguimento. Para a sobrevida livre de doença (SLD), foi considerado o intervalo de tempo em meses compreendido entre o diagnóstico patológico até o surgimento do segundo tumor primário, recorrência da doença não invasiva e morte.

As pacientes vivas foram monitorizadas até o último seguimento (última consulta ou óbito). Todas as pacientes foram acompanhadas até 30 de setembro de 2017, data adotada como último seguimento do estudo. A estimativa de sobrevida global e livre de doença foi calculada pelo método de Kaplan-Meier. No caso dos pacientes vivos (censurado), foi considerada do período entre o início do tratamento até o dia do último seguimento. As análises estatísticas foram feitas no programa estatístico *graphpad prism* (versão 8.0). Foi considerado significativo $p < 0.05$. (San Diego, CA).

4 RESULTADOS

4.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

No presente estudo, incluiu-se mulheres com câncer de mama triplo negativo, com média de idade ao diagnóstico foi de 46,17 ($\pm 9,57$) anos, com mínimo de 25 anos e máximo de 64 anos. O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma invasivo do tipo não especial (SOE) também denominado carcinoma ductal invasivo, correspondendo a 93,4% dos casos. Dos 61 casos, 18 (29,5%) eram mulheres com idade ≤ 40 anos e 43 (70,4%) com idade ao diagnóstico > 40 anos. A maioria das pacientes apresentou tumores com grau histológico III (83,6%), tamanho do tumor T2 (68,25), estágio II (49,1%), linfonodos negativos (62,29%) e sem invasão angiolinfática (73,7%) e invasão perineural (88,5%). Os detalhes das frequências das características clínicas se encontram na Tabela 1.

Tabela 1 - Descrição das frequências absoluta e relativa das características clínicas dos casos de câncer de mama triplo negativo. Hospital de Câncer de Pernambuco, 2011-2014.

CARACTERÍSTICAS	N=61	%
Idade (anos)		
Média (DP)	46,17 ($\pm 9,57$)	
mínimo – máximo	25-69	
Faixa Etária		
≤ 40 anos	18	29,5
> 40 anos	43	70,4
Tipo Histológico		
*SOE	57	93,4
Metaplásico	1	1,6
Medular	3	4,9
Grau Histológico		
II	10	16,3
III	51	83,6
Tamanho do Tumor		
T1 (< 2 cm)	6	9,8
T2 (≥ 2 cm e < 5 cm)	42	68,8
T3 (≥ 5 cm)	13	21,3
Status Linfonodal		
Positivo	23	37,7
Negativo	38	62,2
Invasão Angiolinfática		
Presente	14	22,9
Ausente	45	73,7
NA	2	3,2
Invasão Perineural		
Presente	5	8,2
Ausente	54	88,5
NA	2	3,2
Estadiamento		
I	5	8,2
IIA	30	49,2
IIB	17	27,8
IIIA	9	14,7

*SOE: carcinoma invasivo do tipo não especial; DP: Desvio Padrão

4.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E PATOLÓGICAS DAS MULHERES COM IDADE ≤ 40 E > 40 ANOS

Foi observada diferença significativa com relação ao grau histológico, com 100% dos casos com idade ≤ 40 anos e 76,7% com idade > 40 com tumores de grau histológico III ($p= 0,025$). Para as demais variáveis, não foram observadas diferenças significativas. A seguir, Tabela 2.

Tabela 2 - Descrição das frequências das características clinicopatológicas das mulheres com câncer de mama triplo negativo com idade ≤ 40 e > 40 anos.

Faixa Etária (anos)					
CARACTERÍSTICAS	Idade ≤ 40		Idade > 40		* p valor
	N=18	%	N=43	%	
Grau Histológico					0,025
II	0	0	10	23,2	
III	18	100	33	76,7	
Tamanho do Tumor					0,13
T1 /T2	12	66,6	36	83,7	
T3	6	33,3	7	16,2	
Status Linfonodal					0,65
Positivo	6	33,3	17	39,5	
Negativo	12	66,6	26	60,4	
Invasão Angiolinfática					0,88
Presente	4	22,2	10	23,2	
Ausente	12	66,6	33	76,7	
Invasão Perineural					0,08
Presente	3	16,6	2	4,6	
Ausente	13	72,2	41	95,3	
Estadio					0,60
I-II	16	88,8	36	83,7	
III	2	11,1	7	16,2	

*SOE: carcinoma invasivo do tipo não especial. * Teste Exato de Fischer. Foi considerado significativo $p < 0,05$.

4.3 EXPRESSÃO DE BRCA1 NOS TUMORES TRIPLO NEGATIVOS DE MULHERES COM IDADE ≤ 40 E > 40 ANOS

Foi encontrada uma maior frequência de tumores com expressão citoplasmática negativa de BRCA1 nas mulheres com idade ≤ 40 anos quando comparada em mulheres com idade >40 anos ($p=0,04$). Na análise do nível de expressão positiva de BRCA1 no núcleo, verificou-se uma maior frequência de BRCA1^{low} (91,6%) no grupo de mulheres com idade ≤ 40 anos quando comparada ao > 40 anos (58,8%, $p=0,03$). Também foi observada uma maior frequência de BRCA1^{high} (41,1%) nas mulheres com idade > 40 anos quando comparada as mulheres com idade ≤ 40 anos (8,3%, $p=0,03$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Associação da expressão da proteína BRCA1 no núcleo e no citoplasma entre os grupos de mulheres com idade ≤ 40 anos e > 40 anos.

	Faixa Etária (anos)				p valor*
	Idade ≤ 40		Idade > 40		
Expressão BRCA1 negativa ou positiva					
Núcleo	N=18	%	N=43	%	0,34
Negativo	6	33,3	9	20,9	
Positivo	12	66,6	34	79,0	
Citoplasma	N=18		N=42		0,04
Negativo	3	16,6	1	2,3	
Positivo	15	83,3	42	97,6	
Nível de expressão de BRCA1					
Núcleo	N=12	%	N=34	%	0,03
BRCA1 ^{Low}	11	91,6	20	58,8	
BRCA1 ^{high}	1	8,3	14	41,1	
Citoplasma	N=18		N=42		0,28
BRCA1 ^{Low}	9	50	24	57,1	
BRCA1 ^{high}	12	66,6	18	42,8	

Cutoff: H-score = 100; Negativo (< 5); Positivo (≥ 5). Na análise no núcleo, a expressão de BRCA1 positiva foi dividida fraca ou BRCA1^{low} (Hscore ≥ 5 e < 100) e forte ou BRCA1^{high} (Hscore ≥ 100). A expressão citoplasmática de BRCA1 positiva foi dividida em dois grupos: Hscore ≥ 5 e ≥ 100 (BRCA1^{low}) e > 100 (BRCA1^{high}). * Teste Exato de Fischer. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

4.4 ASSOCIAÇÃO DOS NÍVEIS DE EXPRESSÃO DE BRCA1 COM AS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E DE EVOLUÇÃO DA DOENÇA

- **Expressão de BRCA1 no citoplasma**

Dos 61 casos de câncer de mama triplo negativo, todos apresentaram expressão de BRCA1 no citoplasma celular, sendo 36 casos com expressão fraca (BRCA1^{Low}; ≥ 5 e ≤ 100) e 25 casos com expressão forte (BRCA1^{high}; > 100) no citoplasma celular.

Não foram observadas diferenças significativas nas frequências das características clínico-patológicas entre os grupos com níveis de BRCA1^{low} e BRCA1^{high} (Tabela 4).

Tabela 4 - Associação dos níveis de expressão de BRCA1 no citoplasma com as características clinicopatológicas em mulheres com câncer de mama triplo negativo.

Variáveis	Nível de expressão BRCA1 no citoplasma		Valor de p
	BRCA1 ^{low}	BRCA1 ^{high}	
	N=31 (%)	N=25 (%)	
Idade			0,58
≤ 40 anos	11 (35,4)	7 (28,0)	
>40 anos	20 (64,5)	18 (72,0)	
Grau			1,0
II	30 (96,7)	22 (88)	
III	1 (3,2)	2 (8)	
Tamanho			0,32
T1 (<2cm)	3 (9,6)	3 (12)	
T2 (≥ 2cm e <5cm)	23 (74,1)	14 (56)	
T3 (≥ 5 cm)	5 (16,1)	8 (32)	
Status linfonodal			0,96
Negativo	20 (64,5)	16 (64)	
Positivo	11 (32,2)	9 (24)	
Estadio			0,14
I-II	28 (90,3)	19 (76,0)	
III	3 (9,7)	6 (24,0)	

A expressão citoplasmática de BRCA1 positiva foi dividida em dois grupos: Hscore ≤ 100 (BRCA1^{low}) e > 100 (BRCA1^{high}). * Teste Exato de Fischer. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$.

- **Expressão de BRCA1 no núcleo**

Na análise no núcleo, a expressão de BRCA1 positiva foi dividida em fraca ou ($BRCA1^{low}$; Hscore ≥ 5 e < 100) e forte ($BRCA1^{high}$; Hscore ≥ 100). Foi encontrada uma maior frequência de níveis de $BRCA1^{low}$ em tumores do grupo de mulheres com idade ≤ 40 anos (35,4%) quando comparada ao > 40 anos (6,6%; $p=0,03$). No grau histológico, foi observada uma maior frequência de mulheres com tumores de grau histológico III no grupo $BRCA1^{low}$ (93,6%) quando comparada ao grupo $BRCA1^{high}$ (66,7%, $p=0,01$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Associação dos níveis de expressão de BRCA1 no núcleo com as características clinicopatológicas em mulheres com câncer de mama triplo negativo.

