

02294
US=192
Tese / FAP

**PERFIL DE CITOCERATINAS E SUA RELAÇÃO COM
DIFERENCIAÇÃO E FATORES CLÍNICO-
MORFOLÓGICOS EM CARCINOMAS DUCTAIS SOE
DE MAMA ESTUDADOS EM “ARRAY DE TECIDO”
(TISSUE MICROARRAY – TMA)**

MÔNICA MARIA ÁGATA STIEPCICH

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

**São Paulo
2007**

Fundação Antônio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
Coordenadora Pós-Graduação

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca do Centro de Tratamento e Pesquisa

Stiepcich, Mônica Maria Ágata

Perfil de citoceratinas e sua relação com diferenciação e fatores clínico-morfológicos em carcinomas ductais SOE de mama estudados em "array de tecido" (tissue microarray – TMA) / por Mônica Maria Ágata Stiepcich – São Paulo, 2007.

165p.

Tese (doutorado)-Fundação Antônio Prudente.

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

Oncologia

Orientador: Fernando Augusto Soares

Descritores: 1. CARCINOMA DUCTAL DA MAMA. 2. CITOCERATINAS.
3. ANÁLISE MICROARRAY. 4. MARCADORES DE DIFERENCIAÇÃO.

DEDICATÓRIA

À minha família, especialmente à minha Mãe,
pelo suporte, carinho e compreensão

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares,
meu orientador, por seu exemplo de transformação
e engrandecimento da Patologia brasileira

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, agradeço pela orientação, pelo auxílio com o trabalho, pela compreensão neste período especial de minha vida, onde não faltaram dúvidas, cansaço e conquistas, e por estimular minha iniciação e aprendizado em abraçar a Ciência como missão.

Ao Dr. José Humberto Tavares Guerreiro Fregnani pelo auxílio e paciência infinita com as análises estatísticas de intermináveis planilhas.

Aos membros da banca de qualificação, Profa. Dra. Helenice Gobbi, Dra. Maria do Socorro Maciel, Dra. Anamaria Camargo e Dr. Luís Henrique Gebrin pelas críticas e sugestões que muito contribuíram para o aprimoramento deste trabalho.

Aos técnicos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital A. C. Camargo: Carlos F. Nascimento, Severino da Silva Ferreira, Suely Nonogaki, José Ivanildo Neves, Ozires Pereira Santos, e a todos os demais que estiveram envolvidos no levantamento das lâminas e blocos, montagem dos *arrays*, colorações e imunoistoquímicas preparadas com esmero e competência, dignos dos melhores serviços de Patologia, por sua colaboração e atenção ao longo destes anos.

À bióloga e amiga Denise A. A. Mello Lula, pelo apoio e importante contribuição na inserção e conferência de dados nas planilhas de casos.

Às funcionárias da Biblioteca, em especial à Sra. Suely Francisco, pelo auxílio na revisão bibliográfica e formatação deste estudo.

À Sra. Ana Maria Alves Kuninari, coordenadora da Pós-Graduação da Fundação Antônio Prudente, e Srta. Luciana Pitombeira, funcionária da Pós-

Graduação da Fundação Antônio Prudente, pela atenção e eficiência com que sempre me atenderam.

À Sra. Alexandra Cardoso Longo por sua atenção, eficiência e competência, sempre.

À Sra. Hirde Contesini, responsável pelo Serviço de Arquivo Médico e Estatístico (SAME) do Hospital A. C. Camargo, e demais funcionários pelo auxílio na seleção dos prontuários.

À Andréa Oliveira Silva, minha companheira em inúmeros dias de trabalho lado a lado, por seu apoio, carinho e amizade.

RESUMO

Stiepcich MMA. **Perfil de citoceratinas e sua relação com diferenciação, e fatores clínico-morfológicos em carcinomas ductais SOE de mama estudados em “array de tecido” (*tissue microarray* – TMA).** São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Com o desenvolvimento de novas técnicas de avaliação dos perfis de expressão gênica (PEG) foram identificados subgrupos de risco diferenciado de carcinomas mamários. No entanto, as diferenças nos PEG não se traduzem em características morfológicas que possam ser prontamente identificadas no exame anatomopatológico rotineiro. Em casos com mesmo estágio clínico e com graduação histológica semelhante, a decisão da melhor conduta terapêutica pode ser bastante difícil e, apesar do diagnóstico precoce, muitos casos têm evolução clínica desfavorável. Reações de imunohistoquímica (IIQ) com marcadores baseados nos PEG demonstraram que os grupos mais relevantes são os carcinomas que expressam receptores hormonais (RH), os que apresentam expressão aumentada da proteína HER2 e os basalóides. Este último grupo caracteriza-se pela negatividade para RH e HER2, e por expressar uma ou mais das citoceratinas (CKs) típicas das camadas basais do epitélio ductal mamário (CKs 5,6, CK14 e CK17). A maioria dos estudos da literatura tem avaliado o perfil de expressão das CKs em grupos heterogêneos de tumores mamários diluindo, assim, o significado mais preciso dos resultados. Por este motivo, o objetivo principal do presente trabalho foi verificar numa amostra exclusiva de 1.167 casos de carcinomas ductais invasivos (CDI), com acompanhamento clínico médio de 62 meses, a associação da revisão padronizada das características clínico-morfológicas e dos perfis de expressão IIQ de 15 marcadores prognósticos e preditivos, otimizando as reações através da técnica de TMA. Os marcadores utilizados foram as CKs 5,6; 8; 13; 14; 17; 18; RH (estrógeno e progesterona); HER2; EGFR; p53; p63; Ki-67; psoriasina e ezrina. As pacientes foram separadas em dois grupos segundo

os estádios clínicos (EC): doença localizada (EC I e II) e doença avançada (EC III e IV) RESULTADOS: No total destes 1.167 casos de CDI, observamos significância estatística ($P < 0,05$) de diversas variáveis clínicas e morfológicas para a sobrevida global em 5 anos nas análises univariadas dos casos de ambos os grupos (índice mitótico, graus histológico, nuclear e extensão da necrose). No grupo de doença avançada, houve significância da presença de componente *in situ* associado ao invasivo, do status nodal e da intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral. Quanto aos perfis IIQ, foram significativos a expressão de RH, expressão de HER2, e o perfil basalóide. Na análise univariada para o grupo de doença avançada, a expressão de ezrina foi significativa ($P 0,023$). CONCLUSÃO: A revisão padronizada das variáveis clínico-morfológicas fornece importantes subsídios para a decisão da melhor conduta terapêutica nos casos de CDI. Verificamos que os subgrupos IIQ basalóide e HER2 positivos apresentam a pior evolução clínica nos grupos total e doença avançada (EC III e IV) da amostra, com relevância prognóstica ($P < 0,05$). No grupo de doença localizada, o subgrupo HER2 positivo tem o pior prognóstico. A análise IIQ com as CKs basais complementa os critérios de decisão de conduta terapêutica e a associação de novos marcadores poderá adicionar informações relevantes aos fatores preditivos e prognósticos já estabelecidos na prática oncológica.

SUMMARY

Stiepcich MMA. **[Cytokeratin profile: relation with differentiation, clinical and morphological features in invasive ductal carcinomas of the breast using tissue microarrays]**. São Paulo; 2007. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente]

Through development of new techniques of gene expression profiling (GEP) diverse risk subgroups of breast carcinomas were identified. However, the differences within GEP do not convert into readily identifiable morphological characteristics in routine histological examination. In cases with the same clinical stage and similar histological graduation it may be difficult to reach optimal therapeutic decisions. Even in case of early diagnosis, many cases have unfavorable clinical outcome. Immunohistochemical stains (IHC) with biomarkers based on GEP findings showed that the most relevant groups are the hormone receptor (HR) expressing, the HER2 overexpressing and the basal-like carcinomas. This later group is typically HR – and HER2 – (ie not amplified) and shows expression of one or more basal cytokeratins (CKs) of the mammary ductal epithelium (CKs 5,6; 14 and 17). Most studies have been analyzing the CK profile in heterogeneous groups of mammary tumors, thus, diluting a more precise significance of the results. Before this background, the main objective of this study was to verify in a group of 1.167 cases of ductal invasive carcinomas (IDC) exclusively, with medium clinical follow up of 62 months, the association of standardized revision of the clinical and morphological characteristics and the IHC profile of 15 prognostic and predictive markers, optimizing the technical reactions applying the tissue microarray technique. The markers utilized were CK 5,6; 8; 13; 14; 17; 18; HR (estrogen and progesterone), HER2, EGFR; p53; p63; Ki-67; psoriasin and ezrin. The patients were divided in two groups, according to the clinical staging (CS): localized disease (CS I and II) and advanced disease (CS III and IV). RESULTS: The five year overall survival analyses of these 1.167

IDC cases showed statistical significant results ($P < 0,05$) of some clinical and morphological variables for both groups of patients (mitotic index, histological and nuclear grades, necrosis extension). Within the advanced disease group significance of the *in situ* associated with the invasive component, the nodal status and the intensity of the inflammatory peritumoral infiltrate was observed. Regarding the IHC profiles, the HR expressing, the HER2 overexpressing and the basal-like were significant. Ezrin showed significance on the univariable analysis for the advanced disease group ($P = 0,023$). CONCLUSION: The standardized revision of the clinical and morphological variables provides important information for the clinical decision making in IDC patients. We verified that the IHC basal-like subgroup shows the worst clinical outcome in the whole group (clinical stages I – IV) of cases and in the group of advanced disease (clinical stages III and IV) of this study ($P < 0,05$). In the group of localized disease, the subgroup HER2-positive had the worst prognosis. The IHC analysis with the basal CKs provides important additional inputs for the clinical decision making. The association of new markers may add relevant information to the established predictive and prognostic factors of the clinical oncology practice.

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Figura 1 | Rede de filamentos intermediários (citoceratinas) em célula animal. | 7 |
| Figura 2 | Tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimativa para 2006 | 18 |
| Figura 3 | Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2006 no Brasil. | 18 |
| Figura 4 | Taxas de mortalidade por câncer de mama por 100 mil mulheres no Brasil, período entre 1979 e 1999 (taxas brutas e ajustadas por idade pelas populações mundial e brasileira). | 19 |
| Figura 5 | Taxas de incidência e mortalidade do câncer de mama em mulheres nos Estados Unidos, no período de 1975 a 2003. | 19 |
| Figura 6 | Princípio da construção e aplicação prática dos TMA | 51 |
| Figura 7 | Distribuição das idades – Estádios clínicos I a IV | 67 |
| Figura 8 | Distribuição de casos de acordo com o tamanho tumoral (pT). | 68 |
| Figura 9 | Distribuição de casos segundo tamanho tumoral (pT) e estadiamentos clínicos. | 69 |
| Figura 10 | Foto dos blocos dos <i>tissue microarrays</i> deste estudo | 71 |
| Figura 11 | Padrões de expressão dos marcadores IIQ (CK5,6; CK8 e CK13) | 79 |
| Figura 12 | Padrões de expressão dos marcadores IIQ (CK14; CK17; CK18) | 80 |
| Figura 13 | – Padrões de expressão dos marcadores IIQ (ER, PR, Ki-67 e p53) | 81 |
| Figura 14 | Padrões de expressão dos marcadores IIQ (HER2 e EGFR) | 82 |
| Figura 15 | Padrão de expressão IIQ p63 e lâminas dos TMA | 83 |
| Figura 16 | Associação dos estádios clínicos e sobrevida (EC I a IV) | 84 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 17 | Estádios clínicos agrupados (EC I-II x EC III-IV): associação com sobrevida global. | 84 |
| Figura 18 | Distribuição dos casos segundo o tamanho tumoral (pT) e estadiamento clínico agrupado | 90 |
| Figura 19 | Sobrevida proporcional de acordo com o tamanho tumoral (amostra total - EC I a IV). | 91 |
| Figura 20 | Distribuição dos casos segundo o grau histológico – EC I a IV | 92 |
| Figura 21 | Sobrevida de acordo com o grau histológico (GH) e estadiamento clínico (EC) agrupado. | 93 |
| Figura 22 | Distribuição dos casos segundo estadiamento nodal não agrupado e clínico | 95 |
| Figura 23 | Status nodal não agrupado e sobrevida (estádios clínicos I a IV) | 96 |
| Figura 24 | Distribuição dos casos segundo estadiamento nodal e clínico (agrupados) ($P < 0,001$) | 96 |
| Figura 25 | Sobrevida segundo status nodal (negativo x positivo) (estádios clínicos I a IV). | 97 |
| Figura 26 | Sobrevida cumulativa do subgrupo basalóide (EC I e II) ($P = 0,026$) | 107 |
| Figura 27 | Sobrevida cumulativa do subgrupo basalóide (EC III e IV – doença avançada) ($P < 0,001$) | 107 |
| Figura 28 | Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 negativos (EC I e II - doença localizada) ($P < 0,001$) | 108 |
| Figura 29 | Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 negativos (EC III e IV - doença avançada) ($P < 0,001$) | 108 |
| Figura 30 | Sobrevida cumulativa do subgrupo HER2 positivos / receptores hormonais negativos (EC I e II - doença localizada) ($P < 0,001$) | 109 |

| | | |
|------------------|--|-----|
| Figura 31 | Sobrevida cumulativa do subgrupo HER2 positivos / receptores hormonais negativos (EC III e IV - doença avançada) (P = 0,025) | 109 |
| Figura 32 | Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 positivos (EC I e II - doença localizada) (P = 0,673) | 110 |
| Figura 33 | Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 positivos (EC III e IV - doença avançada) (P = 0,368) | 110 |
| Figura 34 | Sobrevida cumulativa do subgrupo “null” (EC I e II - doença localizada) (P = 0,678) | 111 |
| Figura 35 | Sobrevida cumulativa do subgrupo “null” (EC III e IV - doença avançada) (P = 0,6) | 111 |
| Figura 36 | Sobrevida cumulativa dos subgrupos de expressão imunoistoquímica (EC I e II - doença localizada) (P < 0,001) | 112 |
| Figura 37 | Sobrevida cumulativa dos subgrupos de expressão imunoistoquímica (EC III e IV - doença avançada) (P < 0,001) | 112 |
| Figura 38 | Sobrevida dos subgrupos de expressão imunoistoquímica no grupo total de pacientes (EC I a IV) (P < 0,001) | 113 |
| Figura 39 | Sobrevida cumulativa segundo expressão de receptores de estrógeno - EC I e II (p <0,001) | 114 |
| Figura 40 | Sobrevida cumulativa segundo o escore de HER2 - EC I e II (p = 0,003). | 115 |
| Figura 41 | Sobrevida cumulativa segundo os períodos de tratamento - EC I e II (p <0,001) | 115 |
| Figura 42 | Sobrevida segundo número de fatores de risco para óbito – estádios clínicos I e II (P < 0,001) | 116 |
| Figura 43 | Sobrevida cumulativa segundo a presença de metástases à distância - EC III e IV (p <0,001) | 118 |

| | | |
|------------------|---|-----|
| Figura 44 | Sobrevida cumulativa segundo a presença de metástases linfonodais - EC III e IV ($p = 0,001$) | 118 |
| Figura 45 | Sobrevida cumulativa segundo a expressão de receptores de estrógeno - EC III e IV ($P < 0,001$). | 119 |
| Figura 46 | Sobrevida cumulativa segundo a expressão de receptores de progesterona - EC III e IV ($P < 0,001$) | 119 |
| Figura 47 | Sobrevida cumulativa segundo a expressão de Ki-67 (atividade proliferativa) - EC III e IV ($P = 0,008$) | 120 |
| Figura 48 | Sobrevida segundo número de fatores de risco para óbito – estádios clínicos III e IV ($P < 0,001$) | 121 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------------|---|----|
| Tabela 1 | Distribuição dos casos segundo estadiamento clínico ao diagnóstico – EUA – período de 1988 a 2003 | 20 |
| Tabela 2 | Distribuição dos casos segundo estadiamento clínico ao diagnóstico – Brasil – períodos de 1990 a 1994 e de 1995 a 2002. | 20 |
| Tabela 3 | Distribuição dos casos segundo o ano de início do tratamento. | 62 |
| Tabela 4 | Pacientes submetidas a quimioterapia adjuvante, neoadjuvante e hormonioterapia | 63 |
| Tabela 5 | Pacientes submetidas a radioterapia pré ou pós-operatória | 63 |
| Tabela 6 | Tempo de seguimento clínico (meses) segundo estádios clínicos agrupados. | 64 |
| Tabela 7 | Número de casos por evolução clínica (EC I a IV). | 65 |
| Tabela 8 | Distribuição dos casos segundo os estádios clínicos. | 65 |
| Tabela 9 | Distribuição dos casos segundo os estádios clínicos agrupados. | 66 |
| Tabela 10 | Distribuição das pacientes segundo idade e estadiamento clínico. | 66 |
| Tabela 11 | Distribuição das pacientes segundo idade estratificada (até 50 anos ou mais de 50 anos) e estádios clínicos agrupados | 67 |
| Tabela 12 | Distribuição dos casos segundo status menopausal. | 68 |
| Tabela 13 | Categorização dos casos segundo a percentagem de células marcadas nas reações imunoistoquímicas | 78 |
| Tabela 14 | Associação dos casos segundo história familiar de câncer de mama e estadiamento clínico agrupado ($p = 0,139$). | 88 |
| Tabela 15 | Associação dos casos segundo a cor e estádios clínicos agrupados ($p = 0,001$) | 88 |
| Tabela 16 | Associação dos casos segundo o tamanho tumoral (pT) e estadiamento clínico agrupado | 90 |
| Tabela 17 | Distribuição dos casos segundo graduação histológica e estadiamento clínico ($p < 0,001$). | 92 |

| | | |
|------------------|--|------------|
| Tabela 18 | Distribuição dos casos segundo graduação nuclear e correlação com o estadiamento clínico agrupado (EC) ($p = 0,029$) | 93 |
| Tabela 19 | Distribuição dos casos segundo índice mitótico e correlação com estadiamento clínico agrupado (EC) ($p = 0,001$). | 94 |
| Tabela 20 | Distribuição da intensidade do Infiltrado inflamatório peritumoral e correlação com estadiamento clínico agrupado ($p = 0,016$). | 94 |
| Tabela 21 | Distribuição dos casos segundo o status nodal (não agrupado) e estadiamentos clínicos ($p < 0,001$). | 95 |
| Tabela 22 | Distribuição dos casos segundo a presença de metástases nodais e correlação com estadiamento clínico agrupado ($P < 0,001$). | 96 |
| Tabela 23 | Número de casos avaliáveis por marcador (EC I a IV). | 98 |
| Tabela 24 | Distribuição dos casos segundo expressão dos marcadores imunoistoquímicos e estadiamentos clínicos agrupados | 99- 103 |
| Tabela 25 | Distribuição dos casos segundo perfis de expressão combinada de marcadores imunoistoquímicos e estadiamentos clínicos agrupados. | 104 |
| Tabela 26 | Análise univariada dos resultados imunoistoquímicos, características clínico-demográficas e histológicas, segundo estádios clínicos agrupados (EC I e II e EC III e IV). | 105 |
| Tabela 27 | Variáveis mais freqüentes no grupo de tumores basalóides (EC I a IV). | 106 |
| Tabela 28 | Fatores de risco independentes para óbito segundo o modelo de riscos proporcionais de Cox (estádios clínicos I e II). | 114 |
| Tabela 29 | Fatores de risco independentes para óbito segundo o modelo de riscos proporcionais de Cox (estádios clínicos III e IV). | 117 |

LISTA DE QUADROS

| | | |
|-----------------|--|----|
| Quadro 1 | Hormônios que regulam o crescimento da mama | 2 |
| Quadro 2 | Proteínas dos filamentos intermediários (FI) em mamíferos. | 10 |
| Quadro 3 | Sistema de graduação de Nottingham | 70 |
| Quadro 4 | Níveis dos blocos dos TMA em que foram realizadas as reações de IIQ. | 73 |
| Quadro 5 | Anticorpos e protocolos de reação utilizados. | 75 |
| Quadro 6 | Padrões de imunomarcção dos anticorpos | 76 |
| Quadro 7 | Gradação das reações de imunoistoquímica de acordo com o número de células marcadas | 77 |
| Quadro 8 | Imunoexpressão da proteína c-erbB-2 segundo o preconizado para o Herceptest (DAKO®) (score de HER2). | 84 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-----------------|---|
| BRCA-1 | breast cancer associated gene - 1 |
| CDI | carcinoma ductal invasivo |
| cDNA | DNA complementar |
| chk2 | Checkpoint kinase-2 |
| CK | citoceratinas (cytokeratins) |
| C-PKC | Protein-Kinase-C |
| EC | estádio clínico |
| EGFR | epidermal growth factor receptor |
| ELISA | Enzyme-linked immunosorbent assay |
| EMT | transição epitélio-mesenquimal |
| FGFR | fibroblast growth factor receptor |
| FI | filamentos intermediários |
| GH | grau histológico |
| GN | grau nuclear |
| HER2 | proteína c-erbB-2 / HER2neu |
| IGF-I | Insuline growth factor-I |
| IIQ | imunoistoquímica |
| JAK-STAT | Janus kinase-signal transducer and activator of transcription |
| MAPK | mitogen activated protein kinase |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| PCR | reação de polimerase em cadeia |

ÍNDICE

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 1 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA | 17 |
| 2.1 | Citoesqueleto e citoceratinas | 22 |
| 2.2 | Marcadores moleculares relacionados à evolução clínica | 29 |
| 2.2.1 | Proto-Oncogene C-ErbB-2/Her-2 Neu (Her2) | 30 |
| 2.2.2 | EGFR | 35 |
| 2.2.3 | Receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR) | 37 |
| 2.2.4 | Proteína p53 | 41 |
| 2.2.5 | Proteína p63 | 42 |
| 2.2.6 | Ki-67 | 44 |
| 2.2.7 | Ezrina | 46 |
| 2.2.8 | Psoriasina | 47 |
| 2.3 | Tissue Microarrays (TMA) | 49 |
| 2.3.1 | Histórico dos TMA | 49 |
| 2.3.2 | Montagem dos TMA | 50 |
| 2.3.3 | Coloração e análise dos TMA | 55 |
| 2.3.4 | Leitura das lâminas e tabulação dos dados e resultados dos TMA | 56 |
| 3 | OBJETIVOS | 58 |
| 4 | CASUÍSTICA E MÉTODOS | 60 |
| 4.1 | Dados clínicos e demográficos | 62 |
| 4.1.1 | Tempo de seguimento | 64 |
| 4.1.2 | Evolução clínica | 64 |
| 4.1.3 | Estadiamento clínico | 65 |
| 4.1.4 | Gradação histológica | 69 |
| 4.1.5 | Confecção dos blocos e lâminas dos TMA | 71 |
| 4.2 | Estudo Imunoistoquímico (IIQ) | 72 |

| | | |
|----------|--|------------|
| 4.3 | Análise estatística dos dados e resultados | 85 |
| 5 | RESULTADOS | 87 |
| 5.1 | Sobrevida Global | 89 |
| 5.2 | Tamanho dos tumores | 90 |
| 5.3 | Revisão histológica | 91 |
| 5.4 | Estudo imunoistoquímico | 97 |
| 5.4.1 | Análise da expressão dos marcadores IIQ, características demográficas e histológicas com a sobrevida global | 105 |
| 5.4.2 | Associação dos subgrupos de expressão combinada de marcadores imunoistoquímicos com sobrevida global | 107 |
| 5.4.3 | Curvas de sobrevida comparativas dos grupos de expressão imunoistoquímica segundo estádios clínicos agrupados. | 112 |
| 5.5 | Estabelecimento de grupos de risco de acordo com variáveis que tiveram significância na análise multivariada | 113 |
| 5.5.1 | Grupo doença localizada (EC I e II) | 113 |
| 5.5.2 | Grupo doença avançada (EC III e IV) | 117 |
| 6 | DISCUSSÃO | 122 |
| 7 | CONCLUSÕES | 137 |
| 8 | REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 139 |

ANEXOS

Anexo 1 Ficha de registro de dados epidemiológicos, clínicos, histológicos e terapêuticos.

Anexo 2 Estadiamento anatomopatológico.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea tanto do ponto de vista clínico quanto biológico. Com o diagnóstico em estádios mais precoces, um dos indicadores prognósticos mais significativos, o status nodal, por ser negativo, não auxilia na discriminação das pacientes dos grupos de maior ou menor risco de progressão da doença.

A despeito dos enormes avanços nas pesquisas, há importantes questões que ainda não puderam ser resolvidas de forma objetiva e confiável:

1. determinar a real agressividade de um tumor maligno localizado;
2. definir a probabilidade de evolução clínica desfavorável;
3. analisar de forma completa e integrada as propriedades relevantes das células neoplásicas, de forma a permitir tratamentos específicos e individualizados.

As dificuldades para resolver essas questões decorrem do grande número de combinações de defeitos genéticos cumulativos que ocorrem na progressão maligna, e resultam numa ampla diversidade fenotípica e biológica das neoplasias malignas.

Existem vários fatores que influenciam a regulação do desenvolvimento normal, da carcinogênese e da progressão do câncer de mama, sendo os hormônios alguns dos principais (DICKSON e LIPPMAN 2001). Os hormônios com papel mais bem estudado e definido são os

esteróides endócrinos, peptídeos e outras moléculas produzidas pelos ovários, hipófise, pâncreas endócrino, tireóide e córtex adrenal (Quadro 1).

Quadro 1 - Hormônios que regulam o crescimento da mama

| | |
|---------------------|---|
| Pré-puberdade | ??? |
| Puberdade | Estrógeno, hormônio do crescimento, IGF-I |
| Gestação e lactação | Estrógeno, progesterona, insulina, hormônio do crescimento, hormônio tireoideano, IGF-I, prolactina, hidrocortisona |
| Câncer | Estrógeno, progesterona, insulina, IGF-I |

IGF-I: Insulin growth factor - I

Fonte: Adaptado de MENDELSON (2001)

Esses hormônios atuam através de receptores nucleares ou na superfície celular, e regulam a transcrição de grupos específicos de genes. Adicionalmente, tecidos mamários normais e malignos são capazes de produzir substâncias similares aos hormônios em suas próprias células, que agem localmente (hormônios parácrinos), modulando a função das células epiteliais, estromais ou vasculares / endoteliais adjacentes.

Por sua vez, as células tumorais são capazes de produzir substâncias que agem como hormônios autócrinos, regulando a transcrição de genes através da ação em receptores de sua própria superfície. Dentre os fatores autócrinos podem ser citados os fatores de crescimento polipeptídicos, as prostaglandinas, ácidos graxos e gases solúveis (óxido nítrico, por exemplo). Os fatores de crescimento polipeptídicos agem primariamente nos receptores da superfície celular, promovendo a transdução de sinais para o

núcleo através da fosforilação de proteíno-quinases, dentre outros mecanismos de ativação. (DICKSON e LIPPMAN 2001).

Presume-se que no “microambiente” do parênquima mamário, os três principais grupos de células – epiteliais, mioepiteliais basais e estromais – utilizam os fatores parácrinos em suas interações. Os mecanismos autócrinos também devem desempenhar um papel importante, principalmente nas células epiteliais.

O tecido glandular mamário desenvolve-se a partir da interação do epitélio rudimentar na papila mamária com o tecido adiposo subjacente na fase pré-púbere. A penetração inicial dos ductos no tecido fibro-adiposo depende de fatores indutivos locais ainda pouco conhecidos e compreendidos. O alongamento e a ramificação dos ductos ocorrem na puberdade, sob estímulos positivos do estrógeno, progesterona e hormônio de crescimento hipofisário, ou de seu mediador local, o fator de crescimento IGF-I (*insuline-like growth factor-I*). A finalização do processo de diferenciação ocorre durante a gestação, com o desenvolvimento lóbulo-alveolar, sob a influência de vários hormônios: prolactina, hormônio do crescimento, insulina, glicocorticóides, estrógeno e progesterona (DICKSON e LIPPMAN 2001).

Durante a puberdade, o crescimento decorrente da estimulação pelo estrógeno e progesterona depende da expansão de uma população de células de reserva que facilita a ‘invasão’ do tecido fibro-adiposo e as ramificações terminais da rede de ductos. Essas células multipotentes de reserva têm características morfológicas particulares, ficando dispostas na

camada basal das unidades ducto-lobulares mamárias. O estroma adjacente certamente desempenha papel crucial no desenvolvimento normal da mama bem como na carcinogênese, através de interação com as células basais das unidades ducto-lobulares e com a membrana basal (DICKSON e LIPPMAN 2001).

Uma característica fundamental da diferenciação mamária é a formação da membrana basal, sintetizada e disposta na interface do epitélio das unidades ducto-lobulares e o estroma subjacente (STREULI et al. 1991). Seus constituintes primários são o colágeno tipo IV, laminina, fibronectina e heparan-sulfato-proteoglicans. As células mioepiteliais basais possuem altos níveis de colagenase tipo IV, com provável participação crítica nos processos de renovação da membrana basal e remodelação das glândulas (MONTEAGUDO et al. 1990).

O câncer é resultado de um processo complexo que envolve o descontrole e o desequilíbrio da ação de fatores que promovem a sobrevivência das células, ativação de oncogenes, inativação ou perda de genes supressores de tumores, com participação dos fatores hereditários e a exposição a fatores promotores da carcinogênese. Na mama, caracteriza-se pela proliferação descontrolada e desregulada das células epiteliais, pelo desaparecimento das células mioepiteliais, alterações nos padrões de morte celular programada (apoptose) e, algumas vezes, pela perda de certas características epiteliais, denominada como transição epitélio-mesenquimal (EMT). A transição epitélio-mesenquimal, definida como a ocorrência de número variável de células epiteliais (tumorais) que passam a expressar

marcadores mesenquimais, tais como vimentina, tenascina e estromelina, foi originalmente descrita como um processo normal do desenvolvimento (HAY 1995). Posteriormente, foi usada para explicar a conversão mesenquimal de alguns grupos de células epiteliais em cultura. No câncer, a EMT indica um comportamento mais agressivo das células tumorais, e está presente em cerca de 18% dos carcinomas mamários (DANDACHI et al. 2001; JONES et al. 2001; SORLIE et al. 2001; LEE JM et al. 2006).

Ocorrem também instabilidades genômicas (mutações, deleções, ampliações e rearranjos cromossômicos), com perda global da organização tecidual normal e, eventualmente, metástases.

A estabilidade genômica é mantida por diversos componentes moleculares de diferentes vias do metabolismo celular que têm papel primordial na supressão do câncer. Mutações herdadas nos membros das 4 principais vias de controle do reparo a danos ao DNA celular – BRCA1, TP53 (p53), chk2 e ATM – provocam um aumento na suscetibilidade ao câncer de mama nas mulheres portadoras dessas mutações, sendo as mutações do gene P53 as mais freqüentes nos carcinomas esporádicos da mama.

Logo após estímulos mitogênicos observa-se indução dos proto-oncogenes c-fos, c-myc, c-myb e c-jun. Existem inúmeras evidências que suportam as hipóteses causais de ligação de sua indução com os processos proliferativos. Alguns desses genes são induzidos pelo estrógeno e progesterona no câncer de mama (LEROY et al. 1991; MURPHY 1991; VAN DER BURG et al. 1991; CHIAPPETTA et al. 1992).

Fundação Antonio Prudente
Maria Rodrigues Alves Kuninar
Coordenadora Pós-Graduação



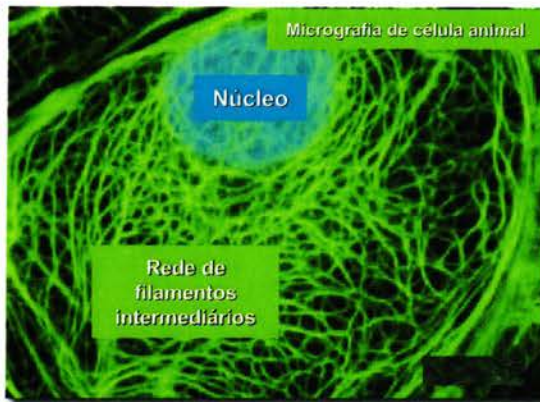
Os proto-oncogenes nucleares sinalizam múltiplas vias intracelulares que estimulam o crescimento epitelial por ativação esteroideal direta, através da proteína MAP-kinase (*mitogen-activated protein*), induzida pelos fatores de crescimento, da fosfolipase C-PKC ou da via JAK-STAT (*Janus kinase-signal transducer and activator of transcription*).

Após estímulos proliferativos exercidos através do EGFR (*epidermal growth factor*), FGFR (*fibroblast growth factor*) e dos receptores de insulina, a ativação mais importante é a da via da MAP-kinase. Ocorre a autofosforilação dos receptores da superfície que desencadeia uma cascata de interações das vias de transdução dos sinais de ativação, culminando na liberação do ciclo celular e na proliferação das células.

A expressão de algumas oncoproteínas (ex: c-fos, c-ras) parece desregular os genes que codificam as citoceratinas (CKs, do inglês 'cytokeratins') e proteínas associadas (JOOSS e MULLER 1995), e essas alterações em seu perfil de expressão parecem ocorrer precocemente na transformação neoplásica (TRASK et al. 1990; PAINE et al. 1992; FRANZÉN et al. 1996).

Nas células transformadas, as alterações na composição das citoceratinas do citoesqueleto interferem no controle do ciclo celular, favorecendo a proliferação, conferindo às células neoplásicas maior plasticidade e maleabilidade, aumentando sua capacidade de invasão da membrana basal e estroma adjacente, de penetração na parede dos vasos e de geração de metástases à distância.

O citoesqueleto, uma rede complexa de fibras citoplasmáticas, com propriedades estruturais intrínsecas de auto-organização e reação a estímulos externos que lhe conferem características muito peculiares e versáteis, é crítico para a mobilidade celular, sustentação da membrana celular, formação de vias de transporte de organelas e outros elementos através do citossol, sofrendo constantes rearranjos que podem produzir movimentos celulares (ALBERTS et al. 2002; LODISH et al. 2000).



Fonte: adaptado de DAVIDSON (2007)

Figura 1 - Rede de filamentos intermediários (citoceratinas) em célula animal.

Os filamentos intermediários (FI) formam uma rede citoplasmática densa que se estende do núcleo até a membrana plasmática, com função primária estrutural, participando da organização topológica dos tecidos, em conjunto com os microtúbulos. Os elementos do citoesqueleto interagem com as forças mecânicas externas exercidas sobre a superfície das células, absorvendo parte dos impactos e transformando sua estrutura molecular, acionando vias de sinalização intracelulares que promovem a adaptação das células aos agentes externos. Conforme a duração, natureza e intensidade desses agentes externos, as células podem sofrer alterações de maior ou menor intensidade, transformando algumas de suas características a fim de aumentar sua resistência e manter sua estabilidade frente às agressões. Ainda não são conhecidos todos os mecanismos dessa complexa rede de sinalizações intra, extra e intercelulares que afetam a organização do citoesqueleto, as funções metabólicas e a multiplicação celular.

Sob microscopia eletrônica, o citoesqueleto apresenta-se como uma densa trama randômica de fibras citossólicas divididas em: [1] microfilamentos, com 7-9 nm de diâmetro; [2] filamentos intermediários (FI), com 10 nm de diâmetro; e [3] microtúbulos, com 24 nm de diâmetro.

Há cinco classes de FI, cuja expressão é característica de certos tecidos ou tipos celulares (Quadro 2).

As ceratinas ácidas (tipo I) e básicas (tipo II) são tipicamente expressas nas células epiteliais e constituem a classe mais ampla e variada de FI, com numerosas isoformas divididas em dois grupos. Cerca de 10 ceratinas são específicas dos epitélios mais resistentes, tais como unhas,

cabelos e pêlos. Outras 20 ceratinas, chamadas de citoceratinas (CKs), são geralmente encontradas nos epitélios que revestem as cavidades internas do organismo. Seus pesos moleculares variam de 40 a 68 kD. Doze delas formam a classe de CK ácidas e oito moléculas compõem a classe das CKs básicas. Essas duas classes de CKs são constituídas por um grupo complexo de polipeptídios que formam heterodímeros, agrupados em filamentos heteropoliméricos de ceratina, onde a CK básica tem maior peso molecular (MOLL 1992).

Quadro 2 - Proteínas dos filamentos intermediários (FI) em mamíferos.

| FI | PM (10^{-3}) | Tecido |
|--|------------------|--|
| Tipo I a | | |
| Ceratinas ácidas | 40-57 | Epitélios |
| | | |
| Tipo II b | | |
| Ceratinas básicas | 53-67 | Epitélios |
| | | |
| Tipo III | | |
| Vimentina | 57 | Mesênquima |
| Desmina | 53 | Músculo |
| Proteína acídica fibrilar glial | 50 | Células gliais e astrócitos |
| Periferina | 57 | Neurônios centrais e periféricos |
| | | |
| Tipo IV c | | |
| NF-L | 62 | Neurônios maduros |
| NF-M | 102 | Neurônios maduros |
| NF-H | 110 | Neurônios maduros |
| Internexina | 66 | Sistema nervoso central em desenvolvimento |
| | | |
| Tipo V "nonstandard" | | |
| Filensina | 83 | Fibroblastos do cristalino |
| Faquinina | 45 | Fibroblastos do cristalino |
| | | |
| Tipo V | | |
| Lamina A | 70 | Núcleos de todas as células |
| Lamina B | 67 | Núcleos de todas as células |
| Lamina C | 67 | Núcleos de todas as células |
| | | |
| * Pode haver variações espécie-dependentes | | |
| a / b Há mais de 15 isoformas de ceratinas ácidas e básicas conhecidas | | |
| c NF = neurofilamento; L, M e H = low, medium e high (baixo, médio e alto) peso molecular (PM) | | |

Fonte: Adaptado de LODISH et al. (2000).

A composição das CKs é produto específico do tipo de epitélio e do grau de diferenciação celular. Cada tipo de epitélio apresenta um padrão de expressão particular de citoceratinas, com uma combinação característica de CKs dos tipos I e II. O epitélio do ducto mamário é complexo, constituído por

uma camada de células mioepiteliais basais e número variável de camadas de células epiteliais luminais. As células mioepiteliais basais expressam CK 5, CK 14 e CK 17, enquanto as células luminais expressam CKs próprias dos epitélios simples, tais como CK 8, CK 18, CK 19 e CK 7.

Os carcinomas geralmente expressam o padrão de CKs que, ao menos parcialmente, representa as células de origem; entretanto, alguns tumores apresentam expressão anômala de CKs. Nos carcinomas de mama as CKs expressas são geralmente aquelas do epitélio luminal, mas a expressão de CK de padrão mioepitelial (ou basal) indica dediferenciação tumoral, correlacionando-se com comportamento biológico mais agressivo. (PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001; VAN DE RIJN et al. 2002; NIELSEN et al. 2004; ABD EL-REHIM et al. 2005; FAN et al. 2006)

O perfil de expressão de citoceratinas e outros filamentos intermediários tem aplicação prática diária na diferenciação de tumores metastáticos de origem desconhecida. Atualmente, muitos trabalhos na literatura têm dedicado atenção à expressão dos marcadores epiteliais e sua correlação com fatores prognósticos bem estabelecidos. Foram demonstradas grandes superposições dos padrões de expressão gênica em linhagens de células de câncer de mama, em cânceres mamários e no parênquima mamário normal (ROSS et al. 2000; SORLIE et al. 2001; NIELSEN et al. 2004; ABD EL-REHIM et al. 2005; FAN et al. 2006). Entretanto, ainda é necessária uma maior compreensão dos mecanismos através dos quais as diferenças na expressão gênica atuam nas vias de

sinalização molecular, levando a padrões diversos de expressão de citoceratinas nos tecidos mamários normal e neoplásico.

O estudo de grupos amplos de pacientes com longo acompanhamento clínico e estratificados segundo seu estadiamento pode facilitar a aplicação dos achados de expressão gênica e sua correlação com a evolução clínica, na tentativa de se definir marcadores relevantes do comportamento biológico dos tumores. Este é o escopo principal deste nosso estudo.

O grau de diferenciação é uma característica histológica fundamental, com significado prognóstico na maioria das neoplasias malignas, e deve ser documentado nos laudos histopatológicos em tumores de todos os sítios primários. O carcinoma ductal é o tumor mais comum da mama. Um dos fatores mais importantes na determinação de seu comportamento clínico é o grau histológico.

O estudo das correlações da expressão de CKs e outros FI com o grau de diferenciação, complementado pela avaliação de outros marcadores relacionados aos elementos do citoesqueleto (ezrina, psoriasina) e a algumas das vias de sinalização intracelular podem auxiliar a compreensão mais abrangente da atividade e interação das CKs com moléculas ligadas ao controle do ciclo celular, ainda não completamente desvendadas.

A expressão de CKs varia ao longo das diferentes fases da vida (embrionária, infância, puberdade, fase adulta e senescência), e está correlacionada à organogênese, desenvolvimento e maturação funcional dos diferentes tecidos e órgãos e ao processo de envelhecimento (PARAMIO et

al. 2001b). Na carcinogênese há alterações na expressão normal das CKs, observando-se expressão anômala ou perda de expressão de algumas delas, que parecem estar relacionadas aos diferentes comportamentos biológicos dos diversos tipos de carcinoma. No estudo de FUCHS et al. (2002) com um número restrito de 80 pacientes com carcinomas ductais de mama, a perda de expressão de CK 8 com o ganho concomitante de expressão de vimentina correlacionou-se com menor tempo de sobrevida, sendo que casos com expressão de c-erbB-2 apresentavam maior manutenção da expressão de CK19.

VAN DE RIJN et al. (2002) demonstraram que a expressão de CK 17 e/ou CK 5/6 em 600 casos testados com TMA correlacionou-se com o comportamento clínico desfavorável, independentemente do tamanho e grau histológico do tumor nos casos sem metástase nodal. KORSCHING et al. (2002) avaliaram a importância das CKs 5/6 e 8/18 correlacionando-as a outros marcadores prognósticos.

A maioria dos trabalhos utiliza a técnica de TMA em tumores de diferentes origens ou em vários tipos de tumores de um mesmo órgão. Entretanto, não se encontram estudos que tenham concentrado as análises em apenas um tipo de carcinoma mamário, envolvendo mais que 500 casos com diversos estadiamentos clínicos, com diferentes graus de diferenciação histológica e com seguimento clínico expressivo, envolvendo concomitantemente um grupo abrangente de marcadores do fenótipo basal, preditivos e prognósticos.

Dessa forma, a análise do perfil de expressão das citoceratinas constitui-se numa interessante proposta de ferramenta adicional para auxiliar na identificação dos casos de carcinomas em que, mesmo em estádios precoces, as características histológicas não permitem prever seu comportamento biológico mais agressivo, possibilitando a introdução de tratamentos mais efetivos desde o diagnóstico inicial.

As modernas técnicas de citogenética e cDNA *microarrays* evidenciam que as aberrações genéticas e a expressão gênica das neoplasias malignas não ocorrem de forma anárquica, mas sim em múltiplas vias com intersecções variadas, cada uma delas associada a um fenótipo morfológico celular ou arquitetura tumoral específica. Isso levou ao desenvolvimento de propostas de modelos de progressão e de comportamento tumoral baseados na morfogênese e citogenética, com diversos perfis de expressão proteica (KORSCHING et al. 2002).

A partir de trabalhos de expressão gênica, foram identificados subgrupos de carcinomas mamários, referidos como tendo um perfil 'basalóide', dada a expressão de marcadores mais freqüentemente encontrados nas células mioepiteliais basais dos ductos mamários, não discrimináveis por seu aspecto morfológico no exame histológico habitual (PEROU et al. 2000; VAN'T VEER et al. 2002; RAKHA et al. 2007a e b).

Análises subseqüentes do perfil de expressão gênica mostraram duas grandes subdivisões do grupo total de tumores em relação à positividade ou negatividade dos receptores de estrógeno (ER) (PEROU et al. 2000; GRUVBERGER et al. 2001; VAN'T VEER et al. 2002). Outros autores

mostraram associação dos perfis de expressão gênica com resposta a agentes quimioterápicos específicos (FOLGUEIRA et al. 2005). Posteriormente, estudos demonstraram a associação desse subgrupo de tumores ER-negativos à expressão de citoceratinas basais (CK5 / 6, CK14, CK17) e à presença de mutações do gene BRCA-1. Cerca de 15 a 19% dos carcinomas mamários invasivos enquadram-se nesse subgrupo, e apresentam maior frequência de alto grau histológico, áreas de necrose, fenótipo medular (típico ou atípico), com alterações genéticas distintas, dentre elas a mutação da TP53 (SORLIE et al. 2001).

Num recente trabalho de LAKHANI et al. (2005) foi demonstrado que a expressão de marcadores basais (CK14, CK5/6, CK17, receptor de fator de crescimento epidérmico – EGFR - e osteonectina) e a negatividade para receptores de estrógeno são mais comuns em tumores de pacientes portadoras de mutação germinativa do gene BRCA-1. Sugerem que o painel citado de marcadores poderia ser utilizado na prática clínica para selecionar pacientes com a mutação de BRCA-1. A alta percentagem de casos desse subgrupo que apresenta positividade para o EGFR indica também um possível benefício do uso de terapias específicas anti-tirosino-quinase.

Há, portanto, inúmeras evidências de associação entre a expressão de citoceratinas referidas como 'basalóides' a outros marcadores ligados à maior proliferação celular, descontrole do ciclo celular, alteração nos mecanismos de apoptose, maior expressão de receptores de fatores de crescimento na superfície celular e mutações genéticas, todos relacionados a comportamento biológico mais agressivo dos tumores que os expressam.