Variáveis	Nível de expressão BRCA1 no núcleo		p valor
	$BRCA1^{low}$	$BRCA1^{high}$	
	N=31	N=15	
Idade			0,03*
≤ 40 anos	11 (35,4)	1 (6,6)	
>40 anos	20 (64,5)	14 (93,3)	
Grau Histológico			0,01*
II	2 (6,4)	5 (33,3)	
III	29 (93,6)	10 (66,7)	
Tamanho			0,53**
T1 (<2 cm)	3 (9,6)	3 (20)	
T2 (≥ 2 cm e <5 cm)	21 (67,7)	10 (66,7)	
T3 (≥ 5 cm)	7 (22,5)	2 (13,4)	
Status Linfonodal			0,35*
Positivo	18 (58)	11 (73,4)	
Negativo	13 (35,4)	4 (13,3)	
Estadio			0,45*
I-II	24 (6,4)	13 (13,4)	
III	7 (22,6)	2 (13,3)	

* Teste Exato de Fischer. **Teste de Qui-quadrado. Foi considerado significativo valor de $p < 0,05$

4.5 ANÁLISE DE SOBREVIDA

4.5.1 Análise de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD)

A mediana da SG das pacientes foi de 64 meses. Em 24 meses, a SG das pacientes foi 94,4%. (Figura 5). A mediana de SLD das pacientes foi de 62 meses. A sobrevida livre de doença das pacientes em 24 meses foi 92% (Figura 6).

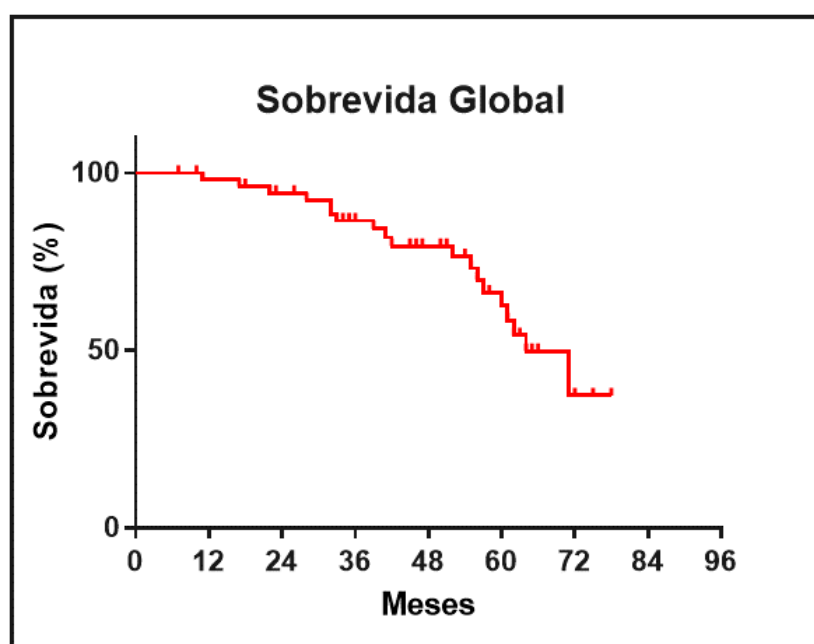


Figura 5 - Curva de Sobrevida global (meses) de 61 mulheres com câncer de mama triplo-negativo atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014. A estimativa de sobrevida global foi calculada pelo método de Kaplan-Meier

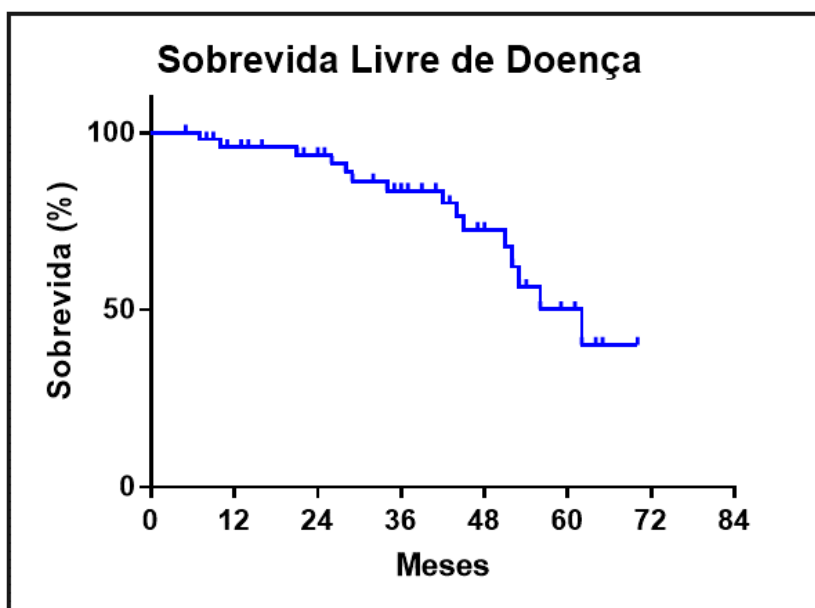


Figura 6 - Curva de Sobrevida livre de doença (meses) de 61 mulheres com câncer de mama triplo-negativo atendidas no Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014. A estimativa de sobrevida livre de doença foi calculada pelo método de Kaplan-Meier.

4.5.2 Análise de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD) entre os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos

A mediana da sobrevida global das mulheres com idade ≤ 40 anos foi de 61 meses, enquanto a mediana de SG no grupo > 40 anos foi de 71 meses ($p=0,033$). Em 60 meses, sobreviveram 53,5% de mulheres com idade ≤ 40 e 67,3% com idade > 40 anos (HR:3,07; IC95% 1,08-8,65) (Figura 7).

Na análise da sobrevida livre de doença entre os grupos, não foram observadas diferenças significativas (Figura 8).

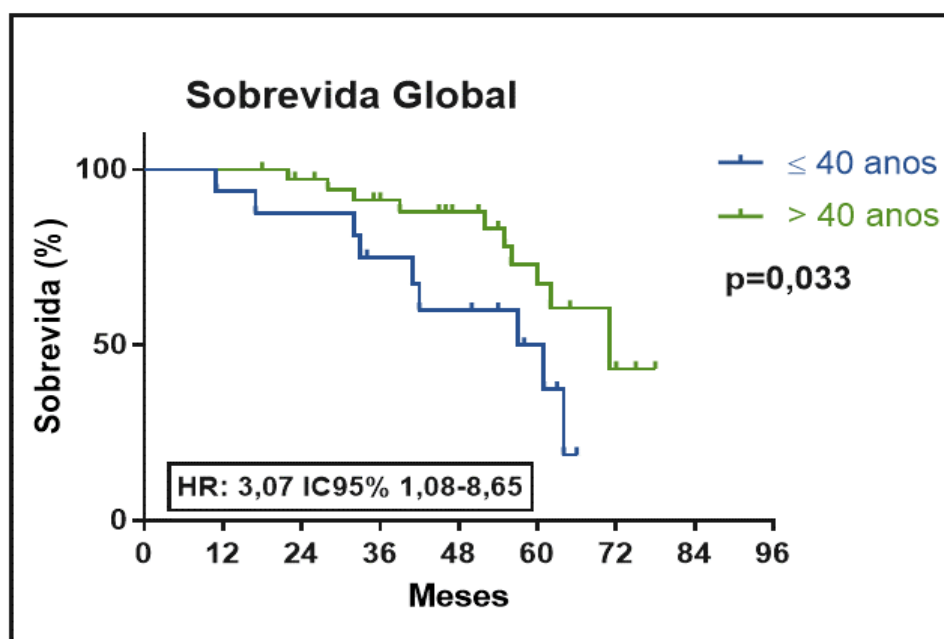


Figura 7 - Curva de sobrevida global (SG; meses) entre os grupos com câncer de mama triplo negativos e idade ≤ 40 e > 40 anos (Teste de *log-rank*. $p=0,033$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014

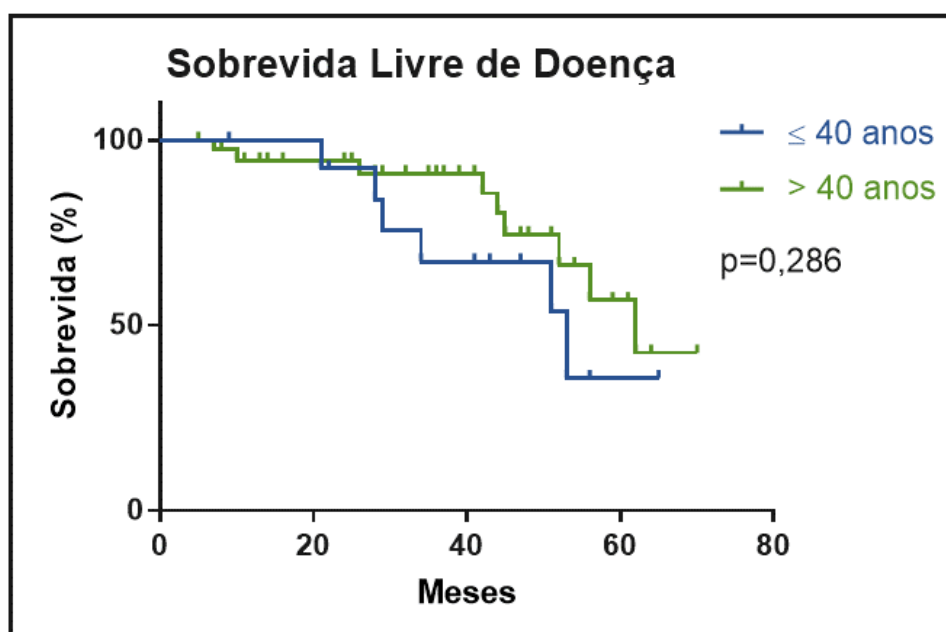


Figura 8 - Curva de sobrevida livre de doença (SLD; meses) entre os grupos com câncer de mama triplo negativos e idade ≤ 40 e > 40 anos (Teste de *log-rank*. $p=0,286$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014

4.5.3 Análise de sobrevida global (SG) entre os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos com expressão positiva de BRCA1 no núcleo e citoplasma.

Na análise da sobrevida global das mulheres com idade ≤ 40 e > 40 anos que tinham expressão de BRCA1 **no núcleo**, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Não foi possível calcular a mediana (em meses) de SG de ambos os grupos (Figura 9).

A mediana de SG das mulheres com expressão de BRCA1 **no citoplasma** do grupo de idade ≤ 40 foi de 61 meses e de 71 meses no grupo com idade > 40 anos ($p=0,014$). Em 60 meses (5 anos), a SG foi 42,1% no grupo de mulheres ≤ 40 anos e 72,3% com idade > 40 anos (HR: 2,99, IC95% 0,966-9,29; Figura 10).

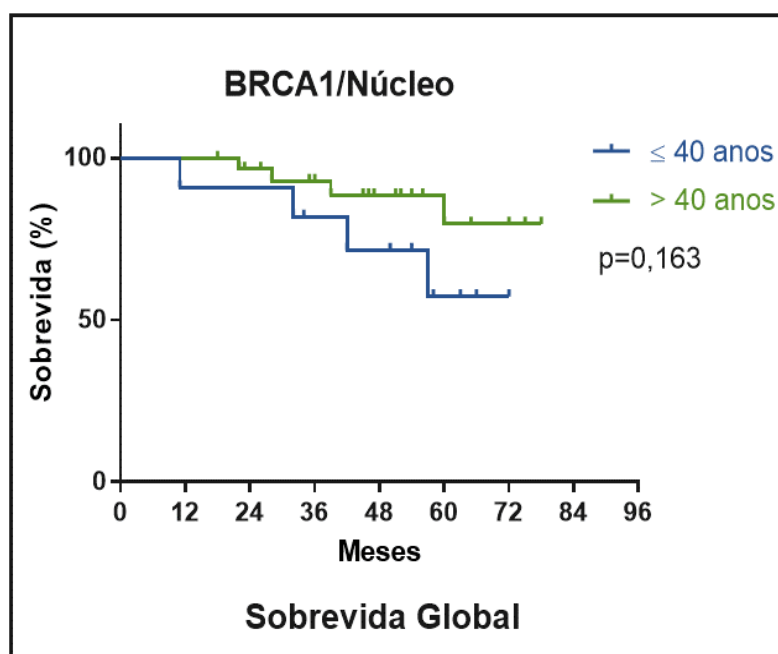


Figura 9 - Curva de sobrevida global (SG; meses) das mulheres com câncer de mama triplo negativo com expressão de BRCA1 no núcleo, comparando os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos (Teste de log-rank. $p=0,163$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014.

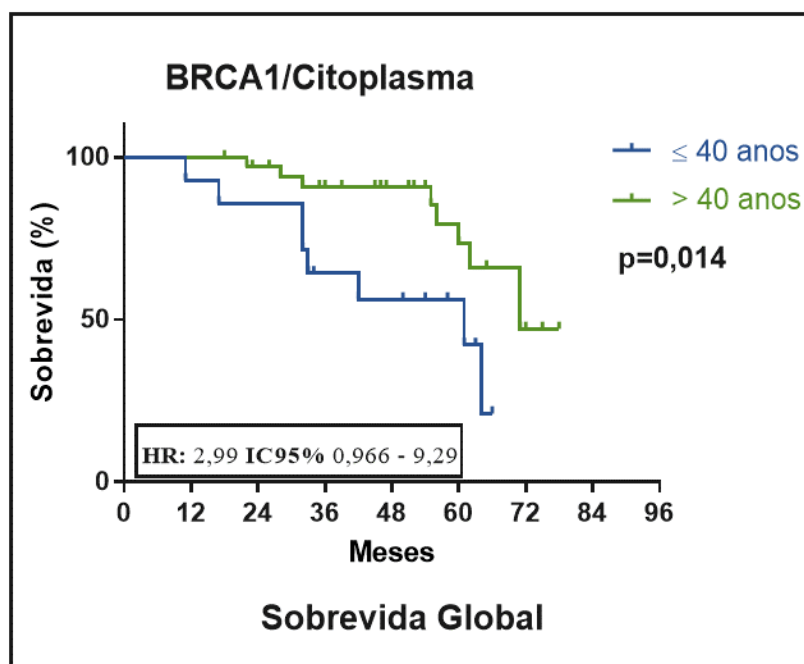


Figura 10 - Curva de sobrevida global (SG; meses) nas mulheres das mulheres com câncer de mama triplo negativo com expressão de BRCA1 no citoplasma, comparando os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos (Teste de *log-rank*. $p=0,014$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014

4.5.4 Análise de sobrevida livre de doença (SLD) entre os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos com expressão positiva de BRCA1 no núcleo e citoplasma

Na análise de SLD das mulheres com expressão de BRCA1 **no núcleo e citoplasma**, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos (Figuras 11 e 12).

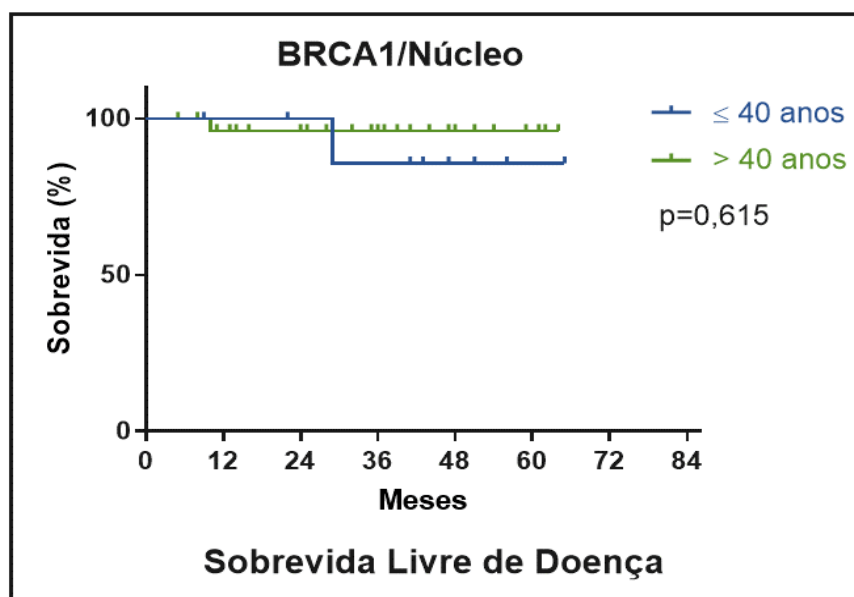


Figura 11 - Curva de sobrevida livre de doença (SLD; meses) nas mulheres com câncer de mama triplo negativos com expressão de BRCA1 no núcleo, comparando os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos (Teste de *log-rank*. $p=0,615$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014

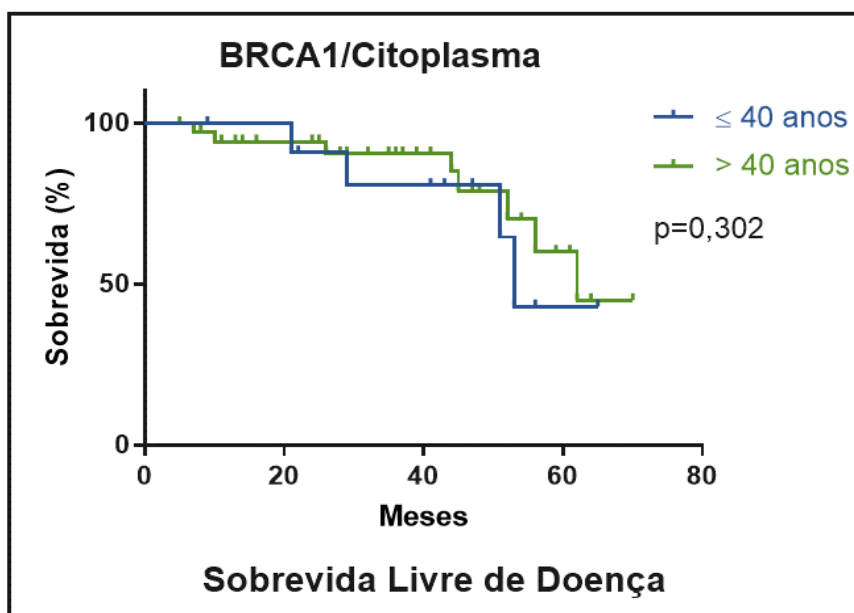


Figura 12 - Curva de sobrevida livre de doença (SLD; meses) nas mulheres com câncer de mama triplo negativos e expressão positiva de BRCA1 no citoplasma, comparando os grupos com idade ≤ 40 e > 40 anos (Teste de *log-rank*. $p=0,302$). Hospital de Câncer de Pernambuco (HCP), 2011-2014

5 DISCUSSÃO

Os tumores de mama TN constituem um subtipo molecular que apresenta negatividade para os receptores de estrógeno (ER), receptores de progesterona (PR) e HER2, acomete aproximadamente 15 a 20% de todos os cânceres de mama (KREIKE et al. 2007; FOULKES et al. 2010). Apresentam uma heterogeneidade molecular, acometem frequentemente mulheres mais jovens, preferência étnica por descendentes afro-americanas e hispânicas, apresentam estadio avançado ao diagnóstico, preferência por metástase visceral principalmente cérebro e pulmão, além de apresentarem menor tempo de recorrência e sobrevida global (KREIKE et al. 2007; KENNECKE et al. 2010).

O presente estudo teve como objetivo avaliar as frequências das características clinicopatológicas e da expressão imuno-histoquímica de BRCA1 no câncer de mama triplo negativo em mulheres jovens com idade menor que 40 anos. Esse grupo de tumores é caracterizado pela falta de expressão de receptores de estrógeno, receptores de progesterona e receptores HER2, representam 10 a 20% dos tumores de mama e apresenta pior prognóstico pela ausência de terapia específica (PEROU et al. 2000). Os dados da nossa amostra corroboram com os dados mencionados na literatura com relação às características clinico-patológicas: os tumores TN são predominantemente do tipo não especial (93,4%), apresentam grau histológico III (83,6%), tamanho do tumor >2 cm (68,85%) (RAKHA et al. 2008; KIM et al. 2016; BRIANESE et al. 2018). A média de idade ao diagnóstico da amostra foi de 46 anos (25 – 64 anos), semelhante

à média de idade entrada nos estudos de KIM et al. (2016), 47 anos em uma amostra com 465 casos.