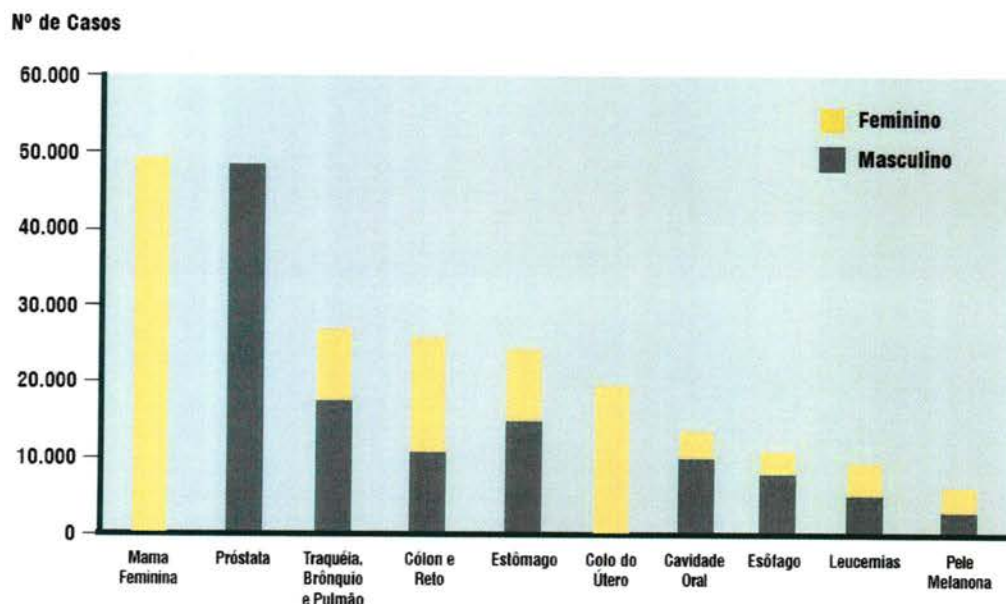
A validação de todos os achados dos estudos biomoleculares pelas técnicas convencionais de imunistoquímica é trabalhosa, cara e demorada. Dado o seu alto grau artesanal e as dificuldades para manter sua realização em condições idênticas de temperatura, concentração de reagentes, mesmo com a automação de algumas das etapas envolvidas, há inúmeros resultados conflitantes nos relatos de literatura. O uso dos arranjos teciduais em matriz (*tissue microarrays* - TMA) tem facilitado muito a verificação rápida e reprodutível da relevância dos genes e moléculas candidatos a marcadores preditivos e prognósticos em amostras constituídas por grande número de casos. É uma técnica relativamente simples, cuja validação em relação às técnicas convencionais tem se consolidado cada vez mais, tendo rapidamente se difundido nos grandes centros mundiais de pesquisa (SCHRAML et al. 2003; VAN DE RIJN e GILKS 2004).

2 REVISÃO DA LITERATURA

No contexto mundial, há cerca de um milhão de casos novos de câncer de mama por ano. O câncer de mama é a segunda causa de óbito nas mulheres dos países desenvolvidos, e vem assumindo importância cada vez maior em nosso meio (Ministério da Saúde 2005).

Sua incidência apresenta um crescimento contínuo na última década, o que pode ser resultado de mudanças sócio-demográficas e de maior acesso aos serviços de saúde. Quando diagnosticado nos estádios iniciais, seu prognóstico é relativamente bom, com sobrevida média geral cumulativa de cerca de 65% após cinco anos nos países desenvolvidos, e de 56% nos países em desenvolvimento. A sobrevida média após 5 anos na população mundial é de 61%.

No Brasil, o risco estimado do câncer de mama é de 52 casos a cada 100 mil habitantes. Na região Sudeste, é o câncer mais incidente entre as mulheres (71 novos casos por 100 mil), bem como nas regiões Sul (69/100 mil, sem consideramos os tumores cutâneos não-melanoma), Centro-Oeste (38/100 mil) e Nordeste (27/100 mil). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (15/100 mil), seguindo o câncer do colo uterino (Ministério da Saúde 2005).



Fonte: Ministério da Saúde (2005)

Figura 2 – Tipos de câncer mais incidentes no Brasil, estimativa para 2006

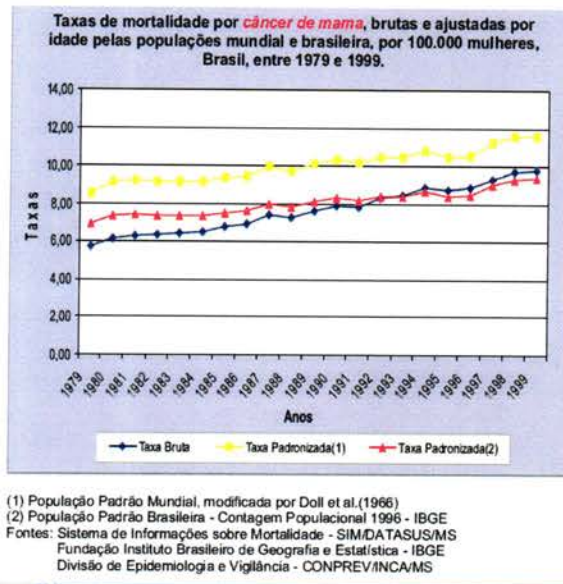
Mulheres



Fonte: Ministério da Saúde (2005)

Figura 3 – Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100.000 mulheres, estimadas para o ano de 2006 no Brasil.

Fundação Antonio Prudente
Ana Maria Rodrigues Alves Kuninari
 Coordenadora Pós-Graduação



Fonte: Ministério da Saúde (2005)

Figura 4 – Taxas de mortalidade por câncer de mama por 100 mil mulheres no Brasil, período entre 1979 e 1999 (taxas brutas e ajustadas por idade pelas populações mundial e brasileira).

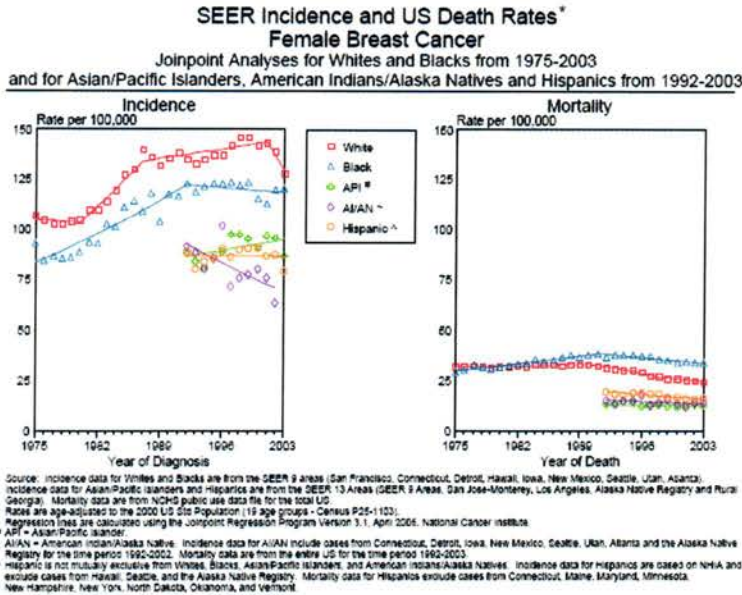


Figure 04

Fonte: National Cancer Institute (2007)

Figura 5 – Taxas de incidência e mortalidade do câncer de mama em mulheres nos Estados Unidos, no período de 1975 a 2003.

O estadiamento clínico é fator primordial na determinação do prognóstico das pacientes (GREENE et al. 2002). Ao comparar as taxas de distribuição de casos segundo o estadiamento ao diagnóstico no Brasil e Estados Unidos, observamos que em nosso meio há maior percentagem de pacientes em estádios avançados, o que reflete a maior atenção à Saúde nos países economicamente mais desenvolvidos.

Tabela 1 – Distribuição dos casos segundo estadiamento clínico ao diagnóstico – EUA – período de 1988 a 2003

| Estádios clínicos | Todas as raças | Branças | Negras |
|-------------------------------|-----------------------|----------------|---------------|
| Doença localizada | 62% | 63% | 52% |
| Doença regional | 30% | 29% | 36% |
| Doença avançada (metastática) | 6% | 5% | 9% |
| Sem estadiamento | 2% | 2% | 4% |

Fonte: Adaptado de National Cancer Institute (2007)

Tabela 2 - Distribuição dos casos segundo estadiamento clínico ao diagnóstico – Brasil – períodos de 1990 a 1994 e de 1995 a 2002.

| Variáveis | Casos de câncer de mama | |
|--|--------------------------------|--------------------------------|
| | Período 1990 a 1994 | Período 1995 a 2002 |
| Total de casos | 7.458 | 43.442 |
| Casos com estágio ignorado, % | 21 | 19,5 |
| Casos com estágio conhecido | 5.891 | 34.988 |
| Estádio I, % mediano | 14,7 | 10,9 |
| Estádio II, % mediano | 32,9 | 42,8 |
| Estádio III, % mediano | 46,8 | 32,6 |
| Estádio IV, % mediano | 3,9 | 12,3 |
| Estádio avançado (III e IV), % mediano | 52,5 | 45,3 |

Fonte: THULER e MENDONÇA (2005)

O carcinoma ductal da mama permanece como um desafio à Oncologia e a todas as especialidades médicas envolvidas com o diagnóstico, tratamento e acompanhamento dessa doença. Apesar do aumento da sobrevivência conseguido através da detecção precoce e da melhor compreensão dos eventos moleculares importantes na patogênese do câncer de mama, ainda há casos de lesões pequenas e sem metástases nodais ao diagnóstico que apresentam evolução desfavorável. Não se conseguiu definir ainda quais os marcadores 'ideais' que possibilitariam a identificação do potencial biológico de agressividade dessas lesões. Tenta-se identificar quais os grupos de fatores preditivos e prognósticos relevantes - moléculas, proteínas e receptores expressos na superfície das células tumorais e nas células estromais adjacentes, que permitam a melhor compreensão das vias intra e intercelulares da biologia tumoral e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos mais específicos e mais eficientes.

Os marcadores bio-moleculares têm importância tanto na avaliação do comportamento biológico quanto na predição de resposta a novos agentes terapêuticos. Muitos deles já estão em fase de avaliação em protocolos clínicos e alguns já são utilizados na prática, com aprovação de órgãos regulamentadores da Saúde de diversos países.

Há disponibilidade de se testar a expressão de vários marcadores através do uso de anticorpos em estudo imunistoquímico em material embocado em parafina. Isto permite sua aplicação em fragmentos obtidos por biópsias por agulha (*core biopsies*), biópsias ou peças cirúrgicas, com

correlação com os aspectos histomorfológicos e clínicos, possibilitando a análise paralela de diversos parâmetros que poderão auxiliar na decisão da conduta cirúrgica e de terapias adjuvantes.

Uma vez que há poucos estudos comparativos desse tipo no Brasil, um de nossos interesses é caracterizar e comparar o comportamento biológico das neoplasias de nossas pacientes em relação ao descrito na literatura mundial. Através do perfil de expressão dos marcadores que serão estudados, tentaremos encontrar novos parâmetros que possam auxiliar na definição ou predição da resposta às condutas terapêuticas, diminuindo-se a morbidade e custos do tratamento.

2.1 CITOESQUELETO E CITOCERATINAS

O citoesqueleto é constituído por 3 grandes famílias de proteínas fibrilares: os microfilamentos, microtúbulos e filamentos intermediários (FI) (MOLL et al. 1982; FUCHS e CLEVELAND 1998; KIRFEL et al. 2003; OMARY et al. 2004).

Os FI são os mais abundantes, têm distribuição citoplasmática e nuclear característica, estrutura primária diferenciada, arquitetura não-polarizada, são relativamente insolúveis e têm uma dinâmica nucleotídeo-independente (OMARY et al. 2004).

O genoma humano contém pelo menos 65 genes funcionais que codificam proteínas dos FI, sendo uma das 100 maiores famílias de genes.

As proteínas dos FI existem apenas nos organismos multicelulares eucarióticos, em contraste aos microtúbulos e microfilamentos, que já são expressos desde os organismos procarióticos.

Os FI são proteínas filamentosas que constituem parte essencial do citoesqueleto e são responsáveis por ordenar topologicamente as células e os tecidos. Estas características resultam de suas propriedades intrínsecas de auto-organização e de resposta aos sinais extrínsecos (KIRFEL et al. 2003).

As CKs representam o grupo mais numeroso dos FI e são diferencialmente expressas nos tecidos epiteliais em pares de proteínas filamentosas do tipo I e II. Sua função primordial é a de intermediar / transferir / sinalizar / atenuar sinais mecânicos para as células. Participam também da dinâmica de resposta celular ao estresse, sinalização celular e apoptose. Essas atividades são resultantes de sua fosforilação e da interação com proteínas associadas.

As proteínas dos FI são reguladas por diversas modificações pós-translacionais, incluindo a farnesilação, fosforilação, glicosilação e transglutaminação, além das referidas ligações com várias proteínas associadas. Essas modificações e associações protéicas são fundamentais para as funções e a dinâmica dos FI. Por exemplo, a fosforilação regula a organização e solubilidade dos FI, sua associação com outras proteínas e sua susceptibilidade à degradação durante a apoptose.

O estudo das funções dos FI é dificultado pela sua baixa solubilidade, pela falta de agentes farmacológicos inibidores específicos, por não estarem

presentes em organismos geneticamente modificáveis tais como os fungos, e pela falta de uma função biológica essencial quando testados em sistemas de cultura de células.

A função melhor compreendida dos FI é a de suporte para a manutenção da estrutura e da integridade das células. Além disso, têm função protetora contra o estresse não-mecânico, diminuem a susceptibilidade à apoptose, além de apresentarem funções tecido-específicas, como a arborização dendrítica no tecido nervoso e o crescimento radial de axônios mielinizados. As doenças relacionadas aos FI resultam geralmente em fragilidade dos epitélios, pele, córnea, músculos e em algumas laminopatias. (COULOMBE e OMARY 2002)

Os genes que codificam os FI têm expressão seletiva em determinados tipos celulares e restrita a fases específicas do desenvolvimento e diferenciação celular e tecidual (HESSE et al. 2001). Em decorrência da expressão tecido-específica, os FI podem servir como marcadores de origem tecidual em tumores pouco diferenciados – por exemplo, as CKs definem os tecidos epiteliais, enquanto a vimentina é marcadora de origem mesenquimal; ser utilizados como marcadores tumorais no soro; e auxiliar na detecção de micrometástases. (COULOMBE e OMARY 2002).

Mutações nos genes dos FI podem ter uma grande gama de efeitos na formação e organização dos polímeros dos FI, com espectro variável na severidade das doenças e conseqüências delas resultantes. A perda da integridade celular ou nuclear após exposição a traumas variados é a marca

registrada das desordens relacionadas aos FI, sendo a fragilidade celular o principal mecanismo de patogênese. As mutações podem também perturbar as interações entre os FI e as organelas e grânulos celulares, ocasionar acúmulo de FI alterados citoplasmáticos, bem como levar a direcionamentos intracitoplasmáticos errôneos de proteínas, acarretando alterações na função e metabolismo celular e maior susceptibilidade à apoptose (COULOMBE e OMARY 2002).

A maioria das CKs foi identificada através de métodos imunológicos e de clonagem de cDNA. As CKs são codificadas por genes de cópias simples. Os genes que codificam as CKs tipo I, exceto a CK18, estão 'clusterizados' no cromossomo 17q21, e os genes das CKs tipo II no cromossomo 12q13 (KIRFEL et al. 2003).

Os bancos de dados do genoma humano revelam a presença de 208 seqüências relacionadas às CKs e pelo menos 65 genes que as codificam. Destes, 22 são expressos em vários epitélios, 15 são específicos para os pêlos e cabelos (tricocito-específicos) e 5 representam as CKs da bainha interna pilosa (KIRFEL et al. 2003).

As mutações das ceratinas epidérmicas interferem claramente em sua função mecânica, enquanto as mutações das ceratinas dos epitélios simples podem alterar e modular a resposta das células afetadas aos estímulos externos.

Estudos recentes demonstraram que CK8 e CK18 inibem a apoptose através da modulação da resposta ao TNF (CAULIN et al. 2000). As células epiteliais que não expressam CK8 e CK18 são significativamente mais

sensíveis à apoptose mediada por TNF, havendo uma interação entre o receptor de tipo 2 do TNF (TNFR2) e as CKs. Esses achados foram acompanhados por um aumento da ativação de JNK e NF- κ B, ambos alvos subseqüentes da via de sinalização do TNF (SANTOS et al. 2003).

Alguns autores demonstraram que TRADD (TNFR1-associated death domain protein) liga-se à CK18 e CK14. A ligação das ceratinas à TRADD compromete sua interação com TNFR1 e a ativação da apoptose via caspase 8, tornando as células CK18 e 14 positivas mais resistentes à apoptose (INADA et al. 2001; MUROTA et al. 2003; LAU e CHIU 2007).

Analisados em conjunto, esses dados sugerem que a interação das ceratinas com receptores e o seqüestro das moléculas adaptadoras correspondentes podem representar mecanismos através dos quais elas interferem e afetam as vias de sinalização celular, agindo como “mecanotransdutores”.

O estudo das mutações dos genes relacionados às ceratinas tem auxiliado muito na compreensão dos mecanismos através dos quais elas podem interferir no ciclo celular.

CK1 e CK10 são as ceratinas mais expressas nos camadas em diferenciação da epiderme, representando cerca de 60% de seu conteúdo protéico. Em animais adultos, a falta de expressão da CK10 leva a um fenótipo caracterizado por um aumento de 5 vezes na proliferação de células basais epiteliais, indução da CK6 e CK16 e discreta hiperqueratose (PARAMIO et al.1999; SANTOS et al. 2002). Notou-se também a indução de ciclina-D1 e c-Myc nas células basais e em parte das células supra-basais,

além da indução da proteína reguladora do ciclo celular 14-3-3 σ em ceratinócitos pós-mitóticos (PARAMIO et al. 1999).

Alterações semelhantes foram observadas em ratos transgênicos, com expressão aumentada de c-Myc na camada basal da epiderme.

Alguns autores evidenciaram que o domínio caudal de CK10 inibe a proliferação dos ceratinócitos, e que o domínio 'head' seqüestra Akt e PKC ζ quinases atípicas, agindo como um regulador negativo (inibidor) do ciclo celular epidérmico (PARAMIO e JORCANO 2002). A interação de CK10 com essas duas quinases inibiria sua translocação até a membrana citoplasmática, que é um passo necessário para a ativação da via da PI-3K, e resulta numa diminuição da atividade mitótica das células que expressam CK10 (PARAMIO et al. 2001a).

CK4 e CK13 constituem os FI das células supra-basais dos epitélios estratificados não-ceratinizados, como no esôfago. A falta de CK4 é acompanhada de hiperplasia de células basais e degenerações celulares no esôfago e em outros tecidos, porém sua arquitetura geral se mantém intacta. Parece haver uma indução compensatória de CK6 na ausência de CK4 (PARAMIO e JORCANO 2002).

A fosforilação é um processo dinâmico envolvido na regulação da solubilidade das ceratinas, na organização e função de seus filamentos (PARAMIO 1999). A fosforilação da CK18 no sítio S33 permite a ligação das proteínas 14-3-3 σ , relacionadas à sua organização e distribuição sub-celular. A mutação deste sítio de fosforilação predispõe à hepatotoxicidade e a

alterações na distribuição dos FI em células acinares pancreáticas em ratos transgênicos (ZATLOUKAL et al. 2000).

As ceratinas podem agir como adaptadores ou vias de canalização ou transporte intracelular para aproximar ou afastar moléculas, deslocando proteínas e podendo alterar o controle do ciclo celular.

A ausência de CK8 e CK18 em ratos 'knockout' leva ao deslocamento da proteína 14-3-3 σ do citoplasma para o núcleo, alterando a arquitetura hepática e provocando o aparecimento de hepatócitos gigantes multinucleados. A proteína 14-3-3 σ influencia a atividade da fosfatase reguladora do ciclo celular cdc25, provocando uma parada em S/G2 (ZATLOUKAL et al. 2000).

A hiperfosforilação das ceratinas ocorre também como resposta a injúrias celulares variadas, com participação das quinases p38 e Jun (JNK), levando à reorganização dos filamentos protéicos (COULOMBE e OMARY 2002).

A hiperfosforilação das ceratinas protege as células epiteliais dos mecanismos apoptóticos. A reciclagem (turnover) das ceratinas e proteases envolvidas em sua degradação são pouco conhecidas, e envolvem pelo menos duas vias bioquímicas: o sistema ubiquitina-proteassomos e as caspases. A ubiquitinação das ceratinas ocorre como parte de seu sistema de renovação e é inibida pela hiperfosforilação das mesmas (COULOMBE e OMARY 2002).

As rápidas alterações na expressão das ceratinas nos processos de cicatrização e metástases, que repetem parcialmente os mecanismos do

desenvolvimento epitelial embrionário e fetal, evidenciam a necessidade de estudos sobre o papel crucial que desempenham nas vias de controle e regulação celular. Se considerarmos que a forma e as diferentes propriedades das células e tecidos são resultado de uma rede de interações protéicas, é provável que as ceratinas, capazes de se auto-organizar e de interagir com outras proteínas, sejam parte primordial das vias de sinalização intra e extracelulares.

2.2 MARCADORES MOLECULARES RELACIONADOS À EVOLUÇÃO CLÍNICA

O desenvolvimento de uma massa tumoral depende da ativação de receptores de fatores de crescimento, receptores hormonais, de proliferação vascular, de degradação e de remodelagem da matriz extracelular, processos envolvidos na proliferação celular, invasão de tecidos e estruturas vizinhas e no processo de metastatização. A ativação anômala, a expressão aumentada ou a inibição de alguns desses receptores está associada à pior evolução clínica dos pacientes com câncer.

Muitos dos novos alvos terapêuticos podem ser pesquisados no tecido tumoral através do exame imunoistoquímico, o que facilita muito a manipulação das amostras, pois a fixação pode ser a habitual (formol), sem inviabilizar o exame anatomopatológico, que fornece as informações mais relevantes para o estadiamento tumoral. Atualmente, algumas dessas substâncias já passaram para o uso clínico, como por exemplo, os

anticorpos monoclonais contra os receptores tirosino-quinase (RTK), dentre os quais a herceptina – que se liga ao receptor do fator de crescimento c-erbB-2 / HER-2 neu. A amplificação do oncogene HER-2 resulta na expressão excessiva da proteína por ele codificada na superfície das células neoplásicas. Na história do tratamento do câncer de mama o anticorpo humanizado anti-c-erbB-2 foi a primeira opção terapêutica baseada na utilização de drogas dirigidas às células-alvo identificadas por um marcador, poupando as células normais (ou negativas).

2.2.1 Proto-oncogene c-erbB-2/HER-2 neu (HER2)

Localizado no braço longo do cromossomo 17 (Chr 17q21), o proto-oncogene c-erbB-2/HER-2 neu codifica um receptor glicoprotéico transmembranar de fator de crescimento epitelial com atividade tirosino-quinase (SLAMON et al. 1987; ROSS et al. 2004). Esse receptor é uma glicoproteína de 185 kD (p185HER2) pertencente à família dos receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR – epidermal growth factor receptors). Aproximadamente 15 a 20% dos carcinomas mamários apresentam amplificação do gene HER2neu (SLAMON et al. 1987; OWENS et al. 2004; YAZIJI et al. 2004). A expressão aumentada nas pacientes com carcinomas linfonodo-negativos está correlacionada com pior prognóstico, negatividade para os receptores de estrógeno e progesterona e menor resposta à quimio e hormonioterapia (YAMAUCHI et al. 2001a e b).

Sob condições normais, as 2 cópias do gene HER-2 em uma determinada célula produzem uma pequena quantidade do receptor protéico

na superfície celular, designado de p185HER2 (utilizaremos o termo HER2 neste texto). Esse receptor protéico desempenha importante papel na transmissão dos sinais do meio extracelular para o núcleo da célula, exercendo controle sobre a divisão e crescimento da célula normal. Quando o gene HER-2 está amplificado, há aumento do número de receptores na superfície celular, definido como “expressão excessiva do HER-2” (‘HER-2 overexpression’) (SLAMON et al. 1987). Como o receptor está intimamente envolvido com a transmissão de sinais relacionados à proliferação celular, a divisão celular é estimulada, resultando em um crescimento celular acelerado, que contribui para o desenvolvimento e progressão do câncer.