A média de idade ao diagnóstico da nossa coorte de pacientes foi inferior a média de idade na coorte estudada por BRIANESE et al. (2018) sendo de 51 anos (18 – 87 anos) e na coorte estudada por YEH et al. (2017) que observou média de idade de 59 anos (22 – 95 anos). Esse dado provavelmente se deve ao ponto de corte adotado para esse estudo, de 65 anos de idade para definir “idoso” conforme delineado pela Sociedade Internacional de Oncologia Geriátrica 2012 (BIGANZOLI et al. 2012; YEH et al. 2017; BRIANESE et al. 2018; KOZAK et al. 2019).

Estudos tem mostrado uma forte relação entre câncer de mama triplo negativo em mulheres jovens com mutações de *BRCA1*. ROBERTSON et al. (2012) observaram em seus estudos que, 8 dos 103 casos de câncer de mama TN esporádicos apresentaram mutação para *BRCA1* e todas as mulheres tinham idade menor que 50 anos. Concluindo que a frequência de mutações do *BRCA1* aumenta de 10% para 19% nas mulheres com câncer de mama TN diagnosticadas antes dos 50 anos. BRIANESE et al. (2018) em seus estudos com 131 pacientes de câncer de mama triplo negativo verificaram que a alteração do *BRCA1* foi um evento recorrente nas mulheres jovens com câncer de mama TN esporádicos e hereditários em mulheres brasileiras. Em 2013, LIPS et al. também observou uma associação entre tumores de mama TN e mutações de *BRCA1*, encontrando em quase 20% da amostra (ROBERTSON et al. 2012; LIPS et al. 2013; BRIANESE et al. 2018).

MYLONA et al. (2014) observou da expressão da proteína *BRCA1* intensa e exclusiva apenas no núcleo do tecido mamário normal. Nas células tumorais, foi observada coloração de *BRCA1* no núcleo e citoplasma com intensidade heterogênea

e pouco intensa. RAKHA et al. em 2008 encontrou forte expressão nuclear de BRCA1 na mama normal e expressão alterada (ausência ou reduzida) no núcleo ou expressão positiva no citoplasma de BRCA1 nos tumores. RIBEIRO-SILVA et al. (2005), observaram marcação nuclear do BRCA1 no epitélio ductal e lobular normal, enquanto os carcinomas apresentaram tanto marcação nuclear quanto citoplasmática em seu estudo com cento e duas mulheres com câncer de mama esporádico (RIBEIRO-SILVA et al. 2005; RAKHA et al. 2008; MYLONA et al. 2014).

CHEN et al. (1995), encontraram a proteína BRCA1 nos núcleos de células epiteliais normais e citoplasma de células mamárias malignas. Nós também verificamos coloração da proteína BRCA1 no núcleo e no citoplasma corroborando com os resultados anteriores. Essa expressão alterada de BRCA1 no citoplasma foi associada a outros parâmetros de pior prognóstico como idade ao diagnóstico (≤ 40 anos), grau histológico 3 e sobrevida global. A proteína BRCA1 codificada é sintetizada no citoplasma da célula e transportada para o núcleo onde vai desempenhar seu papel no reparo do DNA. Falha neste transporte pode justificar a presença da proteína no citoplasma celular e ser considerado um marcador de mau prognóstico por conta de seu papel crucial no reparo ao dano do DNA (CHEN et al. 1995; LEE et al. 1999; RIBEIRO-SILVA et al. 2005; RAKHA et al. 2008; MYLOMA et al. 2014).

Analizamos as curvas de sobrevida (global e livre de doença) de toda amostra de pacientes com tumor de mama TN verificamos uma SG de 66,3% e uma SLD 50% em 60 meses, corroborando com os dados encontrados na literatura. Tumores de mama TN apresentam menor sobrevida global e aumento de recorrência de morte nos primeiros 2 anos após o diagnóstico (LIN et al. 2012). Ao estratificarmos nossa amostra de acordo com a idade, em mulheres com idade ≤ 40 e > 40 anos, as mulheres

jovens do nosso estudo têm uma pior sobrevida global. Apresentam ainda um risco relativo três vezes maior de morrerem quando comparadas com as mulheres com câncer de mama TN de maior idade no período de cinco anos. Nossos resultados de análise sobrevida em pacientes triplo negativo seguem os dados encontrados na literatura. As mulheres com mais de 40 anos ainda apresentam melhor SLD, porém sem valor estatístico (LIN et al. 2012)

Na análise de sobrevida global nas pacientes que expressaram a proteína BRCA1 no núcleo e citoplasma celular estratificado de acordo com a idade. Verificamos que as pacientes com câncer de mama TN e expressão positiva de BRCA1 no citoplasma da célula com idade até 40 anos tem uma pior sobrevida com uma mediana de SG de 61 meses quando comparadas as mulheres de maior idade que foi de 71 meses. Apresentando uma média de risco relativo 2,99 maior de não sobreviverem no período de cinco anos. Nossos resultados com as pacientes que expressão proteína BRCA1 no núcleo da célula estratificado pela idade, também mostra que as mulheres com mais idade têm uma maior SG no período de cinco anos porem não encontramos associação. KIM et al. (2016), num retrospectivo com 492 casos de câncer de mama verificou em seu estudo uma pior taxa de sobrevida global nos tumores com expressão reduzida de BRCA1 no núcleo quando comparado com os tumores de expressão elevada, também observou correlação com alto grau histológico. A proteína BRCA1 está envolvida em várias funções para manter a estabilidade do genoma, a perda de sua função pode acarretar na resistência das células tumorais ao mecanismo de apoptose induzida pela quimioterapia, o que em parte, pode explicar a causa da baixa ou ausência da expressão da proteína BRCA1 está associada ao pior prognóstico (YANG et al. 2001; KIM et al. 2016).

As análises de SLD nas mulheres com expressão de BRCA1 no núcleo de acordo com a faixa etária demonstram uma tendência a melhor sobrevida no grupo das mulheres com idade >40 anos quando comparadas as mais jovens, porém sem relevância estatística. Resultados semelhantes foram encontrados quando analisamos a expressão da proteína BRCA1 no citoplasma nos dois grupos de mulheres (>40 e ≤40 anos). As mulheres mais jovens também apresentaram pior taxa de sobrevida livre de recorrência (43,1%) com mediana de 53 meses quando comparadas com as mulheres com faixa etária maior que apresentou uma taxa de sobrevida livre de recorrência de 60% com mediana de 62 meses no período de 5 anos, também não encontramos significância estatística.

Nosso estudo teve algumas limitações, acreditamos que a casuística foi pequena, o que impossibilitou encontrar associação da idade de algumas características clinicopatológicas e de expressão da proteína BRCA1 nas mulheres mais jovens (≤40 anos). Isso se deve ao fato principalmente a falta do correto preenchimento dos prontuários e ausência do material biológico no laboratório de patologia do HCP. Porém nosso estudo foi realizado apenas com amostras oriundas da peça cirúrgica, minimizando vieses da representatividade do tumor, além das áreas de tumor ter sido selecionada por um patologista experiente.

6 CONCLUSÃO

Com o presente estudo, conclui-se:

- Existe associação positiva da característica patológica Grau histológico III nos tumores de mama triplo negativo nas mulheres com idade ≤ 40 .
- A maior frequência de baixos níveis de expressão de BRCA1 (BRCA1^{low}) está associada as mulheres CMTN com idade ≤ 40 anos.
- As mulheres com diagnóstico de câncer de mama TN com idade ≤ 40 anos, apresentaram nesse estudo, uma associação com uma menor sobrevida global em cinco anos e parecer estar associada a expressão de BRCA1.

Com os resultados deste estudo, foi possível mostrar que a idade ≤ 40 anos e a expressão de BRCA1 foram fatores de pior prognóstico no câncer triplo negativo.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[ACS] American Cancer Society. **Cancer facts and figures 2019**. Atlanta; 2019. Available from: <URL:<https://bit.ly/2ME68fv>> [2019 set 12]

Amin MB, Greene FL, Edge SB, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. **CA Cancer J Clin** 2017 Mar; 67:93-9.

Amirikia KC, Mills P, Bush J, Newman LA. Higher population-based incidence rates of triple-negative breast cancer among young African-American women: implications for breast cancer screening recommendations. **Cancer** 2011; 117:2747-53.

Antoniou A, Pharoah PD, Narod S, et al. Average risks of breast and ovarian cancer associated with BRCA1 or BRCA2 mutations detected in case Series unselected for family history: a combined analysis of 22 studies. **Am J Hum Genet** 2003; 72:1117-30.

Banin Hirata BK, Oda JM, Losi Guembarovski R, Ariza CB, de Oliveira CE, Watanabe MA. Molecular markers for breast cancer: prediction on tumor behavior. **Dis Markers** 2014; 2014:513158.

Berns EM, van Staveren IL, Verhoog L, et al. Molecular profiles of BRCA1-mutated and matched sporadic breast tumours: relation with clinico-pathological features. **Br J Cancer** 2001; 85:538-45.

Biganzoli L, Wildiers H, Oakman C, et al. Management of elderly patients with breast cancer: updated recommendations of the International Society of Geriatric Oncology (SIOG) and European Society of Breast Cancer Specialists (EUSOMA). **Lancet Oncol** 2012; 13:e148-60.

Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA Cancer J Clin** 2018; 68:394-424.

Brianese RC, Nakamura KDM, Almeida FGDSR, et al. BRCA1 deficiency is a recurrent event in early-onset triple-negative breast cancer: a comprehensive analysis of germline mutations and somatic promoter methylation. **Breast Cancer Res Treat** 2018; 167:803-14.

Burstein MD, Tsimelzon A, Poage GM, et al. Comprehensive genomic analysis identifies novel subtypes and targets of triple-negative breast cancer. **Clin Cancer Res** 2015; 21:1688-98.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA** 2006; 295:2492-502.

Carraro DM, Koike Folgueira MA, Garcia Lisboa BC, et al. Comprehensive analysis of BRCA1, BRCA2 and TP53 germline mutation and tumor characterization: a portrait of early-onset breast cancer in Brazil. **PLoS One** 2013; 8:e57581.

Chen Y, Chen CF, Riley DJ, et al. Aberrant subcellular localization of BRCA1 in breast cancer. **Science** 1995; 270:789-91.

Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, et al. Tailoring therapies--improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. **Ann Oncol** 2015; 6:1533-46.

Cotrim DP, Ribeiro ARG, Paixão D, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 pathogenic and likely pathogenic variants in non-selected ovarian carcinoma patients in Brazil. **BMC Cancer** 2019; 19:4.

Dai X, Cheng H, Bai Z, Li J. Breast cancer cell line classification and its relevance with breast tumor subtyping. **J Cancer** 2017; 8:3131-41.

Dent R, Hanna WM, Trudeau M, Rawlinson E, Sun P, Narod SA. Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2009; 115:423-8.

de Souza Timoteo AR, Gonçalves AÉMM, Sales LAP, et al. A portrait of germline mutation in Brazilian at-risk for hereditary breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2018; 172:637-46.

Dieli-Conwright CM, Mortimer JE, Schroeder ET, et al. Randomized controlled trial to evaluate the effects of combined progressive exercise on metabolic syndrome in breast cancer survivors: rationale, design, and methods. **BMC Cancer** 2014; 14:238.

Durocher F, Tonin P, Shattuck-Eidens D, Skolnick M, Narod SA, Simard J. Mutation analysis of the BRCA1 gene in 23 families with cases of cancer of the breast, ovary, and multiple other sites. **J Med Genet** 1996; 33:814-9.

Fabbro M, Schuechner S, Au WW, Henderson BR. BARD1 regulates BRCA1 apoptotic function by a mechanism involving nuclear retention. **Exp Cell Res** 2004; 298:661-73.

Fernandes GC, Michelli RA, Galvão HC, et al. Prevalence of BRCA1/BRCA2 mutations in a Brazilian population sample at-risk for hereditary breast cancer and characterization of its genetic ancestry. **Oncotarget** 2016; 7:80465-81.

Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2010; 363:1938-48.

Gaudet MM, Gierach GL, Carter BD, et al. Pooled analysis of nine cohorts reveals breast cancer risk factors by tumor molecular subtype. **Cancer Res** 2018; 78:6011-21.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol** 2011; 22:1736-47.

Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). **Arch Pathol Lab Med** 2010; 134:e48-72.

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.

Huen MS, Sy SM, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2010; 11:138-48.

Isakoff SJ, Mayer EL, He L, et al. TBCRC009: A Multicenter Phase II Clinical Trial of platinum monotherapy with biomarker assessment in metastatic triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2015; 33:1902-9.

Jhanwar-Uniyal M. BRCA1 in cancer, cell cycle and genomic stability. **Front Biosci** 2003; 8:s1107-17.

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J Clin Oncol** 2010; 28:3271-7.

Kim MC, Choi JE, Lee SJ, Bae YK. Coexistent Loss of the Expressions of BRCA1 and p53 predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2016; 23:3524-30.

Kozak MM, Xiang M, Pollom EL, Horst KC. Adjuvant treatment and survival in older women with triple negative breast cancer: a Surveillance, Epidemiology, and End Results analysis. **Breast J** 2019; 25:469-73.

Krag DN, Anderson SJ, Julian TB, et al. Sentinel-lymph-node resection compared with conventional axillary-lymph-node dissection in clinically node-negative patients with breast cancer: overall survival findings from the NSABP B-32 randomised phase 3 trial. **Lancet Oncol** 2010; 11:927-33.

Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. **Breast Cancer Res** 2007; 9:R65.

Kulie T, Slattengren A, Redmer J, Counts H, Eglash A, Schrager S. Obesity and women's health: an evidence-based review. **J Am Board Fam Med** 2011; 24:75-85.

Lakhani S, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan PH, van de Vijver MJ. **WHO Classification of tumours of the breast**. 4th ed. Lyon: IARC; 2012. (WHO Classification of Tumours, Volume 4, IARC WHO Classification of Tumours, n° 4).

Lee WY, Jin YT, Chang TW, Lin PW, Su IJ. Immunolocalization of BRCA1 protein in normal breast tissue and sporadic invasive ductal carcinomas: a correlation with other biological parameters. **Histopathology** 1999; 34:106-12.

Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. **J Clin Invest** 2011; 121:2750-67.

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.

Lin NU, Vanderplas A, Hughes ME, et al. Clinicopathologic features, patterns of recurrence, and survival among women with triple-negative breast cancer in the National Comprehensive Cancer Network. **Cancer** 2012; 118:5463-72.

Lips EH, Mulder L, Oonk A, et al. Triple-negative breast cancer: BRCAness and concordance of clinical features with BRCA1-mutation carriers. **Br J Cancer** 2013; 108:2172-7.

Maistro S, Teixeira N, Encinas G, et al. Germline mutations in BRCA1 and BRCA2 in epithelial ovarian cancer patients in Brazil. **BMC Cancer** 2016; 16:934.

Miki Y, Swensen J, Shattuck-Eidens D, et al. A strong candidate for the breast and ovarian cancer susceptibility gene BRCA1. **Science** 1994; 266:66-71.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA, 2018.

Morrison DH, Rahardja D, King E, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. **Br J Cancer** 2012; 107:382-7.

Mylona E, Melissaris S, Nomikos A, et al. Effect of BRCA1 immunohistochemical localizations on prognosis of patients with sporadic breast carcinomas. **Pathol Res Pract** 2014; 210:533-40.

O'Shaughnessy J, Osborne C, Pippen JE, et al. Iniparib plus chemotherapy in metastatic triple-negative breast cancer. **N Engl J Med** 2011; 364:205-14.

O'Shaughnessy J, Schwartzberg L, Danso MA, et al. Phase III study of iniparib plus gemcitabine and carboplatin versus gemcitabine and carboplatin in patients with metastatic triple-negative breast cancer. **J Clin Oncol** 2014; 32:3840-7.

Park JH, Ahn JH, Kim SB. How shall we treat early triple-negative breast cancer (TNBC): from the current standard to upcoming immuno-molecular strategies. **ESMO Open** 2018; 3(Suppl 1):e000357.

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

Petrucelli N, Daly MB, Pal T. BRCA1- and BRCA2-associated hereditary breast and ovarian cancer. 1998 Sep 4 [Updated 2016 Dec 15]. In: Adam MP, Ardinger HH, Pagon RA, et al. editors. **GeneReviews®** [Internet]. Seattle (WA): University of Washington; 1993-2019. Available form: URL:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/> [2019 12 out]

Plevritis SK, Kurian AW, Sigal BM, et al. Cost-effectiveness of screening BRCA1/2 mutation carriers with breast magnetic resonance imaging. **JAMA** 2006; 295:2374-84.

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

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol Oncol** 2011; 5:5-23.

Prat A, Karginova O, Parker JS, et al. Characterization of cell lines derived from breast cancers and normal mammary tissues for the study of the intrinsic molecular subtypes. **Breast Cancer Res Treat** 2013; 142:237-55.

Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, El-Sayed ME, Green AR, Ellis IO. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. **Hum Pathol** 2008; 39:857-65.

Rakha EA, Green AR. Molecular classification of breast cancer: what the pathologist needs to know. **Pathology** 2017; 49:111-9.

Rastelli F, Biancanelli S, Falzetta A, et al. Triple-negative breast cancer: current state of the art. **Tumori** 2010; 96:875-88.

Redig AJ, Munshi HG. Care of the cancer survivor: metabolic syndrome after hormone-modifying therapy. **Am J Med** 2010; 123:87.e1-6.

Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology** 2008; 52:108-18.

Ribeiro-Silva A, Garcia SB, Chahud F, Zucoloto S. Prognostic impact of BRCA1 immunohistochemistry expression in sporadic breast cancer. **J Bras Patol Med Lab** 2005; 41:197-203.

Robertson L, Hanson H, Seal S, et al. BRCA1 testing should be offered to individuals with triple-negative breast cancer diagnosed below 50 years. **Br J Cancer** 2012; 106:1234-8.

Robson M, Im SA, Senkus E, et al. Olaparib for metastatic breast cancer in patients with a germline BRCA mutation. **N Engl J Med** 2017; 377:523-33.

Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. **Clin Cancer Res** 2006; 12:1533-9.

Rouleau M, Patel A, Hendzel MJ, Kaufmann SH, Poirier GG. PARP inhibition: PARP1 and beyond. **Nat Rev Cancer** 2010; 10:293-301.

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

Scharl A, Salterberg A, Untch M, Liedtke C, Stickeler E, Papathemelis T. Treatment modification in young breast cancer patients. **Oncol Res Treat** 2016; 39:122-8.

Silva FC, Lisboa BC, Figueiredo MC, et al. Hereditary breast and ovarian cancer: assessment of point mutations and copy number variations in Brazilian patients. **BMC Med Genet** 2014; 15:55.

Sinn HP, Kreipe H. A brief overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th ed. Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Breast Care (Basel)** 2013; 8:149-54.

Steward L, Conant L, Gao F, Margenthaler JA. Predictive factors and patterns of recurrence in patients with triple negative breast cancer. **Ann Surg Oncol** 2014; 21:2165-71.

Tovey H, Bliss J, Tutt A, et al. Managing non-proportionality of hazards (PH) within TNT: a randomised phase II trial of carboplatin compared to docetaxel for patients with metastatic or recurrent locally advanced triple-negative (TN) or BRCA1/2 breast cancer (BC). **Trials** 2015; 16(Suppl 2): P150.