A partir da utilização de linhagens celulares nas quais o número de receptores de HER2 na superfície é conhecido, estabeleceu-se um método imunoistoquímico padronizado e um sistema de classificação dos resultados através de escores. Células com menos de 20,000 receptores não apresentariam marcação (escore 0); células com cerca de 100,000 receptores mostrariam marcação parcial do contorno da membrana em menos de 10% das células tumorais (escore 1+); células contendo cerca de 500,000 receptores poderiam mostrar marcação completa de membrana com intensidade leve a moderada em mais de 10% das células neoplásicas (escore 2+); e células apresentando cerca de 2,300,000 receptores de superfície mostram marcação completa e de forte intensidade da membrana, em mais de 10% das células neoplásicas (escore 3+). A padronização da fixação dos espécimes, o processamento com controle de temperatura dos reagentes, e o rigoroso controle técnico da reação imunoistoquímica

mostraram que há excelente correlação do número de cópias de genes com o nível de expressão protéica (SCHNITT e JACOBS 2001; HAYES e THOR 2002; MASOOD e BUI 2002; NAVOLANIC et al. 2003).

A partir desses conhecimentos, foi desenvolvido um anticorpo monoclonal humanizado recombinante (rhuMab 4D5, trastuzumab, HERCEPTIN®) que apresenta alta afinidade para p185HER2 e inibe o crescimento de células do câncer de mama que têm expressão aumentada de HER2. Esse anticorpo é dirigido contra o domínio extracelular da proteína. Ensaios clínicos bem controlados demonstraram inicialmente a atividade do trastuzumab em casos de câncer de mama avançados (linfonodos axilares positivos), com expressão aumentada de HER2, constituindo-se em evidência clínica pioneira da utilização de anticorpos dirigidos contra receptores de fator de crescimento para o tratamento do câncer de mama em humanos (SLAMON et al. 2001). Posteriormente, com a ampliação dos ensaios clínicos e a utilização do trastuzumab em pacientes com estádios clínicos precoces, comprovou-se significativa redução do risco de óbitos e aumento da sobrevida livre de doença também nesse grupo de pacientes (COBLEIGH et al. 1999; SLAMON et al. 2001; VOGEL et al. 2002; ROSS et al. 2004; GOLDHIRSCH et al. 2005; ROBERT et al. 2005; JOENSUU et al. 2006).

Os métodos disponíveis na prática clínica para a detecção da expressão excessiva de HER-2 estão relacionados à amplificação do gene e à expressão excessiva de seu produto protéico, a proteína p185HER2.

Para a detecção da amplificação do gene propriamente dita há dois métodos: FISH (*Fluorescent in situ hybridization*) e CISH (*Chromogenic in situ hybridization*). Seu princípio consiste na visualização "in situ" da amplificação do gene através de sua identificação com sondas de DNA complementares marcadas com fluorocromo ou cromógeno. Esses métodos demonstram o número aumentado de cópias do gene, em relação às 2 cópias encontradas na célula normal (O'GRADY et al. 2003).

A identificação do produto do gene, a proteína HER2, através da técnica imunoistoquímica (IIQ), utiliza um anticorpo policlonal obtido em coelhos imunizados com a oncoproteína humana sintética. O anticorpo apresenta alta afinidade pelo domínio extracelular da proteína HER2. A expressão excessiva deste produto é então demonstrada na membrana celular das células tumorais em preparados histológicos do tumor.

Em uma segunda etapa da reação, liga-se ao anticorpo primário um anticorpo secundário ligado a uma enzima e um polímero de amplificação dos sinais da reação que aumenta a sensibilidade do método.

A reação produz um precipitado de coloração marrom de padrão membranoso, sendo a reação semiquantificada visualmente ao microscópio óptico comum, divididos em grupos: negativo (escores 0 e 1+), duvidoso (2+) e positivo (3+).

Somente as pacientes com escore 3+ no exame IIQ são qualificadas para o tratamento com trastuzumab. Àquelas com escore 2+ são submetidas à pesquisa de amplificação do gene através de FISH e, se for confirmada a amplificação, passam a ser elegíveis ao tratamento.

Mais uma vez ressalta-se a importância da padronização das reações técnicas a fim de aumentar a reprodutibilidade e confiabilidade dos resultados. A participação em programas internacionais de acreditação é recomendada como parte fundamental do controle de qualidade dos laboratórios que realizam esses exames (GULLMAN et al. 2004; KAY et al. 2004; GOUVEA et al. 2006; WOLFF et al. 2007 a e b). Cabe ressaltar, mais uma vez, a importância fundamental da fixação, processamento e padronização das reações, da parte técnica e da interpretação dos resultados para a melhor correlação com o significado biológico e resposta à terapêutica (JORGENSEN et al. 2007)

Os agentes que têm como alvo do tratamento a proteína HER2 apresentam eficácia comprovada tanto nos casos de doença metastática quanto inicial, com aumento das taxas de resposta à quimioterapia, aumento do tempo de progressão da doença e sobrevida (COBLEIGH et al. 1999; SLAMON et al. 2001; VOGEL et al. 2002; ROSS et al. 2004; GOLDBIRSCHE et al. 2005; ROBERT et al. 2005; JOENSUU et al. 2006).

Cinco estudos internacionais randomizados prospectivos demonstraram que o uso do trastuzumab adjuvante reduz o risco de recorrências e de mortalidade em metade e um terço, respectivamente, em pacientes com câncer de mama em estádios precoces (PICCART-GEBHART et al. 2005; ROMOND et al. 2005; SLAMON et al. 2005; JOENSUU et al. 2006; OZOLS et al. 2007).

Mais recentemente resultados sugeriram que uma pequena molécula com atividade inibidora de tirosino-quinase anti-HER1 e HER2, lapatinib

(Tykerb, GlaxoSmithKline, Philadelphia, PA), melhora a evolução clínica de pacientes com doença avançada quando adicionada aos esquemas com capecitabina (GEYER et al. 2006). O guia americano de orientação ao tratamento do câncer de mama da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (*American Society of Clinical Oncology* - ASCO) tem indicado o teste de identificação da amplificação de HER2 para todos os novos casos de câncer desde 2001 (BAST et al. 2001). A estratégia de detecção da amplificação que parece ter a melhor relação custo-benefício é fazer a pesquisa inicial com o exame imunoistoquímico, com confirmação através de FISH para os casos que tenham escores 2+ ou 3+ (DENDUKURI et al. 2007)

A expressão da proteína se preserva no tecido incluído em parafina, tendo sido obtidos resultados fidedignos em material arquivado por até 10 a 15 anos (FERGENBAUM et al. 2004). Este fator assume relevância na medida em que permite a análise retrospectiva de casos submetidos a tratamento com resposta desfavorável aos esquemas terapêuticos convencionais, e nos quais se considere o trastuzumab como opção terapêutica adicional.

2.2.2 EGFR

A família dos receptores de fatores de crescimento tem atraído a atenção de muitos pesquisadores há alguns anos, especialmente após o desenvolvimento de terapias utilizando anticorpos monoclonais humanizados.

O gene EGFR está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p11.2-p2) e codifica uma proteína transmembrana de 170 kD (HYNES e LANE 2005).

Os quatro membros da família desses receptores são o EGFR (HER1/c-erbB-1), HER2/neu (c-erbB-2), HER3 (c-erbB-3) e HER4 (c-erbB-4), caracterizados por um sítio de ligação extra-celular, uma região transmembrana e um domínio tirosino-quinase citoplasmático (HYNES e LANE 2005).

A amplificação do gene EGFR tem sido descrita em vários tumores, inclusive no câncer de mama (AL-KURAYA et al. 2004; BHARGAVA et al. 2005; CORZO et al. 2005; REIS-FILHO et al. 2005).

A ativação do EGFR é decorrente da ligação de fatores relacionados ao EGF (*epidermal growth factor*), tais como TGF α , anfiregulina e o próprio EGF, que induzem a homo ou heterodimerização do receptor e a estimulação de vias tirosino-quinase intrínsecas (SCHLESSINGER 2000). Esse estímulo leva à auto-fosforilação dos resíduos de tirosina no domínio citoplasmático do receptor, criando sítios de ligação para proteínas adaptadoras e enzimas das cascatas da MAPK e PI-3K, ligadas à proliferação celular, angiogênese, invasão, metástases e inibição da apoptose (SALOMON et al. 1995; HUTCHESON et al. 2006)

2.2.3 Receptores de estrógeno (ER) e progesterona (PR)

Observações epidemiológicas ressaltaram os efeitos da exposição prolongada ao estrógeno e sua associação com maior risco de desenvolvimento do câncer de mama. Contrariamente, a menarca mais tardia, ciclos anovulatórios, menopausa cirúrgica mostraram ter efeito protetor. Essas observações foram a base do desenvolvimento das terapias hormonais (OSBORNE 1998a; HORTOBAGYI 2004). A descoberta da ativação de vias de sinalização a partir da ligação do estradiol aos receptores proporcionou a criação dos moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMs), sendo o tamoxifeno um dos principais representantes até há poucos anos.

A pesquisa dos receptores hormonais através da imunistoquímica tem sido o método mais utilizado na prática clínica, devido a algumas vantagens em relação às dosagens laboratoriais em macerados de tecido tumoral. (PCR quantitativo, amplificação por Southern blotting, ELISA) (HARVEY et al. 1999). Dentre elas, as principais são a possibilidade de ser realizada nos cortes de material parafinado, sem prejuízo do exame anatomopatológico, a identificação precisa da expressão em células tumorais e não em células epiteliais normais entremeadas ao tumor, além de uso em estudos retrospectivos em material arquivado (GOLOUH et al. 1997; MONTORO et al. 1997; BIESTERFELD et al. 1998; STIERER et al. 1998).

Há uma ampla variação dos resultados da expressão dos receptores hormonais no tecido tumoral dos diversos estudos realizados, muito provavelmente em decorrência das metodologias empregadas, uso de

diferentes anticorpos, métodos de recuperação antigênica e critérios de análise dos resultados (YAMASHITA et al. 2006; DUNNWALD et al. 2007; OYAMA et al. 2007). O status dos receptores hormonais tem valor prognóstico no intervalo livre de doença, no intervalo livre de metástases e sobrevida geral (KINSEL et al. 1989; REINER et al. 1990; ALLRED et al. 1998). A sobrevida geral das pacientes após uma primeira metástase também é significativamente maior nos tumores ER+ em relação aos tumores ER- (YAMASHITA et al. 2006).

As terapias hormonais contribuem significativamente para o aumento do período de sobrevida livre de doença, porém somente 50% das pacientes têm benefício com seu uso. Daí a necessidade de ter marcadores preditivos com maior poder discriminador das prováveis respostas à terapia hormonal (Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group-EORTC 1998; OSBORNE 1998b).

O valor preditivo do status dos ER no tumor primário decresce aproximadamente 20% ao ano, perdendo seu significado clínico após 8 anos de seguimento. Quando comparado ao TNM e grau histológico, o status hormonal tem valor prognóstico baixo, sendo que o maior interesse permanece como auxiliar na decisão da conduta terapêutica adjuvante (BARDOU et al. 2003).

Com a técnica dos TMA, acrescenta-se a vantagem da padronização das condições de reação em grande número de casos, permitindo a comparação mais fidedigna dos níveis de expressão.

Não há consenso quanto à definição da positividade dos receptores hormonais. Alguns autores propuseram formas de quantificação do número e / ou intensidade de células marcadas (KINSEL et al. 1989; REINER et al. 1990; ALLRED et al. 1998; LEE S et al. 2006). Na prática clínica, entretanto, observa-se grande uso da estimativa percentual, com valores de corte que variam de 1% a 10% de células marcadas, que mostram boa correlação com os esquemas de graduação que avaliam simultaneamente a intensidade e o número de células marcadas (GOBBI et al. 2000; YAMASHITA et al. 2006). No trabalho de OYAMA et.al. (2007), ao comparar os métodos de avaliação da expressão dos receptores hormonais de forma quantitativa (percentual) e a mista (análise de intensidade e percentual de células marcadas), verificou-se que a avaliação percentual obteve melhor consistência de resultados.

Há variações no padrão de expressão dos receptores hormonais, observando-se tumores positivos para ambos os receptores (ER+/PR+), positivos para apenas um dos receptores (ER+/PR- ou ER-/PR+), e negativos para ambos os receptores (ER-/PR-), com diferenças na mortalidade de cada grupo (DUNNWARD et al. 2007). As pacientes com ambos receptores negativos apresentam poucos benefícios clínicos quando submetidas a hormonioterapia, principalmente num cenário de adjuvância. Num dos estudos (BARDOU et al. 2003), as pacientes que apresentaram positividade para RE e negatividade para PR tiveram benefícios reduzidos com o uso de tamoxifeno adjuvante. Outros autores (DOWSETT et al. 2001) mostraram maior expressão de HER2 nesse grupo de tumores (ER+/PR-) comparativamente aos tumores positivos para ambos os receptores

(RE+/PR+), sugerindo maior benefício com terapias de privação estrogênica em relação ao tamoxifeno. A pior resposta ao tamoxifeno provavelmente é decorrente de redução de suas atividades antagônicas secundária à ativação da cascata de sinalização desencadeada pelo fator de crescimento epitelial HER2 (OSBORNE et al. 2003, 2005).

Nos casos de negatividade para ambos os receptores, há necessidade de se utilizar marcadores adicionais na tentativa de identificar os eventuais subgrupos de maior ou menor risco e prognóstico. Num dos trabalhos da literatura (NAGAHATA et al. 2004) usou-se a técnica de cDNA microarrays e identificou-se um grupo de 71 genes com expressão aumentada nas pacientes com pior evolução clínica (óbito em 5 anos após a cirurgia), propondo um sistema de classificação de risco baseado na expressão gênica aberrante.

Com o desenvolvimento de resistência primária e secundária ao tratamento hormonal, foram criadas novas substâncias e novos esquemas de associação com inibidores dos receptores de fatores de crescimento, potencializando o efeito das drogas e recuperando a capacidade de resposta à quimioterapia.

Algumas dessas substâncias são os inibidores das aromatases (anastrozol, letrozol), fulvestranto (antagonista dos receptores de estrógeno e progesterona), pan-inibidores de EGFR (GW572016), inibidores da mTOR (mammalian target of rapamicin – RAD001, CCI-779), a anti-HER2 (trastuzumab) e os taxanos (paclitaxel, docetaxel) (MUNSTER e NORTON 2001).

2.2.4 Proteína p53

A família gênica p53 consiste em 3 genes: P53, P63 e P73, e tem funções importantes nos processos celulares de síntese e reparo do DNA, controle e parada do ciclo celular, apoptose, estabilidade genômica, angiogênese, desenvolvimento e maturação epitelial e tecidual. Sua inativação ou expressão aberrante podem determinar progressão tumoral ou defeitos no processo de desenvolvimento. A descoberta de várias isoformas protéicas com atividades antagônicas, produzidas através da expressão de diferentes regiões promotoras e por “splicing” alternativo ampliou a complexidade dos cenários da rede transcricional dos membros da família p53 (SBISÀ et al. 2007).

A maior parte das mutações do gene P53 são mutações *missense* (~85%), que acarretam a estabilização da proteína p53 e, conseqüentemente possibilitam sua detecção através da imunoistoquímica, método mais utilizado na prática e pesquisa (BRAMBILLA et al. 1993). Assume-se que quando há pelo menos 20% de núcleos de células neoplásicas marcados pela IIQ há correlação de cerca de 90% com a presença da mutação *missense* do gene P53 (NISHIO et al. 1996).

A proteína mutante p53 é o defeito genético mais comum nos cânceres humanos, presente em cerca de 20% dos casos esporádicos, 50% das síndromes familiares e em 100% dos casos da síndrome de Li-Fraumeni (MUNSTER e NORTON 2001). Está associada à negatividade para os receptores hormonais e a maior proliferação celular, conferindo maior resistência das células neoplásicas a estímulos apoptóticos (por exemplo,

radio e quimioterapia) (MEGHA et al. 2002; ROLLAND et al. 2007). A transativação gênica da p53 confere-lhe a capacidade de induzir a apoptose e a prevenção da instabilidade genética, induzindo a parada do ciclo celular, resultando num papel protetor contra a tumorigênese (LIU et al. 2004).

2.2.5 Proteína p63

A proteína p63 é um homólogo da p53, com funções primárias na diferenciação ectodérmica durante o desenvolvimento embrionário e na manutenção das células de reserva (progenitoras) nos epitélios estratificados (WESTFALL e PIENTENPOL 2004). Observa-se aumento de expressão da p63 em diversos carcinomas, o que sugere que tenha função de oncogene, com mecanismos de ação pouco conhecidos.

A p63 está imunolocalizada nas camadas basais dos tecidos epiteliais estratificados, tais como a epiderme, mucosa oral e cervical, epitélio transicional e glândulas complexas, incluindo a próstata, mama, glândulas salivares e lacrimais, onde estão dispostas as células com alta capacidade proliferativa (BARBIERI e PIENTENPOL 2006).

O gene p63 humano está localizado no cromossomo 3q27-29, com 15 exons (cerca de 220 kB) e introns com cerca de 100 kB de extensão (BARBIERI e PIENTENPOL 2006).

O gene p63 codifica um domínio de trans-ativação N-terminal, um domínio central de ligação ao DNA e um domínio de carboxi-oligomerização. A p63 pode ser expressa a partir de duas regiões promotoras, uma imediatamente precedente ao primeiro exon e a segunda localizada no

terceiro intron. A transcrição a partir da primeira ou segunda região promotora dá origem a transcritos TA- e Δ N-p63, respectivamente com e sem o domínio N-terminal de trans-ativação, com atividades dominantes negativas, que podem exercer papel oncogênico (Δ N-p63) ou atividades reguladoras em vias envolvidas no desenvolvimento tecidual, diferenciação, proliferação e resposta a danos celulares, de forma semelhante à p53 selvagem (TAp63) (MOLL e SLADE 2004). O gene pode ter 'splicing' alternativo e gerar proteínas com C-terminais diferentes (α , β e γ), gerando grande número de variantes, conferindo à p63 grande plasticidade e complexidade funcional.

As proteínas p63 α (TA- e Δ Np63) apresentam uma região conhecida como "Sterile alpha motif", ou domínio SAM, com função de interação proteína-proteína, envolvida nos processos de desenvolvimento tecidual, apoptose, transativação transcripcional, adesão focal, remodelamento cromatínico e sinalização dos receptores tirosino-quinase (GRESSNER et al. 2005).

A proteína TAp63 induz a apoptose de forma semelhante à p53, através dos receptores de morte celular e das vias apoptóticas mitocondriais (GRESSNER et al. 2005). Em contraste, a proteína Δ Np63 α tem expressão aumentada em vários carcinomas por amplificação gênica; tem atividades de bloqueio da apoptose, inibição da transcrição do gene pró-apoptótico IGFBP-3 (insulin-like growth factor binding protein-3) e sua expressão pode ser regulada pela via da PIK3, uma potente inibidora da apoptose (BARBIERI et al. 2003).

O gene que codifica as diferentes isoformas da proteína p63 tem, dessa forma, atividade dualística e antagonista. A proteína $\Delta Np63\alpha$ promove passos iniciais da tumorigênese protegendo as células da apoptose e evitando a parada do ciclo celular e, ao mesmo tempo, a proteína TAp63 tem ação supressora de metástases por manter as características epiteliais das células neoplásicas e das células basais do epitélio.

Há evidências de que a p63 controle uma via p73-dependente de sensibilidade específica à cisplatina em carcinomas mamários 'triplo-negativos' (receptores hormonais negativos, sem amplificação de HER2), sendo que parte significativa desses são 'basalóides' (por terem expressão de citoceratinas basais), que também apresentam inativação mutacional da p53 (LEONG et al. 2007), permitindo o planejamento terapêutico mais específico e eficiente para as pacientes desse grupo de tumores.

2.2.6 Ki-67

A proteína nuclear e nucleolar humana Ki-67 é expressa durante a proliferação de células somáticas nas fases G1, S, G2 e mitose, mas não na fase G0, tampouco em células quiescentes (GERDES et al. 1991; ENDL e GERDES 2000). KREITZ et al. (2000) demonstraram que a proteína Ki-67 é um constituinte da cromatina, localizada em regiões densamente compactas, provavelmente na heterocromatina, porém sua exata função nos processos de proliferação celular ainda não foi estabelecida.

O uso desse marcador permite uma determinação rápida e exata da fração proliferativa de uma determinada população celular,

independentemente de sua natureza benigna ou maligna. Inúmeros trabalhos de literatura demonstraram correlação altamente significativa entre os valores médios da fração proliferativa de tumores determinada pelo Ki-67 e o grau de malignidade observado no exame histológico, fornecendo dados importantes na estimativa do prognóstico e definição da estratégia terapêutica (GERDES et al. 1991).

Os valores de corte para a determinação das frações proliferativas consideradas como baixa, moderada e alta é bastante variável, mesmo dentro de um mesmo grupo de tumores, e há discrepâncias significativas nos valores referidos em diversas publicações (TAN et al. 2005; JOHANNESSEN e TORP 2006; LEE et al. 2007; ZAGOURI et al. 2007).

A atividade proliferativa das células tumorais avaliada através da expressão imunoistoquímica do Ki-67 é um dos diversos indicadores prognósticos nos carcinomas da mama (BIRNER et al. 2001). Os índices comparativos de sua expressão nos tumores primários e nas metástases mostraram valor prognóstico independente em análise multivariada, com evolução clínica mais desfavorável quando o índice foi mais alto nas metástases em relação ao tumor primário (PARK et al. 2007).

A imunoexpressão do Ki-67 tem sido utilizada também como marcador prognóstico de melhor sobrevida e resposta após tratamento quimioterápico, em associação com a expressão de receptores hormonais (LEE et al. 2007).

2.2.7 Ezrina

A ezrina é membro da família 'Ezrin, Radixin e Moesin' (ERM), uma proteína de ligação que participa da interação de proteínas do citoesqueleto com receptores de superfície e moléculas de adesão (ELLIOT et al. 2005). Sua atividade é regulada por interações intramoleculares nos domínios N- e C-terminal de associação das ERM, sendo a fosforilação da treonina 567 um regulador crítico de sua ligação entre moléculas-alvo e o citoesqueleto de actina (PEARSON et al. 2000; NGUYEN et al. 2001). Sua fosforilação também pode ser induzida por estímulos de EGF (*epidermal growth factor*), PDGF (*platelet derived growth factor*) e HGF (*hepatocyte growth factor*), com formação de prolongamentos celulares e microvilos, aumento da mobilidade celular e maior capacidade de invasão do estroma, além de evitar a "anoikis", apoptose por perda de adesão celular (FRISCH e FRANCIS 1994; AMICONE et al. 1997; CREPALDI et al. 1997). A ezrina está envolvida nas vias de transdução e sinalização tirosino-quinase-dependentes, interagindo com a PI3-K proteino-quinase e Rho (KRIEG e HUNTER 1992; TSUKITA e YONEMURA 1999; GAUTREAU et al. 1999; GAUTREAU et al. 2000; BRETSCHER et al. 2000, BRETSCHER et al. 2002).

Suas interações entre a membrana celular e os componentes do citoesqueleto sugerem participação ativa nos mecanismos de adaptação e sinalização extra-intracelular, adesão, mobilidade e sobrevivência celular, e têm sido demonstrada correlação de sua expressão com os receptores hormonais, estadiamento tumoral e desenvolvimento de metástases no

câncer de mama (McGOWAN et al. 2003; ELLIOT et al. 2005; SARRIO et al. 2006; SONG et al. 2007; BRUCE et al. 2007).