Turner NC, Tutt AN. Platinum chemotherapy for BRCA1-related breast cancer: do we need more evidence? **Breast Cancer Res** 2012; 14:115.

Tutt A, Robson M, Garber JE, et al. Oral poly(ADP-ribose) polymerase inhibitor olaparib in patients with BRCA1 or BRCA2 mutations and advanced breast cancer: a proof-of-concept trial. **Lancet** 2010; 376:235-44.

Wolff AC, Hammond MEH, Allison KH, et al. Human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update. **J Clin Oncol** 2018; 36:2105-22.

Yang Q, Sakurai T, Mori I, et al. Prognostic significance of BRCA1 expression in Japanese sporadic breast carcinomas. **Cancer** 2001; 92:54-60.

Yao H, He G, Yan S, Chen C, Song L, Rosol TJ, Deng X. Triple-negative breast cancer: is there a treatment on the horizon? **Oncotarget** 2017; 8:1913-24.

Yeh J, Chun J, Schwartz S, et al. Clinical characteristics in patients with triple negative breast cancer. **Int J Breast Cancer** 2017; 2017:1796145.

Zhang L, Fang C, Xu X, Li A, Cai Q, Long X. Androgen receptor, EGFR, and BRCA1 as biomarkers in triple-negative breast cancer: a meta-analysis. **Biomed Res Int** 2015; 2015:357485.

Apêndice 1 - Dispensa do Termo de consentimento livre e esclarecido

DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

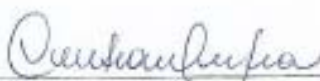
HOSPITAL DE CÂNCER DE PERNAMBUCO



DISPENSA DO TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Venho por meio desta informar ao Comitê de Ética em Pesquisa que o projeto de pesquisa intitulado: **EXPRESSÃO DO BRCA1 EM CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO E ASSOCIAÇÕES COM CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS**, não utilizará o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido por que a pesquisa será realizada em prontuário de pacientes. A autora da pesquisa resguarda os dados pessoais dos pacientes e informar que estes serão utilizados apenas para alcançar os objetivos do trabalho exposto acima, incluídos sua aplicação na literatura científica especializada e apresentação em eventos científicos.

Recife, 05 de Maio de 2016.


Pesquisador Responsável

↑ Cintia Dutra
Fisioterapeuta
CREFITO: 19358-F

Apêndice 2 - Formulário Clínico

1. Identificação:

Nº do registro: _____ Nº

prontuário: _____

Idade ao diagnóstico: _____ Data de nascimento: ____/____/____

Cirurgia: _____

2.Tratamentos:(☐) Quimioterapia _____

(☐) Radioterapia _____

3.Tempo de sobrevida:

Sobrevida livre de doença (dias): (☐) Sim – tempo: _____

(☐) Não–tempo: _____

Recidiva local (ipsilateral): (☐) Sim

(☐)Não Data: _____

Metástase a distância: (☐) Sim Data: _____

(☐) Não Órgão: _____

Recidiva de câncer de mama contra-lateral: (☐) Sim Data: _____

Sobrevida Global (dias): _____ Óbito: _____

4.Aspectos do exame anatomopatológico - características clincopatológicas.

Tipo histológico:

Grau histológico

Staus linfonodal:

número de linfonodos dissecados

número de linfonodos com metastáse

tamanho do linfonodo

Tamanho do tumor

Invasão angiolinfática sim (☐) não (☐)

Invasão perineural sim (☐) não (☐)

5. Dados Imuno-histoquímico - expressão dos biomarcadores

Receptor de estrógeno	Negativo ()	Positivo () Intensidade (%)
Receptor de progesterona	Negativo ()	Positivo () Intensidade (%)
HER2	Negativo ()	Positivo () escore ()FISH:
Ki67	Intensidade	(%)

Pesquisadora:_____

Recife, _____ **de** _____ **de 2017**

Anexo 1 – Parecer consubstanciado do CEP/HCP

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão Imuno-histoquímica do BRCA1 em câncer de mama triplo negativo e associações com características clinicopatológicas.

Pesquisador: CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 66221717.1.0000.5205

Instituição Proponente: SOCIEDADE PERNAMBUCANA DE COMBATE AO CÂNCER -SPCC

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.066.717

Apresentação do Projeto:

câncer de mama e a neoplasia de maior ocorrência entre as mulheres em países desenvolvidos ou em desenvolvimento e pode levar a altas taxas de morbimortalidade. A classificação molecular do carcinoma de mama segundo o perfil imuno-histoquímico é baseada na avaliação dos seguintes biomarcadores: receptores de estrogênio (RE); receptores de progesterona (RP); superexpressão ou amplificação do fator de crescimento humano epidérmico receptor-2 (HER2) e índice de proliferação celular Ki-67. Mulheres diagnosticadas com câncer de mama triplo negativo com idade até 40 anos apresentam uma maior probabilidade de mutação germinativa do BRCA1 além de outros eventos somáticos que podem levar disfunção do gene BRCA1, como o silenciamento gênico devido a hipermetilação do promotor deste gene comparando com mulheres acima de 40 anos. O presente trabalho tem como objetivo: avaliar a associação da expressão por Imuno-histoquímica da proteína BRCA1 e as características clinicopatológicas em mulheres com carcinoma de mama do subtipo molecular triplo negativo. O estudo será composto por mulheres com câncer de mama triplo negativo. Será realizada análise de prontuários para coleta dos dados clinicopatológicos e exame Imuno-histoquímico. Em seguida, serão selecionados os blocos de parafina no laboratório de patologia do Hospital de câncer de Pernambuco e

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597

Bairro: Santo Amaro

CEP: 50.040-000

UF: PE Município: RECIFE

Telefone: (81)3217-8005

Fax: (81)3217-8005

E-mail: cep@hcp.org.br

encaminhados ao laboratório de Anatomia Patológica do AC Camargo Cancer Center para revisão dos casos. Nas amostras confirmadas como triplo negativo serão realizadas as marcações por imuno-histoquímica para BRCA1. Dos aspectos morfológicos analisados foram o grau histológico, o status da cadeia linfonodal, invasão linfovascular e invasão perineural e tamanho do tumor.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a associação da expressão por imuno-histoquímica da proteína BRCA1 e as características clinicopatológicas em mulheres com carcinoma de mama do subtipo molecular triplo negativo.

Objetivo Secundário:

*Avaliar a associação da expressão da proteína BRCA1 em mulheres com carcinomas de mama triplo negativo até 40 anos e acima de 40 anos; * Associar a expressão por imuno-histoquímica da proteína BRCA1 com indicadores clinicopatológicos, tais como: tipo histológico, grau histológico, invasão angiolinfática, tamanho do tumor e status do ganglio linfático em mulheres com carcinomas de mama triplo negativo até 40 anos e acima de 40 anos; * Analisar a associação do tempo de sobrevida livre de doença em mulheres com câncer de mama triplo negativo com a expressão da proteína BRCA1 em mulheres até 40 anos e maiores de 40 anos; * Analisar a associação do tempo de sobrevida global em mulheres com câncer de mama triplo negativo com a expressão da proteína BRCA1 em mulheres até 40 anos e maiores de 40 anos.

*Avaliar a associação da expressão da proteína BRCA1 em mulheres com carcinomas de mama triplo negativo até 40 anos e acima de 40 anos; * Associar a expressão por imuno-histoquímica da proteína BRCA1 com indicadores clinicopatológicos, tais como: tipo histológico, grau histológico, invasão angiolinfática, tamanho do tumor e status do ganglio linfático em mulheres com carcinomas de mama triplo negativo até 40 anos e acima de 40 anos; * Analisar a associação do tempo de sobrevida livre de doença em mulheres com câncer de mama triplo negativo com a expressão da proteína BRCA1 em mulheres até 40 anos e maiores de 40 anos; * Analisar a associação do tempo de sobrevida global em mulheres com câncer de mama triplo negativo com a expressão da proteína BRCA1 em mulheres até 40 anos e maiores de 40 anos.

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.045-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8005 Fax: (81)3217-8005 E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 2.096.717

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

O presente estudo irá analisar os resultados dos exames de imuno-histoquímica e histopatológicos das amostras dos tumores do tipo de câncer de mama Triplo Negativo. Portanto, os riscos serão mínimos para as pacientes, que será o constrangimento quanto a leitura dos dados citados e eventual perda ou extravio de lâminas e blocos de parafina em seu deslocamento do laboratório de patologia do Hospital de câncer de Pernambuco para o laboratório de Anatomia Patológica do AC Cancer Center. Para minimizar tais riscos o material será enviado pelo pesquisador responsável. Respeitando os preceitos éticos, sendo estes utilizados para fim de pesquisa, não havendo publicação do nome do paciente, ou quaisquer outras formas de identificação. Ficando estabelecido com os pesquisadores a assinatura do Termo de Confidencialidade dos Pesquisadores, existindo ainda o risco de quebra deste por parte de alguns pesquisadores envolvidos.

Benefícios:

A presente pesquisa tem como benefício, detectar a expressão do BRCA1 e correlacionar com as características clinicopatológicas em mulheres que apresentam carcinoma de mama do tipo triplo negativo com idade até 40 anos e acima de 40 anos usando a técnica de imuno-histoquímica, a fim do mesmo ser utilizado como rotina em instituições que atuam na área de oncologia. Compreendendo com isso, o comportamento biológico do tumor na detecção do grau de agressividade e prognóstico de metástase agregando conhecimento científico servindo como referência para estudos posteriores. E, através de estudos futuros analisar a sobrevida livre de doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

-A pesquisa aborda um tema atual sobre o subtipo triplo negativo do câncer de mama e a possibilidade da mutação do BRCA1, abrindo futura possibilidade de tratamento

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram fornecidos a contento:

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597	CEP: 50.040-000
Bairro: Santo Amaro	
UF: PE	Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8005	Fax: (81)3217-8005 E-mail: cep@hcp.org.br

SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC



Continuação do Parecer: 2.006.717

- Termo de autorização do uso de dados do HCP,
- Termo de autorização do laboratório HCP e Hospital AC Camargo,
- Termo de confiabilidade dos pesquisadores,
- Carta de anuência HCP e AC Camargo, dispensa do TCLE, Ficha de triagem,
- Cronograma,
- Orçamento.