2.2.8 Psoriasina

Através de estudos com bibliotecas de SAGE foram identificados transcritos altamente expressos nas células epiteliais de carcinomas ductais in situ (*HID-genes – High in DCIS*) e no epitélio mamário normal (*HIN-genes – High in normal*). Um dos transcritos mais abundantes foi o HID-5, com 467 tags em 41,000 nos carcinomas ductais in situ de alto grau negativos para ER (receptores de estrógeno), o que pode indicar seu envolvimento no processo de carcinogênese. HID-5 corresponde à proteína S100A7, também chamada de psoriasina, uma pequena proteína citoplasmática ligada ao cálcio, com função pouco conhecida, também detectada no meio extracelular. O gene que a codifica está localizado no cromossomo 1q, uma região que freqüentemente apresenta desbalanço alélico nos carcinomas mamários. Alterações na expressão dos membros da família S100 têm sido observadas na progressão do câncer de mama (WATSON et al. 1998; LIU et al. 2000; MAZZUCHELLI 2002; ALOWAMI et al. 2003). A expressão persistente de psoriasina no câncer de mama está associada com a negatividade de expressão dos receptores hormonais e outros marcadores de pior prognóstico (AL-HADDAD et al. 1999). A psoriasina é também altamente expressa em processos hiperproliferativos cutâneos, quadros psoriasiformes, carcinomas escamosos de bexiga e laringe, onde se observa com freqüência proliferação celular aberrante, alterações na apoptose e

diferenciação epitelial. A expressão aumentada de psoriasina nessas condições sugere um papel potencial em sua gênese (EMBERLEY et al. 2003; KROP et al. 2005).

Os valores de categorização da imunoexpressão da psoriasina descritos nos diversos trabalhos da literatura variam, porém na maioria deles qualquer nível de marcação é considerado como positivo, em geral estratificando-se os grupos de acordo com a percentagem de células marcadas, correlacionada em alguns trabalhos com a intensidade de marcação (AL-HADDAD et al. 1999; EMBERLEY et al. 2003, 2004).

Demonstrou-se que a expressão aumentada da psoriasina sensibiliza as células neoplásicas ao etoposídeo, e que a regulação negativa da expressão de psoriasina é dependente da expressão do BRCA-1 e da expressão funcional do c-Myc, num mecanismo transcricional recentemente descrito, que contribui para a resistência mediada pelo BRCA-1 a esse agente terapêutico (KENNEDY et al. 2005).

Interações da psoriasina com os receptores beta de estrógeno e com a expressão de genes que modulam a resposta imune podem auxiliar tanto no planejamento quanto na predição de resposta às terapêuticas anti-hormonal e imunomoduladora (MANDAL et al. 2007; SKLIRIS et al. 2007).

2.3 TISSUE MICROARRAYS (TMA)

Os estudos de expressão gênica têm indicado inúmeros genes candidatos a apresentar maior interferência no controle e sinalização das vias do metabolismo e ciclo celular. Um dos maiores desafios é 'traduzir' para a prática clínica quais desses genes, isoladamente ou em grupos, podem ter relevância como fatores prognósticos ou preditivos.

Uma das formas de facilitar essa investigação é a realização de reações imunoistoquímicas em bancos de casos de com seguimento clínico e evolução conhecida. A técnica de *tissue microarrays* (TMA) trouxe inúmeras vantagens e facilidades para esse tipo de pesquisas, possibilitando o rastreamento e cruzamento rápido de grande número de dados com as informações dos pacientes e as características morfológicas dos tumores.

A técnica dos TMA, utilizada na análise de nossa amostra, será descrita a seguir.

2.3.1 Histórico dos TMA

A história dos *tissue microarrays* começa quando BATTIFORA, em 1986, desenvolveu uma técnica que chamou de *multi-tissue blocks* ou *tissue sausage blocks*, na qual algumas dezenas de diferentes tecidos eram dispostas de modo aleatório e não ordenado em blocos de parafina receptores, usados para teste de novos anticorpos e como controle de qualidade de reações imunoistoquímicas.

Em 1998, KONONEN et al. publicaram o trabalho onde descreviam um aprimoramento da idéia inicial dos *tissue sausage blocks*. As diferentes amostras de tecido eram dispostas nos blocos receptores de forma ordenada, com coordenadas pré-estabelecidas, referidas como *tissue microarray* (TMA), utilizando um aparelho desenvolvido para essa finalidade (Beecher Instruments®, Silver Springs, MD, USA). Dessa maneira obtinham um controle mais preciso da ordenação e colocação das amostras de tecido no bloco receptor.

A técnica dos TMA tem vantagens significativas em relação aos “multi-tissue blocks” ou “sausage blocks”. A forma cilíndrica regular e o pequeno diâmetro dos espécimes retirados dos blocos doadores maximizam a amostragem dos TMA, isto é, permitem que se coloque maior número de amostras em cada bloco receptor e minimizam os danos aos blocos doadores, com melhor preservação das amostras ou blocos originais, possibilitando análises complementares subseqüentes.

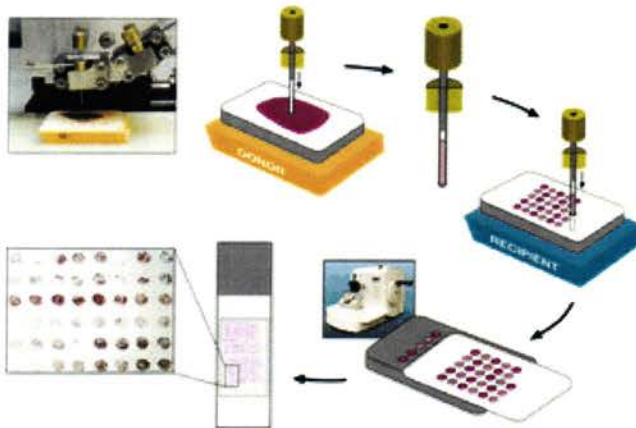
2.3.2 Montagem dos TMA

De acordo com a intenção do estudo, definem-se as características histológicas que devem estar representadas nos casos que serão colocados nos “arrays” e resgatam-se as lâminas e blocos correspondentes dos arquivos.

Os patologistas revêem todos os casos, registram o conjunto dos fatores histológicos relevantes e eventualmente prognósticos (em tumores, grau e diferenciação histológicos, grau nuclear, margens, invasão vascular,

margens, etc.) e reclassificam as doenças de acordo com as nomenclaturas mais recentes quando necessário. Depois, selecionam e marcam as áreas mais representativas nas lâminas coradas pela hematoxilina e eosina para orientar a punção posterior dos blocos doadores correspondentes.

A seguir, levantam-se dos arquivos os blocos correspondentes às áreas marcadas nas lâminas dos cortes 'inteiros', colocando-os ordenadamente da maneira que ficarão dispostos nos blocos dos TMA. Deve-se gerar um arquivo (permanente, rastreável e resgatável) para definir e armazenar todas as informações referentes a cada um dos cilindros que compõem o TMA (no programa Excel, por exemplo), com suas coordenadas X e Y no bloco receptor correspondente. A Figura 6 ilustra o princípio de construção e aplicação prática dos TMA.



Fundação Antonio Prudente
 Ana Maria Rodrigues Alves Kuminari
 Coordenadora Pós-Graduação

Fonte: Yale University School of Medicine (2007)

Figura 6 - Princípio da construção e aplicação prática dos TMA.

Cada uma das biópsias obtidas dos blocos doadores é colocada num bloco receptor, onde foram previamente feitos cilindros vazados para recebê-las, organizados em coordenadas definidas, permitindo a

identificação exata de cada amostra. A vantagem do arranjo preciso dos cilindros de tecido em coordenadas X e Y é a facilitação da análise microscópica (manual ou automatizada).

Para que a montagem física dos TMA seja a mais precisa possível é recomendável o uso de aparelhos específicos (neste estudo foi utilizado o aparelho da empresa Beecher Instruments®), que possui um ajuste automático que possibilita a definição das coordenadas e determina a profundidade dos cilindros receptores de acordo com os cilindros a serem transferidos.

O diâmetro de cada cilindro pode variar de 0,6 a 2 mm. Com cilindros de 0,6 mm, conseguem-se colocar até 1.000 exemplares de tecido em blocos de TMA de 45 x 20 mm. Blocos com maior densidade de cilindros ou blocos receptores maiores poderiam conter maior número de amostras por array, ampliando a magnitude dos espécimes disponíveis para cada análise (KONONEN et al. 1998; BUBENDORF et al. 2001).

A espessura ('profundidade') de cada cilindro de tecido é de 3 a 4 mm. Cerca de 200 secções histológicas de 4 a 8 μm podem ser realizadas de cada bloco de TMA, de acordo com a espessura original dos cilindros de tecido nele contidos. A cada 20^a. secção cora-se pela hematoxilina / eosina uma lâmina para o controle de representatividade do tecido amostrado.

Para facilitar os cortes histológicos, pode-se utilizar uma fita adesiva (Instrumedics®, Hackensack, New Jersey) que auxilia a transferência das fitas de tecido para as lâminas.

O técnico que prepara e monta os TMA deve ser paciente, talentoso e bastante experiente em técnicas histológicas, com um período de treinamento que permita a realização de várias centenas, senão milhares de punções em blocos receptores e doadores preparados especialmente para tal fim.

De cada bloco 'doador' podem ser obtidos vários cilindros, com mínimo dano ao fragmento original. Num bloco de parafina com um fragmento de tecido ou tumor com área de 18 x 18 mm é possível realizar-se até 300 biópsias cilíndricas. Dessa forma, é possível construir-se simultaneamente múltiplos blocos de *arrays* de tecido com coordenadas idênticas e características histológicas muito semelhantes, principalmente nos casos onde há homogeneidade do tecido nas lesões (ex: linfomas NH, tumores sólidos não-heterogêneos). Secções histológicas dos blocos de TMA permitem a análise em paralelo para a detecção de DNA (*fluorescence in situ hybridization* - FISH), RNA (mRNA ISH) ou proteínas (imunistoquímica - IIQ) que possam servir como alvos prognósticos e terapêuticos potenciais, ou para a caracterização da expressão dos mesmos nas diferentes amostras.

Se a espessura do tecido nos cilindros for de 3 a 4mm, e houver tumor ou tecido de interesse com distribuição homogênea em toda a extensão do fragmento, podem ser feitos até 300 cortes histológicos do bloco receptor, resultando em 90,000 análises *in situ* do material proveniente do bloco original, ao invés de apenas 300 pela técnica convencional (KONONEN et al. 1998; BUBENDORF et al. 2001).

Isto permite a análise consecutiva de um grande número de marcadores moleculares e a construção de um imenso banco de dados de características genótípicas e fenótípicas de regiões praticamente idênticas de tecidos e tumores, podendo ser utilizados tecidos humanos, animais, vegetais e culturas de células (BUBENDORF et al, 2001). A correlação de todas essas informações com os dados de acompanhamento e evolução permite a validação dos marcadores 'emergentes' e sua aplicação à prática clínica (PALACIOS et al. 2005).

Questiona-se o quanto a heterogeneidade tumoral afetaria a validade da técnica dos TMA. Essa questão foi extensamente avaliada em diferentes estudos da literatura.

A escolha das áreas mais representativas de cada tumor (por exemplo, as áreas pouco diferenciadas) a serem 'biopsiadas' ou retiradas de cada bloco doador minimiza os efeitos da heterogeneidade tumoral, aumenta a representatividade e a consistência dos resultados dos estudos dos TMA, demonstrando-se excelente reprodutibilidade dos resultados obtidos em relação aos dos estudos com técnicas convencionais (ZHANG et al. 2003; BHARGAVA et al. 2004; PRALL et al. 2004; AALTONEN et al. 2006; DEMICHELIS et al. 2006; RUIZ et al. 2006; SEBASTIANI et al. 2006).

Em tumores que apresentam heterogeneidade significativa recomenda-se a realização de pelo menos dois (2) cilindros para a obtenção de maior representatividade das lesões. Em casos de câncer de mama, dois (2) cores de 1,0 mm têm de 95 a 98% de correspondência dos resultados

nos TMA com os obtidos nos estudos convencionais (TORHORST et al. 2001).

Num dos trabalhos iniciais com a metodologia de TMA, usando cilindros com 0,6 mm de diâmetro, KONONEN et al. (1998) obtiveram 84% de concordância na comparação da quantificação bioquímica dos receptores de estrógeno tanto com os TMA quanto com os métodos convencionais.

Podem-se colocar várias biópsias de cada tumor ou caso em cada bloco de TMA, sendo que a definição do número mínimo adequado varia de acordo com o objetivo do estudo em questão.

Quase todos os tumores malignos retêm suas características histológicas na espessura de 3 a 4 mm. Lesões benignas, alguns tumores bem diferenciados, bem como tecidos glandulares normais retêm suas características por algumas dezenas de cortes (1 a 2 mm).

Dessa forma, os TMA têm sido muito úteis para estudos de caracterização e validação de marcadores biomoleculares em arquivos com grande número de casos (FERGENBAUM et al. 2004).

2.3.3 Coloração e análise dos TMA

Os TMA são adequados para a realização de todas as análises *in situ*, da mesma forma que os cortes convencionais de tecido.

Uma das grandes vantagens dos TMA é a reprodutibilidade da padronização técnica das reações em nível sem precedentes. As lâminas são colocadas numa única cuba, em concentrações e temperaturas absolutamente idênticas. O tempo entre a secção histológica do material

emblocado e de seu processamento é também o mesmo para cada caso (cilindro). A espessura dos cortes histológicos é idêntica.

Há uma diferença sensível da homogeneidade da qualidade das reações nas lâminas de TMA em relação às técnicas convencionais de processamento, onde é necessário maior grau de tolerância das diferenças de variabilidade dos parâmetros acima, dado o significativo grau artesanal do preparo, mesmo com a utilização de aparelhos automatizados de IIQ.

Um dos parâmetros que pouco se pode alterar, tanto na análise convencional quanto nos TMA, é a fixação inicial das amostras originais dos tecidos e tumores. Cada paciente é operado em tempos diferentes, e as condições de fixação e manipulação das peças cirúrgicas acabam tendo uma grande variabilidade (concentração do formol, tamponamento da solução, tempo de fixação, tempo de processamento, qualidade dos álcoois e xilol no processamento histológico, qualidade e temperatura da parafina, tempo de armazenamento nos blocos).

2.3.4 Leitura das lâminas, tabulação dos dados e resultados

É fundamental para a análise e interpretação dos resultados que seja feito o arquivo preciso de todas as informações referentes a cada um dos cilindros que compõem o TMA, com suas coordenadas X e Y no bloco receptor correspondente. Esses arquivos devem ser permanentes, rastreáveis e facilmente acessíveis e resgatáveis, caso contrário perdem-se todas as inúmeras vantagens proporcionadas pela técnica.

A maior parte do trabalho (aproximadamente 90%) constitui-se na análise histopatológica artesanal dos patologistas, tanto na fase de escolha dos casos para a confecção dos TMA, reclassificação das lesões, quanto na análise dos resultados dos exames de imunohistoquímica, FISH, etc., que é realizada de modo extremamente semelhante às análises teciduais convencionais, consumindo tempo considerável de análise e compilação dos resultados.

Já existem diversos programas digitais para a leitura, captação das imagens, interpretação e armazenamento automatizado dos dados, que facilitam a análise global e correlação dos dados clínicos com os resultados obtidos, bem como o resgate rápido dessas informações, a revisão das imagens das reações e estudos comparativos de reprodutibilidade de critérios diagnósticos e interpretativos (LIU et al. 2002; CHEN et al. 2004). Entretanto, sua disponibilidade em nosso meio ainda é restrita.

3 OBJETIVOS

Considerando-se que a expressão do tipo de CK e de outros marcadores epiteliais é decorrente do grau de diferenciação epitelial e que a diferenciação histológica é um dos fatores principais na determinação do prognóstico das neoplasias, as hipóteses deste trabalho são:

1. Construção de TMAs com casos de carcinomas mamários dos arquivos do Hospital do Câncer de São Paulo, diagnosticados no período de 1980 a 2005, que poderão ser utilizados em trabalhos posteriores.
2. Verificar o padrão de expressão de CKs que apresente relevância na determinação do comportamento biológico dos carcinomas da mama, utilizando as técnicas de *tissue microarrays* e imunoistoquímica.
3. Verificar o padrão de expressão de marcadores biológicos (p53, p63, c-erbB-2, Ki-67, EGFR, ezrina, psoriasina) no grupo total e subgrupos de pacientes da amostra.
4. Subdividir o grupo total de pacientes em subgrupos pré-definidos de acordo com a expressão dos receptores hormonais, escore de HER2 e das citoceratinas basais (CK 5,6, CK 14 e CK 17) e verificar sua eventual associação com a evolução clínica.
5. Correlacionar o perfil de expressão das CKs com os diferentes marcadores moleculares (receptores hormonais, Ki-67, HER2, EGFR)

e anatomopatológicos (grau histológico, grau nuclear, status nodal, tamanho do tumor) com relevância prognóstica.

6. Caracterizar e comparar o comportamento biológico dos carcinomas ductais infiltrativos de nossas pacientes em relação ao descrito na literatura mundial.

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

A partir dos arquivos do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer do período de 1980 a 2005 foram selecionados 1.167 casos de pacientes femininas com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo de mama de diferentes graus histológicos e estádios clínicos, incluídos em 4 blocos de *tissue microarrays* (TMA). O critério principal de inclusão foi haver representação suficiente de tecido neoplásico nos blocos de parafina originais para a realização dos TMA, de modo que restasse amostra significativa da lesão primária para análises posteriores. Priorizou-se a escolha de casos com a maior disponibilidade possível de informações e acompanhamento clínicos, porém foram também incluídos casos do arquivo com curto seguimento, uma vez que poderiam ser utilizados nas análises comparativas da expressão dos diferentes marcadores e correlação com as características histológicas. Esses casos com curto seguimento foram excluídos, entretanto, das análises de sobrevida.

Os prontuários clínicos foram revistos, anotando-se em ficha de dados criada para este propósito (Anexo 1) as informações clínico-patológicas relevantes (dados demográficos, estadiamento anatomopatológico, dados de seguimento e sobrevida, terapêutica adjuvante, recidivas), inseridas em planilha de Excel. O seguimento clínico teve início considerado como a data do diagnóstico até a data do óbito ou da última consulta. Foram considerados como perda de seguimento clínico aqueles casos de pacientes

que não retornaram para duas consultas de controle ou por mais de 12 meses, sem que se tivesse obtido informações sobre a evolução clínica ou óbito. Os casos com perda de seguimento clínico foram devidamente censurados das análises estatísticas de sobrevida.

Revisamos os prontuários clínicos, estando completos os de 1.128 casos. Em 39 pacientes restantes da amostra desta análise havia apenas o laudo anatomopatológico original e / ou parte do prontuário disponível para revisão (3,3% do total de 1.167 casos).

De todos os casos selecionados foram resgatadas as lâminas originais coradas pela hematoxilina / eosina e os blocos correspondentes de material incluído em parafina, dos quais foram feitos novos cortes histológicos. Foi realizada revisão das novas lâminas (cortes convencionais) para confirmação do tipo histológico e determinação do grau histológico e nuclear (graduação histológica), seguindo-se os protocolos estabelecidos em literatura (TODD et al. 1987; ROSEN e OBERMAN 1993; ELLIS e ELSTON 1998; SOBIN e WITTEKIND 2006), sumarizados abaixo. A revisão histológica foi feita previamente à realização das reações IIQ e de forma independente do conhecimento dos dados clínicos. Nas lâminas convencionais foram marcadas áreas representativas do componente invasor para orientar das perfurações e obtenção dos cilindros para a confecção dos TMA.

4.1 DADOS CLÍNICOS E DEMOGRÁFICOS

Os períodos de tratamento das pacientes incluídas na amostra total estão relacionados na Tabela 3.

Tabela 3 – Distribuição dos casos segundo o ano de início do tratamento.

| Ano do início do tratamento | No. casos | % |
|-----------------------------|-----------|--------|
| 1980-1985 | 13 | 1,2 |
| 1986-1987 | 18 | 1,6 |
| 1988-1989 | 44 | 3,8 |
| 1990-1994 | 563 | 48,3 |
| 1995-2000 | 396 | 34,1 |
| 2001-2002 | 46 | 3,9 |
| 2003-2005 | 43 | 3,7 |
| Sem informação | 44 | 3,77 |
| Total | 1167 | 100,00 |

A partir dos levantamentos dos prontuários clínicos, obtivemos informações referentes à realização de quimioterapia adjuvante e neoadjuvante, hormonioterapia e radioterapia pré e / ou pós-operatória. Os dados foram dispostos resumidamente nas Tabelas 4 e 5, a seguir, uma vez que não constituíam o foco principal de nosso estudo atual.

Tabela 4 – Pacientes submetidas a quimioterapia adjuvante, neoadjuvante e hormonioterapia.

| | QT NEOAJ | | QT ADJ | | HT | |
|-------|-----------|--------|-----------|--------|-----------|--------|
| | No. Casos | % | No. Casos | % | No. Casos | % |
| NÃO | 853 | 73,09 | 434 | 37,19 | 597 | 51,16 |
| SIM | 233 | 19,97 | 641 | 54,93 | 488 | 41,82 |
| NA | 81 | 6,94 | 92 | 7,88 | 82 | 7,03 |
| Total | 1167 | 100,00 | 1167 | 100,00 | 1167 | 100,00 |

NA: não avaliável

QT ADJ: quimioterapia adjuvante

QT NEOAJ: quimioterapia neo-adjuvante

HT: hormonioterapia

Tabela 5 – Pacientes submetidas a radioterapia pré ou pós-operatória.

| | RXT PRE | | RXT POS | |
|-------|-----------|--------|-----------|--------|
| | No. Casos | % | No. Casos | % |
| NA | 86 | 7,37 | 82 | 7,03 |
| NÃO | 1036 | 88,77 | 243 | 20,82 |
| SIM | 45 | 3,86 | 842 | 72,15 |
| Total | 1167 | 100,00 | 1167 | 100,00 |

NA: não avaliável

RXT PRE: radioterapia pré-operatória

RXT POS: radioterapia pós-operatória

Em 1.100 casos os prontuários clínicos continham dados sobre história familiar de câncer de mama, informados pelas próprias pacientes. Dessas, 873 pacientes informaram não ter história familiar. Dasquelas com algum caso na família (graus variados de parentesco), 179 tinham apenas uma parente, 44 pacientes tinham duas parentes, 3 pacientes tinham 3 parentes e apenas uma (1) paciente tinha 4 parentes com câncer de mama.

A informação sobre a cor da pele estava disponível em 1.104 prontuários de pacientes. A maioria dos casos foi referida como “cor branca”, com 948 pacientes. Tivemos 99 casos de pacientes com cor “negra, parda ou mulata” e 57 casos de pacientes “amarelas”.

4.1.1 Tempo de seguimento

O seguimento clínico variou de 1 mês a 255 meses, segundo a Tabela 6, abaixo. Fizemos as análises de distribuição dos casos segundo o tempo de seguimento para os grupos estudados: (1) doença localizada - EC I e II; e (2) doença avançada - EC III e IV, dispostas abaixo lado a lado para facilitar a visualização dos dados da amostragem (Tabela 6).

Tabela 6 - Tempo de seguimento clínico (meses) segundo estádios clínicos agrupados.

| Tempo de seguimento | EC I e II (meses) | EC III e IV(meses) |
|---------------------|-------------------|--------------------|
| Mínimo | 2 | 1 |
| Percentil 25 | 41 | 22 |
| Mediana | 72 | 45 |
| Média | 75,94 | 57,09 |
| Percentil 75 | 104 | 82,5 |
| Máximo | 255 | 189 |

4.1.2 Evolução clínica

Segundo o levantamento dos dados de evolução clínica registrados nos prontuários hospitalares, dividimos as pacientes nos grupos relacionados na Tabela 7.

Tabela 7 – Número de casos por evolução clínica (EC I a IV).

| Evolução clínica | No. Casos | % total | % casos válidos |
|-------------------------------|------------------|----------------|------------------------|
| Vivas sem evidência de doença | 526 | 45 | 47,9 |
| Óbitos pela doença | 447 | 38 | 40,7 |
| Óbitos - outras causas | 42 | 3,6 | 3,8 |
| Vivas com doença | 72 | 6,2 | 6,6 |
| Perda de seguimento clínico | 12 | 1 | 1,1 |
| Total | 1099 | 94 | 100 |
| Ignorada | 68 | 5,8 | |
| Total | 1167 | 100 | |

4.1.3 Estadiamento clínico

O estadiamento clínico foi realizado segundo a classificação TNM (SOBIN e WITTEKIND 2006 - Anexos 2 e 3).

Tabela 8 - Distribuição dos casos segundo os estádios clínicos.

| | No. Casos | % total | % casos válidos |
|------------------|------------------|----------------|------------------------|
| Estádio I | 73 | 6,3 | 6,5 |
| Estádio II | 444 | 38 | 39,4 |
| Estádio III | 524 | 44,9 | 46,5 |
| Estádio IV | 87 | 7,5 | 7,7 |
| Subtotal | 1128 | 96,7 | 100 |
| Estádio ignorado | 39 | 3,3 | |
| Total | 1167 | 100 | |

A divisão do grupo total das pacientes em dois subgrupos de doença localizada (EC I e II) e avançada (EC III e IV) está discriminada abaixo (Tabela 9).

Tabela 9 - Distribuição dos casos segundo os estádios clínicos agrupados.

| | No. Casos | % | % casos válidos |
|-------------------------------------|-----------|------|-----------------|
| Estádios I e II – Doença localizada | 517 | 44,3 | 45,8 |
| Estádios III e IV – Doença avançada | 611 | 52,4 | 54,2 |
| Subtotal | 1128 | 96,7 | 100 |
| Estádio ignorado | 39 | 3,3 | |
| Total | 1167 | 100 | |

A variação das idades em cada grupo de estádios clínicos está registrada nas Tabelas 10 e 11, a seguir.

Tabela 10 – Distribuição das pacientes segundo idade e estadiamento clínico.

| IDADE | EC I e II | EC III e IV | EC I a IV |
|--------------|------------|-------------|------------|
| Mínimo | 26 anos | 24 anos | 24 anos |
| Percentil 25 | 47 anos | 44 anos | 46 anos |
| Mediana | 55 anos | 54 anos | 55 anos |
| Média | 56,07 anos | 54,73 anos | 55,32 anos |
| Percentil 75 | 66 anos | 64 anos | 65 anos |
| Máximo | 92 anos | 94 anos | 94 anos |

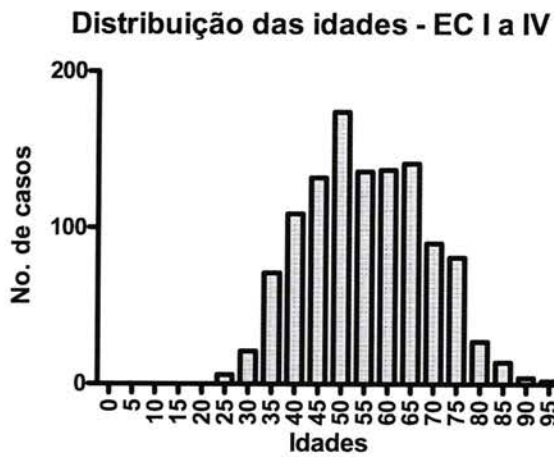


Figura 7 – Distribuição das idades – Estádios clínicos I a IV

Tabela 11 - Distribuição das pacientes segundo idade estratificada (até 50 anos ou mais de 50 anos) e estádios clínicos agrupados.

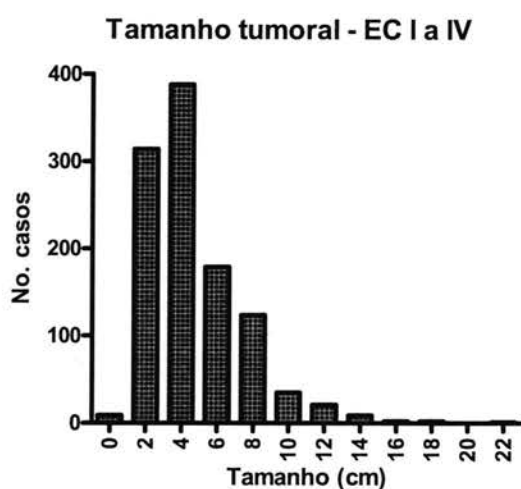
| | | EC I e II | EC III e IV | Total | |
|-------------------------|-------------|-----------|-------------|------------|------------|
| Idade | Até 50 anos | N (%) | 183 (43,10) | 242 (56,9) | 425 (100) |
| | > 50 anos | N (%) | 316 (47,6) | 348 (52,4) | 664 (100) |
| Total de casos com dado | | N (%) | 499 (45,80) | 590 (54,2) | 1089 (100) |

Segundo as informações coletadas no levantamento dos prontuários clínicos, a distribuição das pacientes segundo o status menopausal foi colocada na Tabela 12.

Tabela 12 - Distribuição dos casos segundo status menopausal.

| | Estádios I e II | | Estádios III e IV | | Total | |
|---------------|-----------------|--------|-------------------|--------|----------|---------|
| | No.casos | (%) | No.casos | (%) | No.casos | (%) |
| Pré-menopausa | 180 | (42,1) | 248 | (57,9) | 428 | (100,0) |
| Pós-menopausa | 311 | (46,8) | 353 | (53,2) | 664 | (100,0) |
| Total | 491 | (45,0) | 601 | (55,0) | 1092 | (100,0) |

O tamanho tumoral foi obtido segundo os laudos originais dos exames anatomopatológicos, uma vez que essa informação é colhida durante o exame macroscópico da peça cirúrgica. A variação foi de 0,4 a 22,0 cm, com média de 4,42 e mediana de 4,0 cm (desvio-padrão de 2,61 cm).

**Figura 8** – Distribuição de casos de acordo com o tamanho tumoral (pT).

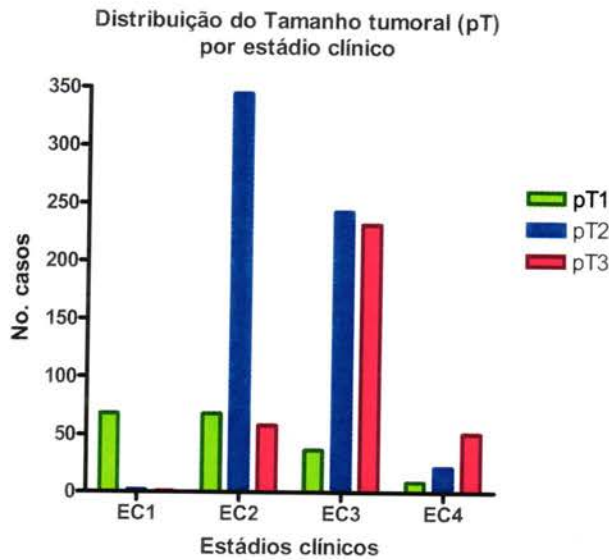


Figura 9 – Distribuição de casos segundo tamanho tumoral (pT) e estadiamentos clínicos.

4.1.4 Graduação histológica

Adotamos em nosso trabalho a graduação de Nottingham (ELSTON e ELLIS 1991), que depende da extensão da formação de túbulos, do grau de pleomorfismo nuclear e da contagem mitótica. A cada uma dessas variáveis é atribuído um escore de 1, 2 ou 3, e os escores são somados para a obtenção de uma graduação final (Quadro 3). O escore mitótico é determinado pelo número de mitoses encontradas em 10 campos de grande aumento (CGA) nas áreas com maior atividade mitótica do tumor. Devido às variações no diâmetro do campo microscópico de acordo com o modelo do microscópio utilizado, deve-se adaptar a pontuação dos escores com auxílio de uma tabela proposta pelos autores do método (ELSTON e ELLIS 1991).

A revisão de todos os casos foi realizada pela patologista (MMAS) em microscópio óptico [marca Zeiss – lente de 40x – S40 / 0,65 (160 / 0,17)]

para a confirmação dos tipos histológicos, graduação dos carcinomas e escolha das áreas adequadas para a obtenção dos cilindros que compuseram os blocos dos TMA.

Quadro 3 - Sistema de graduação de Nottingham.

| Característica | Escore |
|---|------------------|
| Formação de túbulos | |
| Presente na maioria do tumor (> 75%) | 1 |
| Moderada: 10 a 75% do tumor | 2 |
| Mínima: < 10% do tumor | 3 |
| Pleomorfismo nuclear | |
| Núcleos pequenos e regulares | 1 |
| Moderada hipertrofia e irregularidade | 2 |
| Acentuada variação de tamanho, nucléolos, cromatina grosseira | 3 |
| Contagem mitótica* | |
| Até 12 mitoses por 10 CGA | 1 |
| Entre 13 e 24 mitoses por 10 CGA | 2 |
| Mais que 24 mitoses por 10 CGA | 3 |
| Graduação final | Soma dos escores |
| Grau I | 3 – 5 |
| Grau II | 6 – 7 |
| Grau III | 8 – 9 |

* Valores ajustados para o campo microscópico utilizado neste estudo

CGA: campo de grande aumento

Fonte: Adaptado de ELSTON e ELLIS (1991)

A distribuição de casos segundo o grau histológico foi: grau histológico 1 – 161 casos (13,8%); grau histológico 2 – 664 casos (56,9%); e grau histológico 3 – 342 casos (29,3%) (total de 1.167 pacientes).

4.1.5 Confeção dos blocos e lâminas dos TMA

Foi obtido um cilindro de cada bloco original do tumor utilizando-se um instrumento de precisão especial para a confecção dos TMA (Beecher Instruments®, Silver Spring, Maryland), conforme descrito em protocolos da literatura (KONONEN et al. 1998).

O diâmetro de cada cilindro dos blocos de TMA confeccionados para este estudo foi de 1,0 mm; a distância entre os cilindros no bloco receptor foi de 0,2 mm. Cada bloco possui um total de 320 cilindros de tecido, dispostos em coordenadas correspondentes a 16 colunas e 20 linhas (designações das linhas de 1 a 20; designações das colunas de A a P). Do total de 1280 cilindros, 4 correspondem a um fragmento de tecido hepático usado como marcador das coordenadas “A-1” dos TMA, utilizados para a orientação da leitura das lâminas e identificação dos casos. Foram excluídos da presente análise 109 casos por serem de outros tipos histológicos que não carcinoma ductal invasivo.



Figura 10 – Foto dos blocos dos *tissue microarrays* deste estudo

Os cortes histológicos obtidos dos blocos de TMA, com espessura média de 4 μ , foram dispostos em lâminas especiais eletricamente carregadas (Instrumedics Inc.), com auxílio de adesivos sensíveis à luz ultravioleta (Microsystems Inc. ®) para facilitar sua orientação após a microtomia.

Os quatro blocos de TMA foram submetidos a cortes seriados, com uma média de 100 lâminas cortadas para cada um, numeradas seqüencialmente de acordo com o nível de corte (de 1 a 100), restando ainda material suficiente para novas secções histológicas nos blocos dos *arrays*. Aquelas lâminas que não foram utilizadas para as reações deste estudo de IIQ tiveram suas superfícies parafinizadas e foram mantidas em freezer a -70°C para melhor preservação da antigenicidade dos marcadores. Foi realizada coloração pela hematoxilina/eosina de uma lâmina a cada 20 níveis de cada um dos blocos para o controle histológico da representação do tumor de cada caso nas diferentes áreas do tumor nos cilindros (níveis 1, 20, 40, 60, 80 e 100).

4.2 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO (IIQ)

O estudo IIQ foi realizado com anticorpos que reconhecem as diversas citoceratinas, receptores de estrógeno e progesterona, Ki-67 (marcador de proliferação celular), receptores de fatores de crescimento epidérmico (c-erbB-2 e EGFR), ezrina e psoriasina. As reações para cada marcador foram realizadas em duplicata, simultaneamente, utilizando-se

níveis distantes da amostra dos blocos, dispostos em 2 lâminas separadas (62 ou 63 níveis de diferença entre as secções utilizadas nas reações que, com a espessura média de 4μ , resultam numa distância de cerca de 250μ), para que houvesse representação de diferentes células ou áreas de cada tumor / amostra. No Quadro 4 estão discriminados os níveis de cada bloco nos quais foram realizadas as reações de imunistoquímica.

As reações de imunistoquímica seguiram os protocolos padronizados específicos preconizados pelos fabricantes, conforme descrito em literatura para cada marcador. Todas as reações tiveram controles positivos e negativos corridos paralelamente às lâminas do estudo.

Quadro 4 – Níveis dos blocos dos TMA em que foram realizadas as reações de IIQ.

| MARCADOR | NÍVEIS | | | |
|------------|---------|---------|---------|---------|
| | BLOCO 5 | BLOCO 6 | BLOCO 7 | BLOCO 8 |
| CK5,6 | 21 / 83 | 21 / 83 | 21 / 83 | 21 / 83 |
| CK8 | 69 / 6 | 6 / 69 | 69 / 6 | 6 / 69 |
| CK13 | 65 / 2 | 2 / 65 | 65 / 2 | 2 / 65 |
| CK14 | 3 / 66 | 3 / 66 | 66 / 3 | 3 / 66 |
| CK17 | 14 / 76 | 76 / 14 | 14 / 76 | 14 / 76 |
| CK18 | 13 / 75 | 75 / 13 | 75 / 13 | 13 / 75 |
| ER | 71 / 8 | 8 / 71 | 8 / 71 | 8 / 71 |
| PR | 72 / 9 | 9 / 72 | 9 / 72 | 9 / 72 |
| Ki-67 | 68 / 5 | 5 / 68 | 5 / 68 | 5 / 68 |
| p53 | 11 / 73 | 11 / 73 | 73 / 11 | 11 / 73 |
| c-erbB-2 | 12 / 74 | 12 / 74 | 12 / 74 | 12 / 74 |
| p63 | 16 / 78 | 16 / 78 | 78 / 16 | 16 / 78 |
| EGFR | 4 / 67 | 4 / 67 | 67 / 4 | 4 / 67 |
| EZRINA | 15 / 77 | 15 / 77 | 15 / 77 | 15 / 77 |
| PSORIASINA | 17 / 79 | 17 / 79 | 17 / 79 | 17 / 79 |

O Quadro 5 mostra a lista completa dos 15 anticorpos utilizados, com os respectivos clones, fabricantes, diluições e método de recuperação antigênica.

A leitura de todas as lâminas de cada anticorpo (4 blocos, em duplicata) foi realizada num só dia para diminuir a variabilidade de interpretação intra-observador (MMAS). Houve pequena variação na resultante final dos marcadores nos diferentes níveis, sendo considerada a média dos resultados para a análise estatística. Nos casos onde ocorreu descolamento do tecido numa das lâminas durante o processamento ou onde não mais houvesse representação de células neoplásicas considerou-se apenas o resultado do disco presente (ou adequado) para a análise. Quando não havia amostragem celular adequada em nenhum dos cortes dos dois cilindros, o caso foi excluído da análise para o respectivo marcador.

Quadro 5 – Anticorpos e protocolos de reação utilizados.

| Anticorpo | Marca | Clone | Diluição | Solução recuperante | Método recuperação | Sistema amplificação |
|------------|------------|------------|----------|---------------------|--------------------|----------------------|
| CK 5,6 | DAKO | D5/16B4 | 1/100 | EDTA/TRIS pH 9,0 | BM | NLMPN |
| CK 8 | DAKO | 35bH11 | 1/100 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| CK13 | NovoCastr | KS1A3 | 1/200 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| CK14 | Biogenex | LL002 | 1/400 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| CK17 | NovoCastr | E3 | 1/20 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| CK18 | DAKO | DC10 | 1/50 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| ER | Neomarkers | SP1 | 1/1000 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| PR | DAKO | 636 | 1/2000 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| Ki67 | DAKO | KiS5 | 1/300 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| p53 | DAKO | D0-7 | 1/2000 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| cerbB2 | DAKO | policlonal | 1/1000 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| p63 | DAKO | 4A4 | 1/2000 | EDTA/TRIS pH 9,0 | BM | NLMPN |
| EGFR | NovoCastr | EGFR-113 | 1/40 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| EZRINA | Neomarkers | 3C12 | 1/2000 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |
| Psoriasina | Imgenex | 47C1068 | 1/4000 | CITRATO pH 6,0 | PP | NLMPN |

BM: banho-maria

PP: panela de pressão elétrica

NLMPN: NovoLinK Max Polymer-Novocastra

A avaliação das reações imunoistoquímicas foi feita de forma semi-quantitativa (MMAS), considerando-se neste trabalho apenas o número percentual de células marcadas. O fato das reações terem sido feitas simultaneamente para cada anticorpo uniformizou eventuais variações da intensidade de marcação.

A leitura das lâminas de imunoistoquímica foi realizada em microscópio óptico comum (MMAS). Os resultados foram avaliados semi-quantitativamente e classificados em relação ao padrão específico de

expressão para cada anticorpo (Quadro 6) e ao número de células positivas (Quadro 7).

Quadro 6 - Padrões de imunomarcção dos anticorpos.

| Anticorpos | Padrões de imunomarcção |
|-------------------|---|
| Ki-67 | Nuclear |
| ER | Nuclear |
| PR | Nuclear |
| p53 | Nuclear |
| p63 | Nuclear |
| CK5,6 | Citoplasmático e de membrana incompleto* |
| CK8 | Citoplasmático e de membrana incompleto* |
| CK13 | Citoplasmático e de membrana incompleto* |
| CK18 | Citoplasmático e de membrana incompleto* |
| ezrina | Citoplasmático e de membrana incompleto* |
| CK14 | Citoplasmático e de membrana granular irregular |
| CK17 | Citoplasmático |
| psoriasina | Citoplasmático |
| c-erbB-2 | membrana |
| EGFR | Membrana e citoplasmático* |

* especificados nas tabelas

Quadro 7 - Gradação das reações de imunistoquímica de acordo com o número de células marcadas.

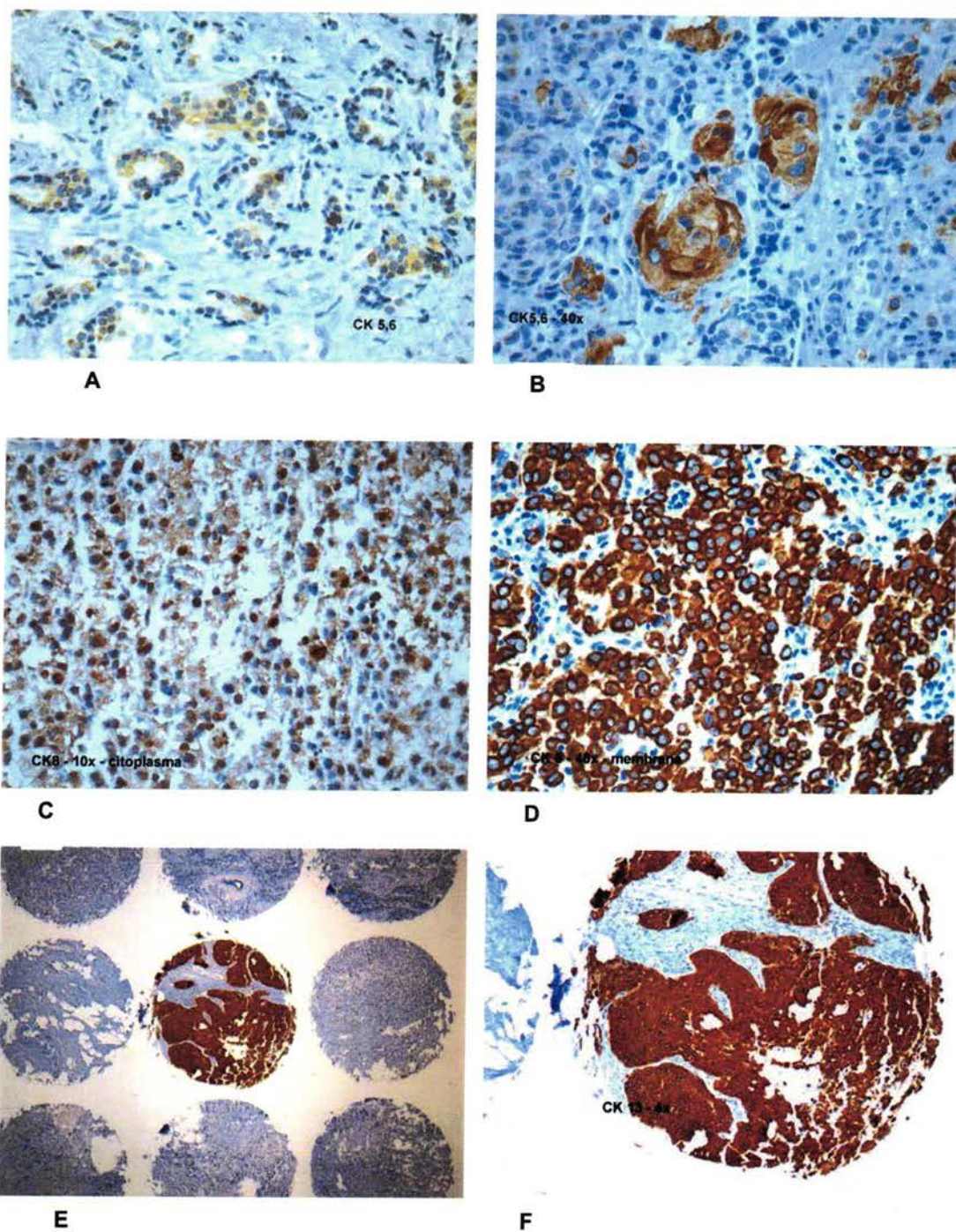
| Quantificação | Grau |
|------------------------------|------|
| Nenhuma célula positiva | 0 |
| < 10% das células positivas | 1 |
| 10-50% das células positivas | 2 |
| 51-90% das células positivas | 3 |
| > 90% das células positivas | 4 |

Conforme exposto na revisão da literatura, não há consenso dos relatos sobre os critérios para os níveis de corte utilizados na semi-quantificação das reações imunistoquímicas. Mesmo para os marcadores já estabelecidos, tais como receptores hormonais e proteína p53, há relato de valores divergentes nos diferentes trabalhos. Optamos por graduar e registrar os achados de imunomarcação de modo abrangente e semelhante no caso das citoceratinas, p63, p53, ezrina e psoriasina, para tentar estabelecer valores de corte para cada marcador e, eventualmente, aperfeiçoar a verificação da correlação dos resultados com seu real significado biológico. Os valores de corte para cada marcador foram estabelecidos antes da realização das análises estatísticas.

O escore final para a análise estatística foi estabelecido pelo percentual de células marcadas, agrupando-se os casos graduados como 1 e 2 (fraca ou moderadamente positivos) e os graus 3 e 4 (fortemente positivos). Os casos sem marcação celular alguma foram classificados como negativos (grau 0) (Tabela 13).