Recomendações:

as recomendações foram atendidas, conforme solicitação do relator.

CRONOGRAMA FOI ALTERADO

TERMO DA PATOLOGIA APRESENTADO

NA METODOLOGIA, FOI ESCLARECIDA O ENVIO DAS AMOSTRAS

RISCOS TAMBÉM ESCLARECIDO

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

SEM PENDENCIAS

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos também que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio da Notificação com o Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil.

Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delimitada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (Item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1507
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.040-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8005 Fax: (81)3217-8005 E-mail: cep@hcp.org.br

**SOCIEDADE PERNAMBUCANA
DE COMBATE AO CÂNCER-
SPCC**



Continuação do Parecer: 2.066.717

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PS_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_855304.pdf	02/05/2017 19:57:15		Aceito
Outros	RESPOSTACEP.pdf	02/05/2017 19:56:12	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Outros	TERMOPATOLOGIAHCP.jpg	02/05/2017 19:55:20	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMADAPESQUISA.pdf	02/05/2017 19:54:14	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMOCONFIDENCIALIDADE.pdf	26/03/2017 18:45:51	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Outros	CARTAANUENCIAACCAMARGO.pdf	26/03/2017 18:45:22	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Outros	TERMO LABHCP.pdf	03/03/2017 18:11:45	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Outros	TERMO LABACCAMARGO.pdf	03/03/2017 18:10:28	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	03/03/2017 17:39:04	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Outros	FICHATRIAGEM.pdf	03/03/2017 11:28:15	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	02/03/2017 20:29:39	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODETALHADO.docx	02/03/2017 20:28:49	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSATCLE.pdf	02/03/2017 20:25:23	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Outros	CARTAANUENCIAHCP.pdf	19/01/2017 00:28:14	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito
Outros	TERMOAUTUSODADOS.jpg	18/01/2017 18:15:35	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Cruz Cabugá, 1597
Bairro: Santo Amaro CEP: 50.045-000
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)3217-8005 Fax: (81)3217-8005 E-mail: cep@hcp.org.br

Anexo 2 – Parecer Consubstanciado do CEP/AC Camargo

	A.C. Camargo Cancer Center	HOSPITAL A.C. CAMARGO CANCER CENTER	
PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP			
Elaborado pela Instituição Coparticipante			
DADOS DO PROJETO DE PESQUISA			
Título da Pesquisa: Expressão imuno-histoquímica do BRCA1 em câncer de mama triplo negativo e associações com características clinicopatológicas.			
Pesquisador: CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA			
Área Temática:			
Versão: 2			
CAAE: 66221717.1.3001.5432			
Instituição Proponente: FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE			
Patrocinador Principal: Financiamento Próprio			
DADOS DO PARECER			
Número do Parecer: 2.667.783			
Apresentação do Projeto:			
Ver Parecer anterior número 2.494.763 de 14 de fevereiro de 2018.			
Objetivo da Pesquisa:			
Ver Parecer anterior número 2.494.763 de 14 de fevereiro de 2018.			
Avaliação dos Riscos e Benefícios:			
Ver Parecer anterior número 2.494.763 de 14 de fevereiro de 2018.			
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:			
Os pesquisadores apresentaram as respostas das pendências observadas no parecer anterior:			
1- Foi informado que a fonte financiadora será a FAPESP			
2- Esclarecimento de que não serão utilizadas amostras do banco de tumores.			
3- Data prevista para início foi alterada para abril de 2018.			
4 - Os itens resultados pretendidos e previsão de ressarcimento - encontrar alterações na expressão da proteína BRCA em mulheres com ca de mama triplo negativo e associa-lo com sobrevida. Sem previsão de ressarcimento para os participantes.			
5 - Correção do objeto de estudo - BRCA 1			
6 - Atualização do documento de ciência e comprometimento da Anatomia Patológica.			
7 - Apresentação do documento de aprovação pelo CEP de Pernambuco.			
8- Apresentado orçamento financeiro estimando o custo total em R\$ 2992,00.			
Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211			
Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900			
UF: SP Município: SAO PAULO			
Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br			

Continuação do Parecer: 2.867.763

9- Explicação de que esta pesquisa se constitui no projeto de mestrado da aluna, e que o mesmo esta em andamento

10- Todos os termos obrigatórios foram revisados e reapresentados.

11- Os scores de HER 2 foram corrigidos conforme observado no parecer anterior

12- O cronograma foi ajustado e reapresentado - a patologista responsável em nossa instituição será a Dra Mariana De Brot Andrade.

13- Esclarecimento de que as revisões das lâminas já foram realizadas pelo HCP e pelo laboratório Diagnostik em São Paulo.

14 - os critérios para classificação dos tumores laminais B foram atualizados conforme a recomendação do parecer anterior.

15- a palavra "gânglio" foi substituída por linfonodo.

16- Esclarecimento de que os blocos utilizados serão da biópsia ou da peça cirúrgica, conforme a realização de quimioterapia né-adjuvante.

17 - Os tempos verbais foram padronizados.

18- Atualizada a referência contemplando a oitava edição da AJCC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Ver Parecer anterior número 2.494.763 de 14 de fevereiro de 2018.

Recomendações:

Não há recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Os pesquisadores responderam de forma satisfatória todas as observações apontadas no parecer anterior.

Considerações Finais e critério do CEP:

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PS_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_922759.pdf	19/04/2018 12:36:49		Aceito
Outros	Alteracao_pesquisador_responsavel.	19/04/2018	Dírcia Maria Carraro	Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900
UF: SP Município: SÃO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Continuação do Parecer: 2.067.703

Outros	pdf	12:34:03	Dirce Maria Carraro	Acelto
Outros	Carta_anuencia.pdf	18/04/2018 10:06:34	Dirce Maria Carraro	Acelto
Outros	Termo_de_Confidencialidade.pdf	18/04/2018 10:05:33	Dirce Maria Carraro	Acelto
Outros	Infraestrutura_Patologia.pdf	18/04/2018 10:02:34	Dirce Maria Carraro	Acelto
Outros	Formulario_de_submissao.pdf	18/04/2018 09:59:52	Dirce Maria Carraro	Acelto
Outros	PROJETO_DETALHADO_versaoII.docx	18/04/2018 09:24:09	Dirce Maria Carraro	Acelto
Outros	Resposta_16_04_2018.pdf	16/04/2018 12:51:54	Dirce Maria Carraro	Acelto
Orçamento	Orçamento_detalhado.pdf	16/04/2018 10:19:38	Dirce Maria Carraro	Acelto
Outros	orcamentoajustado.docx	28/11/2017 13:26:32	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Outros	RESPOSTACEP.pdf	02/05/2017 19:56:12	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Outros	TERMOPATOLOGIAHCP.jpg	02/05/2017 19:55:20	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMADAPESQUISA.pdf	02/05/2017 19:54:14	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Declaração de Pesquisadores	TERMOCONFIDENCIALIDADE.pdf	26/03/2017 18:45:51	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Outros	CARTAANUENCIAACCAMARGO.pdf	26/03/2017 18:45:22	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Outros	TERMO LABHCP.pdf	03/03/2017 18:11:45	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Outros	TERMO LABACCAMARGO.pdf	03/03/2017 18:10:28	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Orçamento	ORCAMENTO.pdf	03/03/2017 17:39:04	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Cronograma	CRONOGRAMA.pdf	03/03/2017 17:35:46	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Outros	FICHATRIAGEM.pdf	03/03/2017 11:28:15	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Folha de Rosto	FOLHAROSTO.pdf	02/03/2017 20:29:39	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETODETALHADO.docx	02/03/2017 20:28:49	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
TGLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	DISPENSATGLE.pdf	02/03/2017 20:25:23	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Acelto
Outros	CARTAANUENCIAHCP.pdf	19/01/2017	CINTIA MARIA DA	Acelto

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
 Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900
 UF: SP Município: SÃO PAULO
 Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo
Cancer Center

HOSPITAL A.C. CAMARGO
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 2.867.783

Outros	CARTAANUENCIAHCP.pdf	00:28:14	SILVA DUTRA	Aceito
Outros	TERMOAUTUSODADOS.jpg	18/01/2017 18:15:35	CINTIA MARIA DA SILVA DUTRA	Aceito

Situação do Parecer:
Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:
Não

SAO PAULO, 22 de Maio de 2018

Assinado por:
Jefferson Luiz Gross
(Coordenador)

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211
Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep_hcancer@accamargo.org.br

Anexo 2 – Classificação TNM 8ª edição/AJCC

4.2.2 Pathological N (pN)

✓	N Category	N Criteria
	pNX	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., not removed for pathological study or previously removed)
	pN0	No regional lymph node metastasis identified or ITCs only
	pN0(i+)	ITCs only (malignant cell clusters no larger than 0.2 mm) in regional lymph node(s)
	pN0(mol+)	Positive molecular findings by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR); no ITCs detected
	pN1	Micrometastases; or metastases in 1–3 axillary lymph nodes; and/or clinically negative internal mammary nodes with micrometastases or macrometastases by sentinel lymph node biopsy
	pN1mi	Micrometastases (approximately 200 cells, larger than 0.2 mm, but none larger than 2.0 mm)
	pN1a	Metastases in 1–3 axillary lymph nodes, at least one metastasis larger than 2.0 mm
	pN1b	Metastases in ipsilateral internal mammary sentinel nodes, excluding ITCs
	pN1c	pN1a and pN1b combined
	pN2	Metastases in 4–9 axillary lymph nodes; or positive ipsilateral internal mammary lymph nodes by imaging in the absence of axillary lymph node metastases
	pN2a	Metastases in 4–9 axillary lymph nodes (at least one tumor deposit larger than 2.0 mm)
	pN2b	Metastases in clinically detected internal mammary lymph nodes with or without microscopic confirmation; with pathologically negative axillary nodes
	pN3	Metastases in 10 or more axillary lymph nodes; or in infraclavicular (Level III axillary) lymph nodes; or positive ipsilateral internal mammary lymph nodes by imaging in the presence of one or more positive Level I, II axillary lymph nodes; or in more than three axillary lymph nodes and micrometastases or macrometastases by sentinel lymph node biopsy in clinically negative ipsilateral internal mammary lymph nodes; or in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
	pN3a	Metastases in 10 or more axillary lymph nodes (at least one tumor deposit larger than 2.0 mm); or metastases to the infraclavicular (Level III axillary lymph) nodes
	pN3b	pN1a or pN2a in the presence of cN2b (positive internal mammary nodes by imaging); or pN2a in the presence of pN1b
	pN3c	Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
Note: (sn) and (f) suffixes should be added to the N category to denote confirmation of metastasis by sentinel node biopsy or FNA/core needle biopsy respectively, with NO further resection of nodes.		

4.2.2 Pathological N (pN)

✓	N Category	N Criteria
	pNX	Regional lymph nodes cannot be assessed (e.g., not removed for pathological study or previously removed)
	pN0	No regional lymph node metastasis identified or ITCs only
	pN0(i+)	ITCs only (malignant cell clusters no larger than 0.2 mm) in regional lymph node(s)
	pN0(mol+)	Positive molecular findings by reverse transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR); no ITCs detected
	pN1	Micrometastases; or metastases in 1–3 axillary lymph nodes; and/or clinically negative internal mammary nodes with micrometastases or macrometastases by sentinel lymph node biopsy
	pN1mi	Micrometastases (approximately 200 cells, larger than 0.2 mm, but none larger than 2.0 mm)
	pN1a	Metastases in 1–3 axillary lymph nodes, at least one metastasis larger than 2.0 mm
	pN1b	Metastases in ipsilateral internal mammary sentinel nodes, excluding ITCs
	pN1c	pN1a and pN1b combined
	pN2	Metastases in 4–9 axillary lymph nodes; or positive ipsilateral internal mammary lymph nodes by imaging in the absence of axillary lymph node metastases
	pN2a	Metastases in 4–9 axillary lymph nodes (at least one tumor deposit larger than 2.0 mm)
	pN2b	Metastases in clinically detected internal mammary lymph nodes with or without microscopic confirmation; with pathologically negative axillary nodes
	pN3	Metastases in 10 or more axillary lymph nodes; or in infraclavicular (Level III axillary) lymph nodes; or positive ipsilateral internal mammary lymph nodes by imaging in the presence of one or more positive Level I, II axillary lymph nodes; or in more than three axillary lymph nodes and micrometastases or macrometastases by sentinel lymph node biopsy in clinically negative ipsilateral internal mammary lymph nodes; or in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
	pN3a	Metastases in 10 or more axillary lymph nodes (at least one tumor deposit larger than 2.0 mm); or metastases to the infraclavicular (Level III axillary lymph) nodes
	pN3b	pN1a or pN2a in the presence of cN2b (positive internal mammary nodes by imaging); or pN2a in the presence of pN1b
	pN3c	Metastases in ipsilateral supraclavicular lymph nodes
Note: (sn) and (f) suffixes should be added to the N category to denote confirmation of metastasis by sentinel node biopsy or FNA/core needle biopsy respectively, with NO further resection of nodes.		

4.3 Definition of Distant Metastasis (M)

The terms pM0 and MX are NOT valid categories in the TNM system.

Assignment of the M category for clinical classification may be cM0, cM1, or pM1. Any of the M categories (cM0, cM1, or pM1) may be used with pathological stage grouping.

✓	M Category	M Criteria
	cM0	No clinical or radiographic evidence of distant metastases*
	cM0(i+)	No clinical or radiographic evidence of distant metastases in the presence of tumor cells or deposits no larger than 0.2 mm detected microscopically or by molecular techniques in circulating blood, bone marrow, or other nonregional nodal tissue in a patient without symptoms or signs of metastases
	cM1	Distant metastases detected by clinical and radiographic means
	pM1	Any histologically proven metastases in distant organs; or if in non-regional nodes, metastases greater than 0.2 mm
* Note that imaging studies are not required to assign the cM0 category		

This form continues on the next page.

When TNM is...	And Grade is...	And HER2 Status is...	And ER Status is...	And PR Status is...	Then the Pathological Prognostic Stage Group is...	✓
Tis N0 M0	Any	Any	Any	Any	0	
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA	
				Negative	IA	
			Negative	Positive	IA	
				Negative	IA	
		Negative	Positive	Positive	IA	
				Negative	IA	
			Negative	Positive	IA	
				Negative	IA	
	G2	Positive	Positive	Positive	IA	
				Negative	IA	
			Negative	Positive	IA	
				Negative	IA	
		Negative	Positive	Positive	IA	
				Negative	IA	
			Negative	Positive	IA	
				Negative	IB	
	G3	Positive	Positive	Positive	IA	
				Negative	IA	
			Negative	Positive	IA	
				Negative	IA	
		Negative	Positive	Positive	IA	
				Negative	IA	
			Negative	Positive	IA	
				Negative	IB	

When TNM is...	And Grade is...	And HER2 Status is...	And ER Status is...	And PR Status is...	Then the Pathological Prognostic Stage Group is...	✓
T0 N1** M0 T1* N1** M0 T2 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA	
				Negative	IB	
			Negative	Positive	IB	
				Negative	IIA	
		Negative	Positive	Positive	IA	
				Negative	IB	
			Negative	Positive	IB	
				Negative	IIA	
	G2	Positive	Positive	Positive	IA	
				Negative	IB	
			Negative	Positive	IB	
				Negative	IIA	
		Negative	Positive	Positive	IA	
				Negative	IIA	
			Negative	Positive	IIA	
				Negative	IIA	
	G3	Positive	Positive	Positive	IA	
				Negative	IIA	
			Negative	Positive	IIA	
				Negative	IIA	
		Negative	Positive	Positive	IB	
				Negative	IIA	
			Negative	Positive	IIA	
				Negative	IIA	

When TNM is...	And Grade is...	And HER2 Status is...	And ER Status is...	And PR Status is...	Then the Pathological Prognostic Stage Group is...	✓
T2 N1*** M0 T3 N0 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IA	
				Negative	IIB	
			Negative	Positive	IIB	
				Negative	IIB	
		Negative	Positive	Positive	IA	
				Negative	IIB	
			Negative	Positive	IIB	
				Negative	IIB	
	G2	Positive	Positive	Positive	IB	
				Negative	IIB	
			Negative	Positive	IIB	
				Negative	IIB	
		Negative	Positive	Positive	IB	
				Negative	IIB	
			Negative	Positive	IIB	
				Negative	IIB	
	G3	Positive	Positive	Positive	IB	
				Negative	IIB	
			Negative	Positive	IIB	
				Negative	IIB	
		Negative	Positive	Positive	IIA	
				Negative	IIB	
			Negative	Positive	IIB	
				Negative	IIIA	

When TNM is...	And Grade is...	And HER2 Status is...	And ER Status is...	And PR Status is...	Then the Pathological Prognostic Stage Group is...	✓
T0 N2 M0 T1* N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1*** M0 T3 N2 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IB	
				Negative	IIIA	
		Negative	Negative	Positive	IIIA	
				Negative	IIIA	
			Positive	Positive	IB	
				Negative	IIIA	
	G2	Positive	Positive	Positive	IIIA	
				Negative	IIIA	
			Negative	Positive	IIIA	
				Negative	IIIA	
		Negative	Positive	Positive	IB	
				Negative	IIIA	
			Negative	Positive	IIIA	
				Negative	IIIB	
	G3	Positive	Positive	Positive	IIA	
				Negative	IIIA	
			Negative	Positive	IIIA	
				Negative	IIIA	
		Negative	Positive	Positive	IIIB	
				Negative	IIIA	
			Negative	Positive	IIIA	
				Negative	IIIC	

When TNM is...	And Grade is...	And HER2 Status is...	And ER Status is...	And PR Status is...	Then the Pathological Prognostic Stage Group is...	✓
T4 N0 M0 T4 N1*** M0 T4 N2 M0 Any T N3 M0	G1	Positive	Positive	Positive	IIIA	
				Negative	IIIB	
		Negative	Negative	Positive	IIIB	
				Negative	IIIB	
			Positive	Positive	IIIA	
				Negative	IIIB	
	G2	Positive	Positive	Positive	IIIA	
				Negative	IIIB	
			Negative	Positive	IIIB	
				Negative	IIIB	
		Negative	Positive	Positive	IIIA	
				Negative	IIIB	
			Negative	Positive	IIIB	
				Negative	IIIC	
	G3	Positive	Positive	Positive	IIIB	
				Negative	IIIB	
			Negative	Positive	IIIB	
				Negative	IIIB	
		Negative	Positive	Positive	IIIB	
				Negative	IIIC	
			Negative	Positive	IIIC	
				Negative	IIIC	
Any T Any N M1	Any	Any	Any	Any	IV	

*T1 includes T1mi.

** N1 does not include N1mi. T1 N1mi M0 and T0 N1mi M0 cancers are included for prognostic staging with T1 N0 M0 cancers of the same prognostic factor status.

*** N1 includes N1mi. T2, T3, and T4 cancers and N1mi are included for prognostic staging with T2 N1, T3 N1 and T4 N1, respectively.

Notes:

- For cases where HER2 is determined to be "equivocal" by ISH (FISH or CISH) testing under the 2013 ASCO/CAP HER2 testing guidelines, HER2 "negative" category should be used for staging in the Pathological Prognostic Stage Group Table.^{4,5}
- The prognostic value of these Prognostic Stage Groups is based on populations of persons with breast cancer that have been offered and mostly treated with appropriate endocrine and/or systemic chemotherapy (including anti-HER2 therapy).