Tabela 13 - Categorização dos casos segundo a percentagem de células marcadas nas reações imunoistoquímicas.

| Anticorpos | Ki-67 | | | |
|--|---|------------------------------|----------------------------|--|
| | ER, PR, ezrina, Psoriasina, p63, p53 | CK 5.6, 8, 13, 14, 17, 18 | Atividade proliferativa | EGFR |
| Classificação (graus utilizados) | Negativo (0) | Negativo (0) | | < 10% células marcadas (1) |
| | Fraco / moderado (1 e 2) | Fraco/moderado (1 e 2) | baixa (1) | ≥ 10% de células marcadas (2 a 4) |
| | | | moderada (2) | |
| | Forte (3 e 4) | Forte (3 e 4) | alta (3 e 4) | |

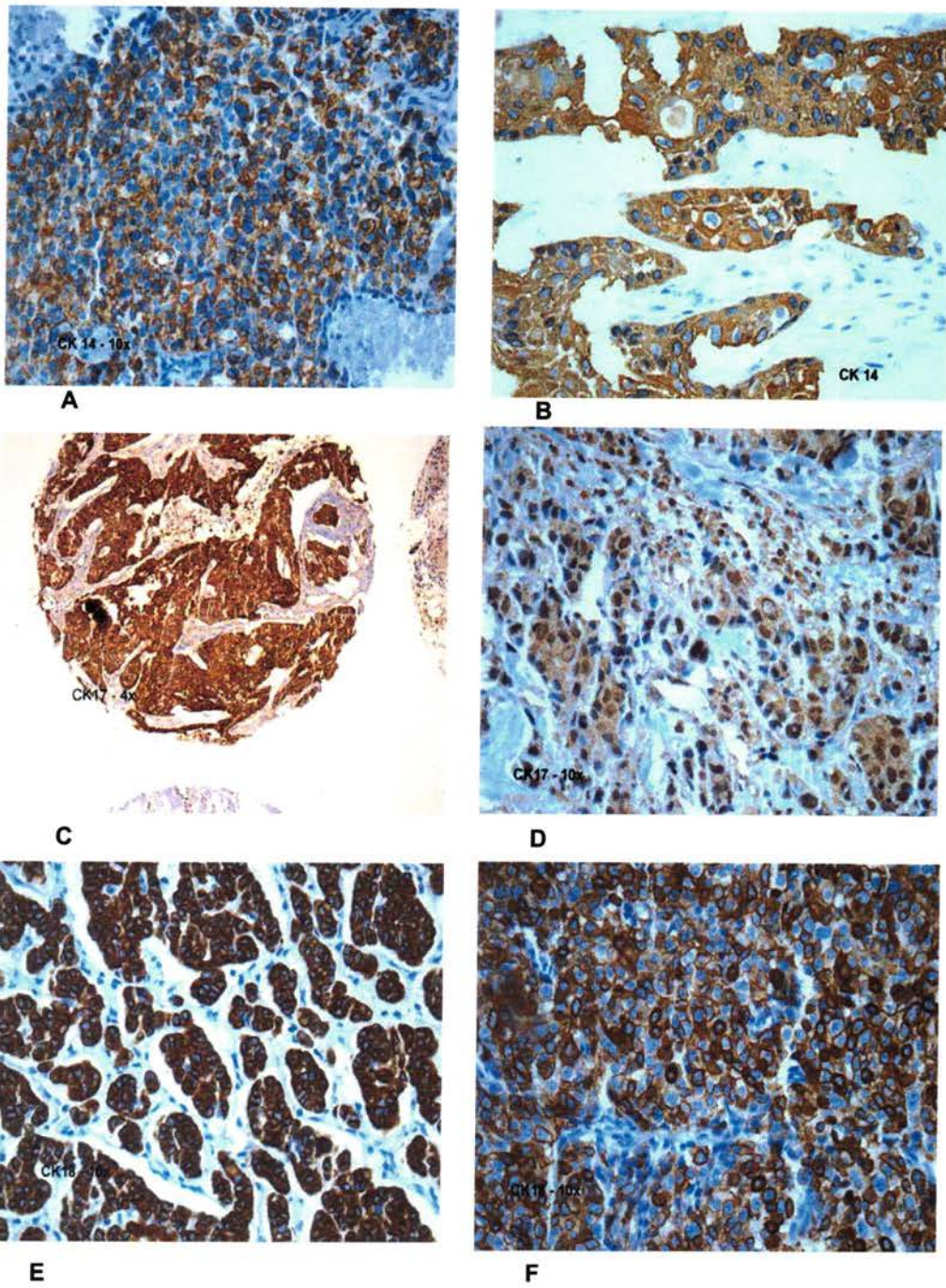


A e B: CK 5,6 – marcação citoplasmática e membrana (parcial) (A - 100x e B - 400x).

C e D: CK 8 - marcação citoplasmática e membrana (C- 100x e D - 400x).

E e F: CK 13 - marcação citoplasmática e membrana (E - 20x e B - 40x).

Figura 11 – Padrões de expressão dos marcadores IIQ (CK5,6; CK8 e CK13)

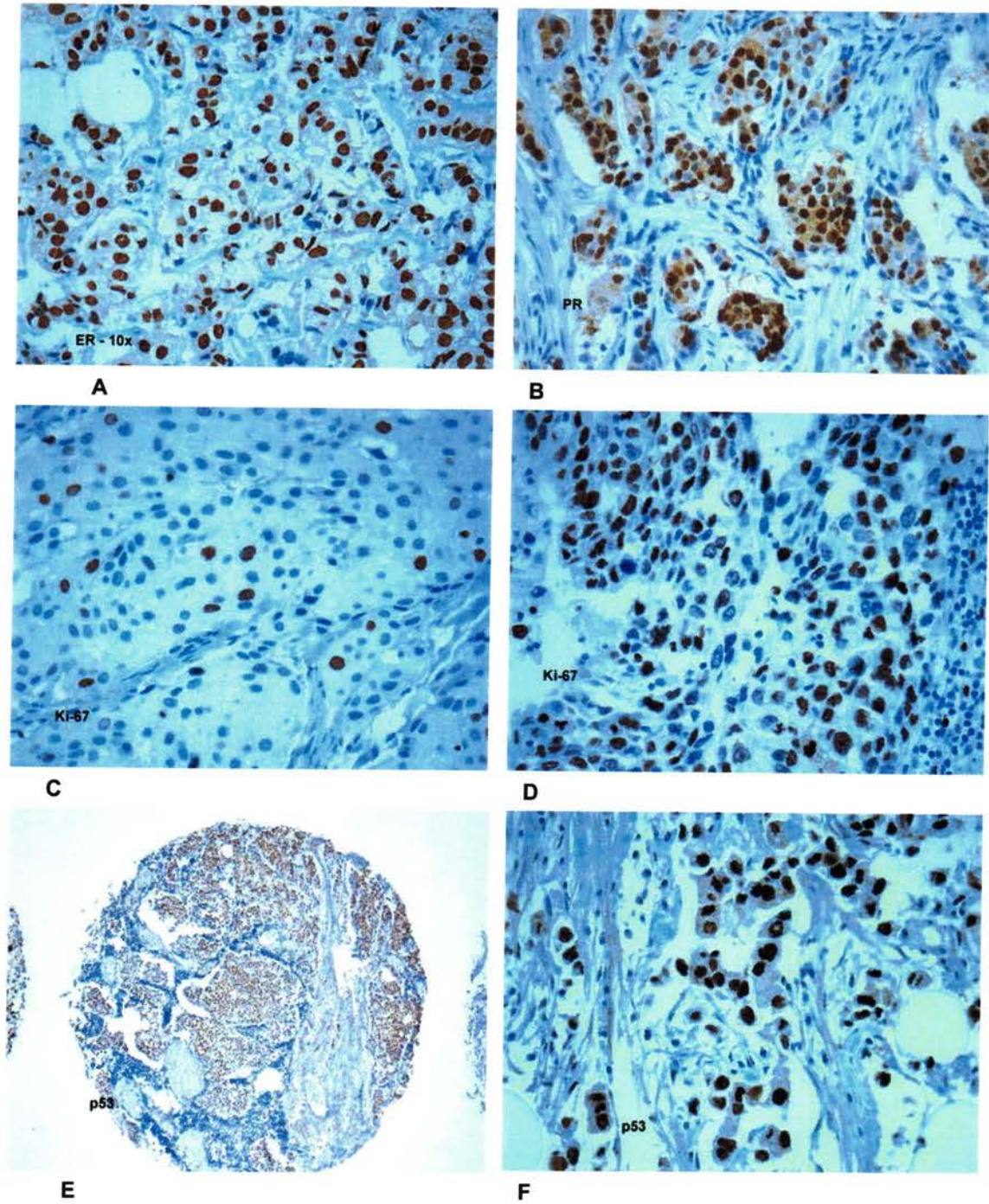


A e B: CK 14 - marcação citoplasmática e membrana (granular) (A - 100x e B - 400x).

C e D: CK 17 - marcação citoplasmática (C - 40x e D - 100x)

E e F: CK 18 - marcação citoplasmática e membrana (parcial) (E e F - 100x).

Figura 12 - Padrões de expressão dos marcadores IIQ (CK14; CK17; CK18)

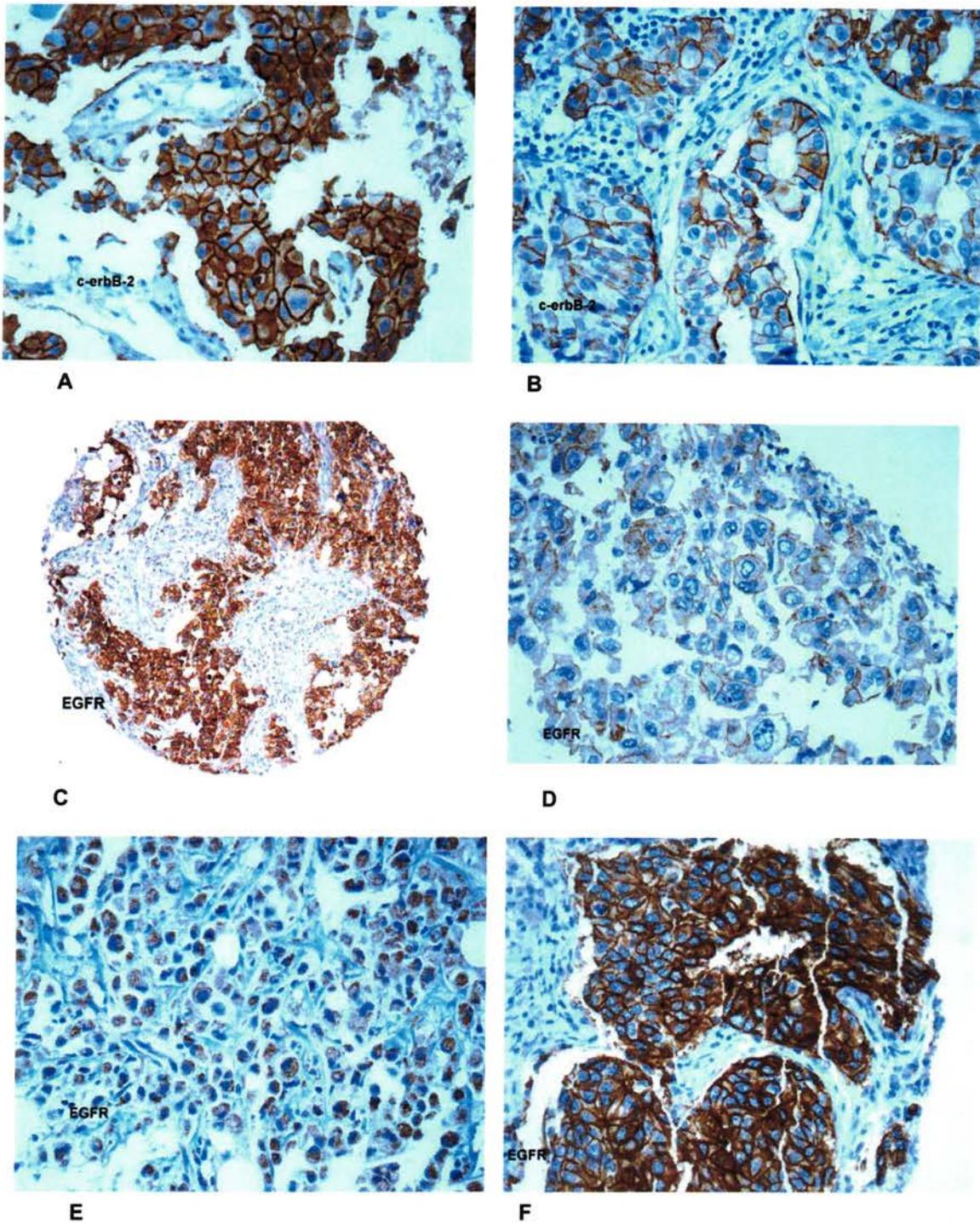


A e B: receptores hormonais (ER e PR) (A – 100x e B – 100x)

C e D: Ki-67 (400x)

E e F: p53 (E – 20x e F – 400x)

Figura 13 – Padrões de expressão dos marcadores IIQ (ER, PR, Ki-67 e p53)

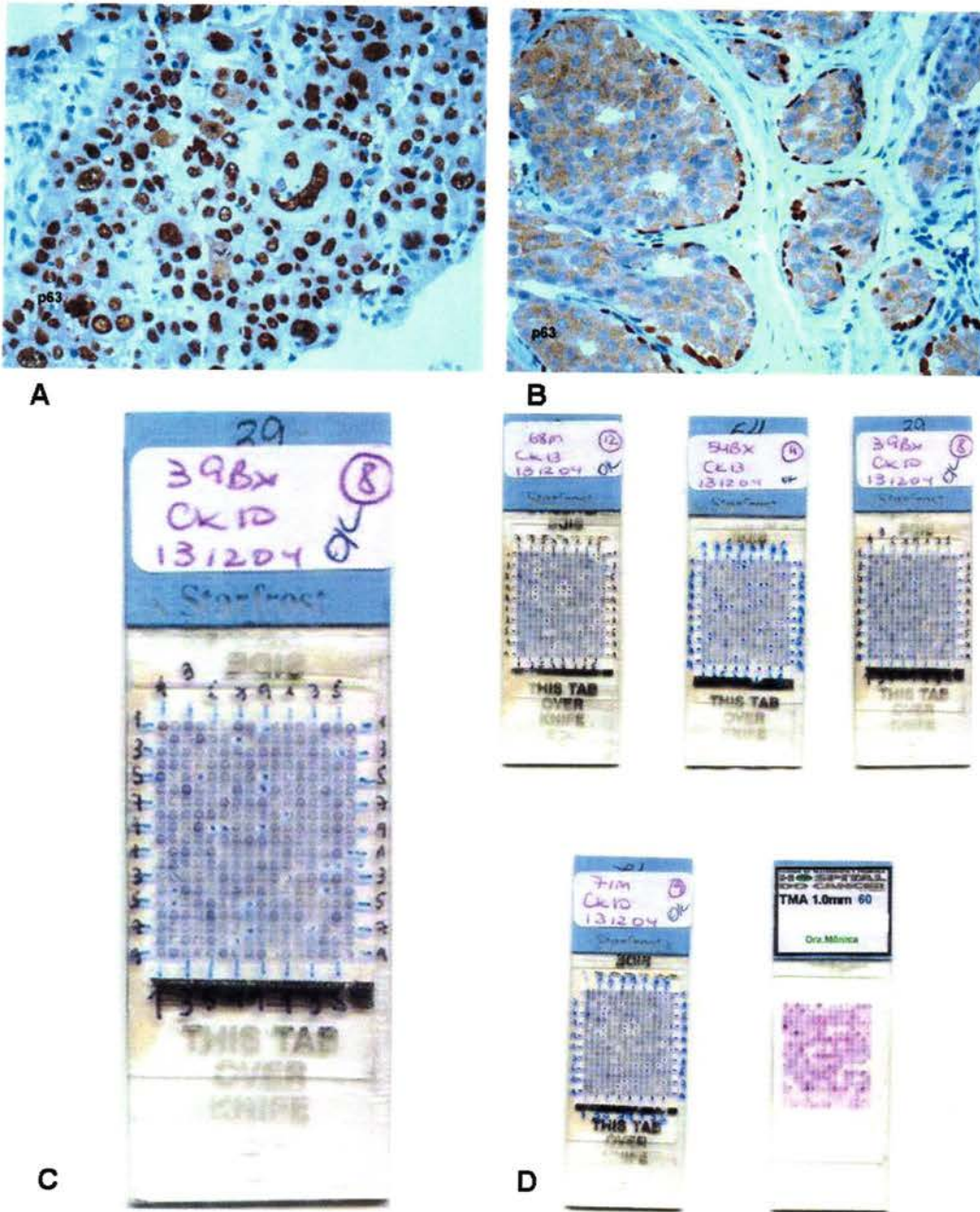


A e B: c-erbB-2 (HER2) – padrão de membrana (A e B – 400x)

C e D: EGFR – padrões citoplasmático e de membrana (C – 20x e D – 400x)

E e F: EGFR – padrões citoplasmático e de membrana (E – 200x e F – 400x)

Figura 14 – Padrões de expressão dos marcadores IIQ (HER2 e EGFR)



A e B: proteína p63 – expressão nuclear nas células neoplásicas (A – 400x) e em células basais normais (B – 200x)

C e D: lâminas dos TMA – IIQ e HE

Figura 15 – Padrão de expressão IIQ p63 e lâminas dos TMA

A atividade proliferativa, evidenciada pelo anticorpo Ki-67, foi classificada em baixa (grau 1 - até 10% de células positivas), moderada (grau 2 - >10% até 50% de células positivas) e alta (graus 3 e 4 - > 50% de células positivas).

O padrão de imunexpressão da proteína c-erbB-2 foi avaliado como o preconizado pelo Herceptest (DAKO® - referido nas tabelas como "Escore HER2"), com escores de 0 a 3+, de acordo com a intensidade de marcação de membrana e o número de células epiteliais marcadas (Quadro 8).

Consideramos como positivos os casos com expressão 3+ para a análise estatística.

Quadro 8 – Imunoexpressão da proteína c-erbB-2 segundo o preconizado para o Herceptest (DAKO®) (escore de HER2).

| Escore | Padrão de imunomarcção | status HER-2/neu |
|--------|--|----------------------------------|
| 0 | Imunomarcção negativa ou positiva em menos de 10% das células tumorais | Negativo |
| 1+ | Imunoreação fraca, quase imperceptível, detectada em mais de 10% das células tumorais. Somente parte do contorno da membrana é marcada | Negativo |
| 2+ | Imunoreação fraca a moderada observada em mais de 10% das células tumorais | Positividade fraca ou Indefinido |
| 3+ | Imunoreação forte e completa desenhando todo o contorno da membrana em mais de 10% das células tumorais | Positividade forte |

De acordo com os resultados das reações IIQ, foram identificados cinco (5) subgrupos de casos caracterizados pela presença ou ausência de expressão de alguns dos marcadores, conforme especificado abaixo:

1. Basalóide: negatividade para receptores hormonais (ER e PR), negatividade para HER2, com positividade de uma ou mais das citoceratinas basais (CK 5.6, CK 14 e CK 17).
2. Receptores hormonais positivos – HER2 negativos: positividade para um dos receptores hormonais (ER+ e / ou PR+); negatividade para HER2 (HER2-).
3. HER2 positivos / receptores hormonais negativos (ER- e PR-).
4. Receptores hormonais positivos – HER2 positivos: positividade para um ou ambos os receptores hormonais (ER+ e / ou PR+); positividade para HER2 (HER2+)
5. “Null”: grupo com negatividade para receptores hormonais, HER2 e CKs basais (ER-, PR-, HER2-, CKs basais -).

Os casos do grupo “Null” evidenciaram positividade variável para os demais marcadores, o que atesta a preservação do tecido para as análises.

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS E RESULTADOS

Os resultados obtidos foram analisados utilizando-se os programas de computador SPSS v13 (SPSS Inc. USA, 2004) e GraphPad Prism v.4.02 (Graphpad Software Inc. USA, 2000). A análise univariada das variáveis

clínicas e bio-moleculares foi feita pela comparação das curvas de Kaplan-Meier através do teste de Log-rank com nível de significância de 5%.

As associações entre variáveis categóricas foram realizadas pelo teste de Quiquadrado (χ^2). Em todos os testes o nível de significância considerado foi de 5%.

A análise multivariada foi feita através do modelo de riscos proporcionais de Cox, e a técnica de modelagem utilizada foi a de *Stepwise Forward Selection*, com nível de significância de 5%.

5 RESULTADOS

Foram analisados neste estudo 1.167 casos de pacientes cuja revisão histológica das amostras confirmou o diagnóstico de carcinoma ductal invasivo.

A revisão histológica de todos os casos seguiu as normas da Classificação Internacional dos Tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS) (TAVASSOLI e DEVILEE 2003).

O grupo total de pacientes (estádios clínicos I a IV – EC I a IV) foi dividido em subgrupos de casos com doença localizada (estádios clínicos I e II – EC I e II) e com doença avançada (estádios clínicos III e IV – EC III e IV). Essa divisão foi feita com o intuito de poder discriminar e avaliar de forma mais detalhada as características de cada subgrupo, na tentativa de fornecer informações que possam auxiliar na tomada de decisão terapêutica e que traduzissem de forma mais fidedigna o prognóstico das pacientes.

A distribuição das características clínico-demográficas e histomorfológicas de cada grupo (grupo total, grupo de doença localizada – EC I e II; grupo de doença avançada – EC III e IV), bem como os resultados da análise da expressão dos diferentes marcadores imunoistoquímicos serão relacionados separadamente a seguir.

Tabela 14 - Associação dos casos segundo história familiar de câncer de mama e estadiamento clínico agrupado ($p = 0,139$).

| História familiar | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | p |
|-------------------|-----------|-------|-------------|-------|-------|-----|-------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| Não | 371 | 34,93 | 468 | 44,07 | 839 | 79 | 0,139 |
| Sim | 111 | 10,45 | 112 | 10,55 | 223 | 21 | |
| Total com dado | 482 | 45,39 | 580 | 54,61 | 1062 | 100 | |

Tabela 15 – Associação dos casos segundo a cor e estádios clínicos agrupados ($p = 0,001$).

| Cor | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | p |
|-------------------------|-----------|--------|-------------|--------|-------|---------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| Branca | 447 | 47,20% | 501 | 52,80% | 948 | 100,00% | 0,001 |
| Negra, parda, mulata | 27 | 27,30% | 72 | 72,70% | 99 | 100,00% | |
| Amarela | 28 | 49,10% | 29 | 50,90% | 57 | 100,00% | |
| Total | 502 | 45,50% | 602 | 54,50% | 1104 | 100,00% | |

5.1 SOBREVIDA GLOBAL

A associação dos estádios clínicos separados e agrupados (doença localizada - EC I e II; e avançada - EC III e IV) com a sobrevida global está representada nas Figuras 16 e 17.

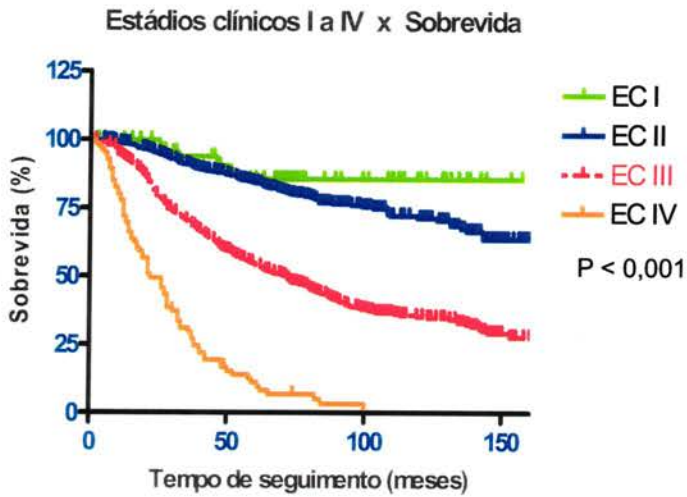


Figura 16 - Associação dos estádios clínicos e sobrevida (EC I a IV)

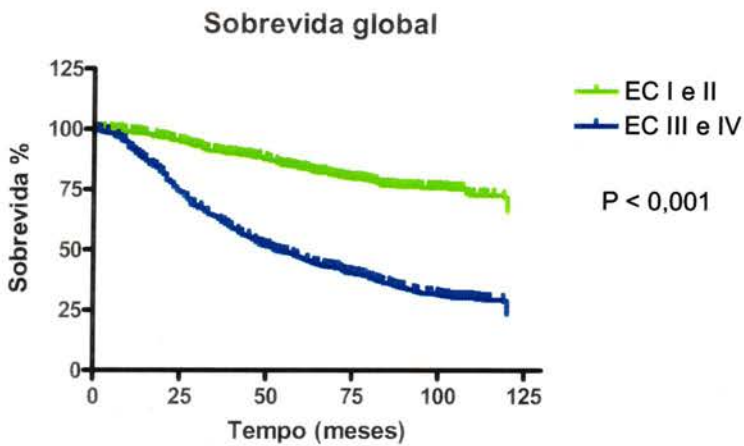


Figura 17 - Estádios clínicos agrupados (EC I-II x EC III-IV): associação com sobrevida global.

5.2 TAMANHO DOS TUMORES

O tamanho dos tumores foi obtido segundo os laudos originais dos exames anatomopatológicos, uma vez que essa informação é colhida durante o exame macroscópico da peça cirúrgica, com os dados dispostos na Tabela 16.

Tabela 16 - Associação dos casos segundo o tamanho tumoral (pT) e estadiamento clínico agrupado.

| Tamanho tumoral | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | p |
|--------------------|-----------|--------|-------------|--------|-------|---------|---------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| Até 2,0 cm (pT1) | 134 | 75,70% | 43 | 24,30% | 177 | 100,00% | < 0,001 |
| 2,1 a 5,0 cm (pT2) | 313 | 54,90% | 257 | 45,10% | 570 | 100,00% | |
| > 5,0 cm (pT3) | 55 | 17,00% | 269 | 83,00% | 324 | 100,00% | |
| Total | 502 | 46,90% | 569 | 53,10% | 1071 | 100,00% | |

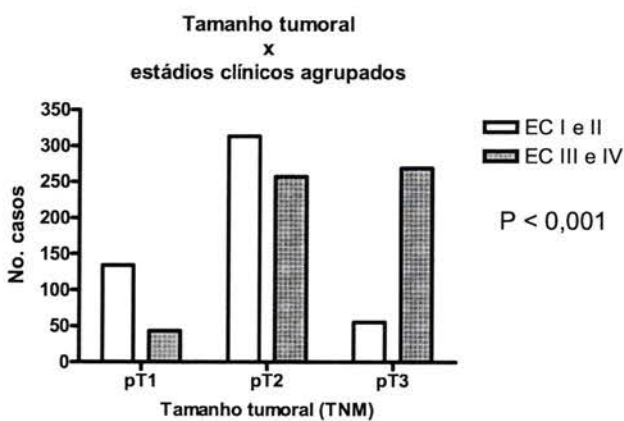


Figura 18 - Distribuição dos casos segundo o tamanho tumoral (pT) e estadiamento clínico agrupado

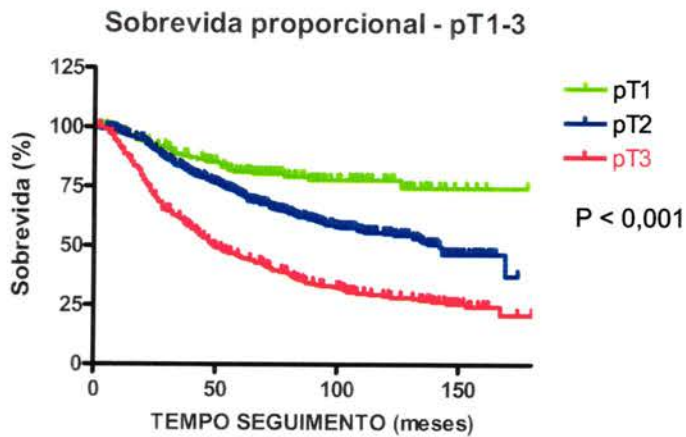


Figura 19 – Sobrevida proporcional de acordo com o tamanho tumoral (amostra total - EC I a IV).

5.3 REVISÃO HISTOLÓGICA

Todos os casos da amostra são do tipo ductal infiltrativo. A revisão histológica realizada (MMAS) seguiu as normas da Classificação Internacional dos Tumores da OMS (TAVASSOLI e DEVILEE 2003). Foram compilados também os dados referentes à presença (análise semi-quantitativa) de necrose tumoral, infiltrado inflamatório peritumoral, desmoplasia e presença de carcinoma ductal *in situ* associado à neoplasia invasiva. Verificamos a associação da semi-quantificação dos dados com a evolução clínica nas análises estatísticas, sendo que os resultados significativos foram descritos na Tabela 17.

A graduação histológica seguiu o sistema de Nottingham (ELSTON e ELLIS 1991). A análise da associação dos resultados com o estadiamento e evolução clínica estão dispostos na Tabela 17 e Figuras 20 e 21.

Tabela 17 - Distribuição dos casos segundo graduação histológica e estadiamento clínico ($p < 0,001$).

| Grau histológico | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | p |
|------------------|-----------|--------|-------------|--------|-------|---------|---------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| 1 | 90 | 56,60% | 69 | 43,40% | 159 | 100,00% | < 0,001 |
| 2 | 297 | 46,50% | 342 | 53,50% | 639 | 100,00% | |
| 3 | 130 | 39,40% | 200 | 60,60% | 330 | 100,00% | |
| Total | 517 | 45,80% | 611 | 54,20% | 1128 | 100,00% | |

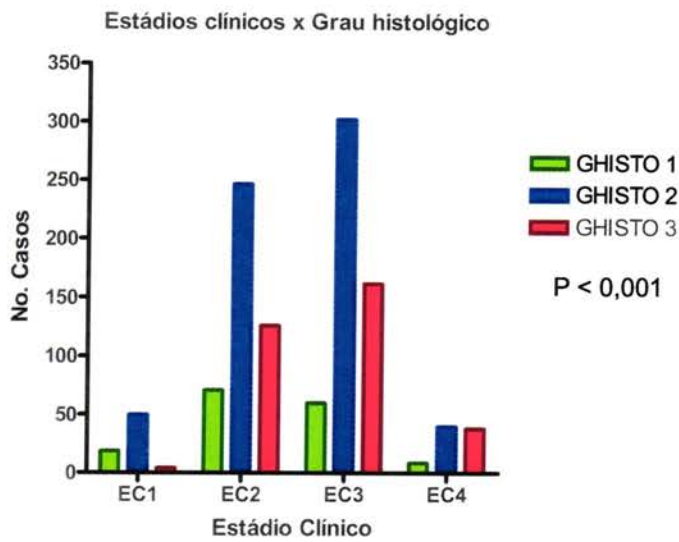


Figura 20 – Distribuição dos casos segundo o grau histológico – EC I a IV.

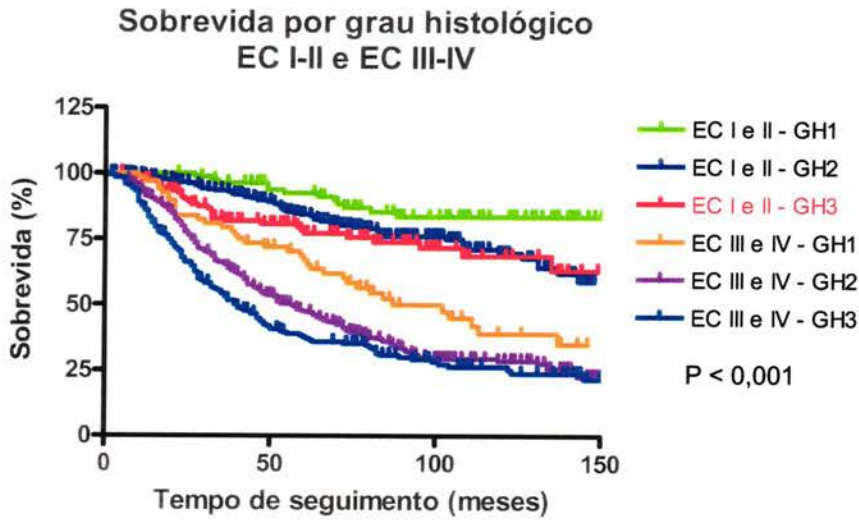


Figura 21 – Sobrevida de acordo com o grau histológico (GH) e estadiamento clínico (EC) agrupado.

O registro das informações morfológicas de grau nuclear, índice mitótico e intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral está relacionado nas tabelas abaixo, segundo a distribuição nos estádios clínicos agrupados.

Tabela 18 - Distribuição dos casos segundo graduação nuclear e correlação com o estadiamento clínico agrupado (EC) ($p = 0,029$)

| Grau nuclear | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | p |
|--------------|-----------|--------|-------------|--------|-------|---------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| 1 | 11 | 68,75% | 5 | 31,25% | 16 | 100,00% | 0,029 |
| 2 | 173 | 48,87% | 172 | 49,86% | 345 | 100,00% | |
| 3 | 333 | 43,42% | 434 | 56,58% | 767 | 100,00% | |
| Total | 517 | 45,83% | 611 | 54,17% | 1128 | 100,00% | |

Tabela 19 - Distribuição dos casos segundo índice mitótico e correlação com estadiamento clínico agrupado (EC) ($p = 0,001$).

| Índice mitótico* | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | P |
|------------------|-----------|--------|-------------|--------|-------|---------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| 1 | 348 | 30,91 | 342 | 30,37 | 690 | 61,28 | 0,001 |
| 2 | 165 | 14,65 | 257 | 22,82 | 422 | 37,48 | |
| 3 | 4 | 0,36 | 9 | 0,8 | 13 | 1,15 | |
| Total | 518 | 46,00% | 608 | 54,00% | 1126 | 100,00% | |

* ajustado segundo o diâmetro do campo microscópico utilizado neste estudo

Tabela 20 - Distribuição da intensidade do Infiltrado inflamatório peritumoral e correlação com estadiamento clínico agrupado ($p = 0,016$).

| Infiltrado inflamatório peritumoral | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | p |
|-------------------------------------|-----------|-------|-------------|-------|-------|-------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| 0 | 24 | 2,2 | 33 | 3,03 | 57 | 5,23 | 0,016 |
| 1 | 343 | 31,47 | 340 | 31,19 | 683 | 62,66 | |
| 2 | 121 | 11,1 | 187 | 17,16 | 308 | 28,26 | |
| 3 | 18 | 1,65 | 24 | 2,2 | 41 | 3,76 | |
| Total | 506 | 46,42 | 584 | 53,58 | 1090 | 100 | |

A informação sobre o status nodal foi obtida nos laudos originais do exame anatomopatológico das ressecções cirúrgicas (conservadoras ou radicais). A correlação dos casos de acordo com o estadiamento clínico foi registrada na Tabela 21.

Tabela 21 - Distribuição dos casos segundo o status nodal (não agrupado) e estadiamentos clínicos ($p < 0,001$).

| EC | pN0 | | pN1 | | pN2 | | pN3 | | pNx | | Total | |
|----------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|-------|-----|------|-------|-------|
| | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % | N | % |
| I | 71 | 6,08 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 71 | |
| II | 239 | 20,48 | 199 | 17,05 | 0 | 0 | 0 | 0 | 8 | 0,69 | 446 | 38,22 |
| III | 44 | 3,77 | 116 | 9,94 | 202 | 17,31 | 160 | 13,71 | 2 | 0,17 | 524 | 44,9 |
| IV | 6 | 0,51 | 6 | 0,51 | 54 | 4,63 | 20 | 1,71 | 1 | 0,09 | 87 | 7,46 |
| Ignorado | 1 | 0,09 | 1 | 0,09 | 1 | 0,09 | 1 | 0,09 | 35 | 3 | 39 | 3,34 |
| Total | 361 | 30,93 | 322 | 27,59 | 257 | 22,02 | 181 | 15,51 | 46 | 3,94 | 1167 | 100 |

EC: estágio clínico

pNx: status nodal ignorado ou não referido no laudo original

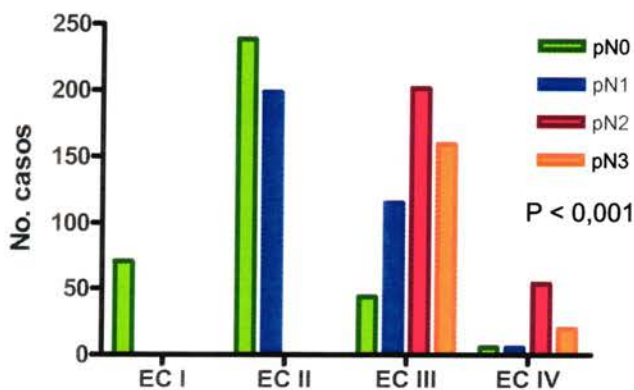


Figura 22 - Distribuição dos casos segundo estadiamento nodal não agrupado e clínico.

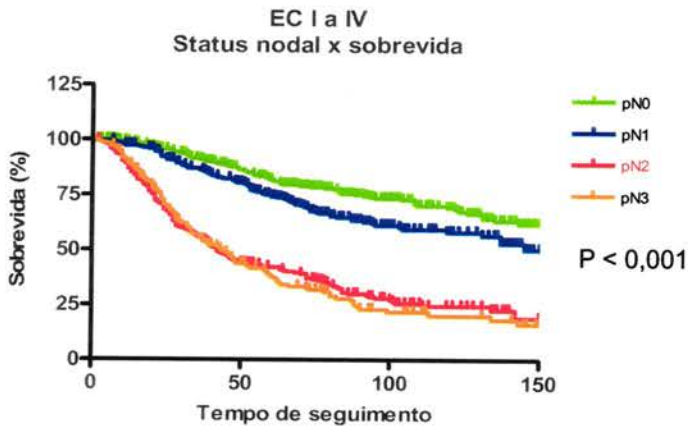


Figura 23 - Status nodal não agrupado e sobrevida (estádios clínicos I a IV)

Tabela 22 - Distribuição dos casos segundo a presença de metástases nodais e correlação com estadiamento clínico agrupado ($P < 0,001$).

| Meta linfonodal | Estádios I e II | | Estádios III e IV | | Total | | p |
|-----------------|-----------------|--------|-------------------|--------|-------|---------|---------|
| | N | % | N | % | N | % | |
| Não (pN0) | 310 | 86,10% | 50 | 13,90% | 360 | 100,00% | < 0,001 |
| Sim (pN1-3) | 199 | 26,30% | 558 | 73,70% | 757 | 100,00% | |
| Total | 509 | 45,60% | 608 | 54,40% | 1117 | 100,00% | |

Meta: metástase

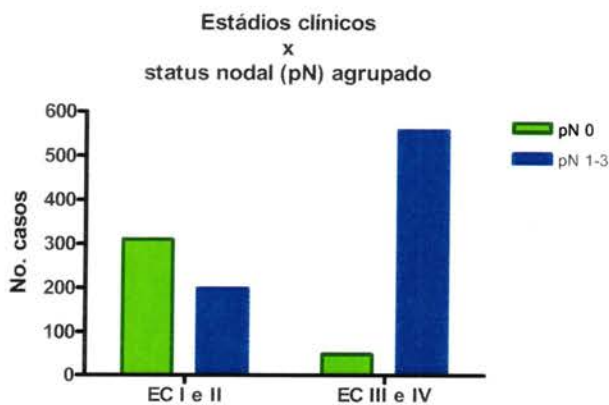


Figura 24 – Distribuição dos casos segundo estadiamento nodal e clínico (agrupados) ($P < 0,001$).

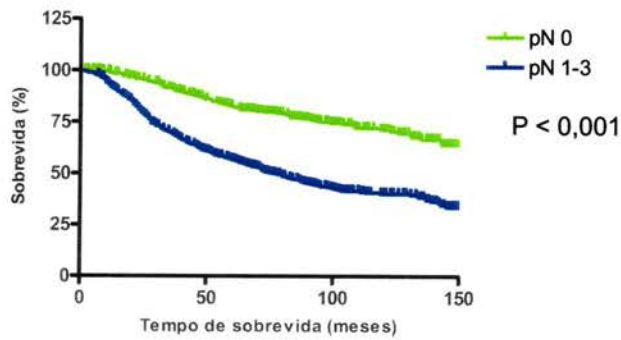


Figura 25 – Sobrevivida segundo status nodal (negativo x positivo) (estádios clínicos I a IV).

5.4 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Na análise das reações imunoistoquímicas observamos perda de alguns cortes de cilindros em decorrência de descolamento do tecido durante o preparo técnico. No total da amostra estudada (1.167 casos) a média de perdas foi de 8,62% (variação de 6,08 a 21,25% do total de 1.167 casos), com média de representatividade dos casos de 91,37% (Tabela 23).

Tabela 23 - Número de casos avaliáveis por marcador (EC I a IV).

| MARCADOR | Casos avaliáveis (%) | | Casos não-avaliáveis (%) | |
|----------------|----------------------|-------|--------------------------|------|
| CK5,6 | 1118 | 95,8 | 49 | 4,2 |
| CK8 | 1095 | 93,8 | 72 | 6,2 |
| CK13 | 1110 | 95,1 | 57 | 4,9 |
| CK14 | 1115 | 95,5 | 52 | 4,5 |
| CK17 | 1127 | 96,6 | 40 | 3,4 |
| CK18 | 1096 | 93,9 | 71 | 6,1 |
| ER | 1104 | 94,6 | 63 | 5,4 |
| PR | 1120 | 96,0 | 47 | 4,0 |
| Ki-67 | 1106 | 94,8 | 61 | 5,2 |
| p53 | 1133 | 97,1 | 34 | 2,9 |
| Escore HER | 1120 | 96,0 | 47 | 4,0 |
| p63 | 952 | 81,6 | 215 | 18,4 |
| EGFR | 1101 | 94,3 | 66 | 5,7 |
| EZRINA | 1113 | 95,4 | 54 | 4,6 |
| PSORIASINA | 1115 | 95,5 | 52 | 4,5 |
| MÉDIA | 1101,6 | 94,4 | 65,3 | 5,6 |
| TOTAL DE CASOS | 1167 | 100,0 | | |

Na Tabela 24 estão relacionados os resultados das reações IIQ para todos os anticorpos realizados, e sua associação com os estádios clínicos agrupados.

Na Tabela 25, a seguir, estão dispostos os subgrupos de casos definidos pelos perfis de expressão dos marcadores imunoistoquímicos anteriormente descritos, e sua distribuição nos grupos de doença localizada e avançada.

Tabela 24 - Distribuição dos casos segundo expressão dos marcadores imunoistoquímicos e estadiamentos clínicos agrupados.

| Marcador | | Estádios I e II | | Estádios III e IV | | Total | | p |
|----------------|--------------------|-----------------|---------|-------------------|--------|-------|---------|-------|
| | | N | % | N | % | N | % | |
| CK5,6 | Negativo | 214 | 50,20% | 212 | 49,80% | 426 | 100,00% | 0,048 |
| | Positivo (até 50%) | 221 | 42,30% | 302 | 57,70% | 523 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 59 | 44,70% | 73 | 55,30% | 132 | 100,00% | |
| | Total | 494 | 45,70% | 587 | 54,30% | 1081 | 100,00% | |
| CK8 membrana | Negativo | 2 | 100,00% | 0 | 0,00% | 2 | 100,00% | 0,29 |
| | Positivo (até 50%) | 14 | 50,00% | 14 | 50,00% | 28 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 476 | 46,20% | 555 | 53,80% | 1031 | 100,00% | |
| | Total | 492 | 46,40% | 569 | 53,60% | 1061 | 100,00% | |
| CK8 citoplasma | Negativo | 366 | 45,10% | 445 | 54,90% | 811 | 100,00% | 0,331 |
| | Positivo (até 50%) | 9 | 47,40% | 10 | 52,60% | 19 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 117 | 50,60% | 114 | 49,40% | 231 | 100,00% | |
| | Total | 492 | 46,40% | 569 | 53,60% | 1061 | 100,00% | |
| CK 13 | Negativo | 367 | 45,40% | 441 | 54,60% | 808 | 100,00% | 0,401 |
| | Positivo (até 50%) | 123 | 47,90% | 134 | 52,10% | 257 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 7 | 63,60% | 4 | 36,40% | 11 | 100,00% | |
| | Total | 497 | 46,20% | 579 | 53,80% | 1076 | 100,00% | |

Cont. Tabela 24

| Marcador | | Estádios I e II | | Estádios III e IV | | Total | | p |
|-----------------|--------------------|-----------------|--------|-------------------|--------|-------|---------|-------|
| | | N | % | N | % | N | % | |
| CK14 | Negativo | 471 | 46,50% | 542 | 53,50% | 1013 | 100,00% | 0,045 |
| | Positivo (até 50%) | 10 | 26,30% | 28 | 73,70% | 38 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 14 | 50,00% | 14 | 50,00% | 28 | 100,00% | |
| | Total | 495 | 45,90% | 584 | 54,10% | 1079 | 100,00% | |
| CK17 | Negativo | 31 | 52,50% | 28 | 47,50% | 59 | 100,00% | 0,554 |
| | Positivo (até 50%) | 260 | 46,00% | 305 | 54,00% | 565 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 210 | 45,10% | 256 | 54,90% | 466 | 100,00% | |
| | Total | 501 | 46,00% | 589 | 54,00% | 1090 | 100,00% | |
| CK18 membrana | Negativo | 60 | 43,80% | 77 | 56,20% | 137 | 100,00% | 0,152 |
| | Positivo (até 50%) | 19 | 33,90% | 37 | 66,10% | 56 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 406 | 46,80% | 461 | 53,20% | 867 | 100,00% | |
| | Total | 485 | 45,80% | 575 | 54,20% | 1060 | 100,00% | |
| CK18 citoplasma | Negativo | 375 | 45,10% | 457 | 54,90% | 832 | 100,00% | 0,02 |
| | Positivo (até 50%) | 15 | 31,30% | 33 | 68,80% | 48 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 95 | 52,80% | 85 | 47,20% | 180 | 100,00% | |
| | Total | 485 | 45,80% | 575 | 54,20% | 1060 | 100,00% | |

Cont. Tabela 24

| Marcador | | Estádios I e II | | Estádios III e IV | | Total | | p |
|----------|--------------------|-----------------|--------|-------------------|--------|-------|---------|---------|
| | | N | % | N | % | N | % | |
| RE | Negativo | 107 | 37,40% | 179 | 62,60% | 286 | 100,00% | 0,002 |
| | Positivo (até 50%) | 111 | 46,80% | 126 | 53,20% | 237 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 275 | 50,40% | 271 | 49,60% | 546 | 100,00% | |
| | Total | 493 | 46,10% | 576 | 53,90% | 1069 | 100,00% | |
| PR | Negativo | 145 | 40,30% | 215 | 59,70% | 360 | 100,00% | < 0,001 |
| | Positivo (até 50%) | 216 | 44,20% | 273 | 55,80% | 489 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 137 | 58,30% | 98 | 41,70% | 235 | 100,00% | |
| | Total | 498 | 45,90% | 586 | 54,10% | 1084 | 100,00% | |
| p63 | Negativo | 42 | 42,90% | 56 | 57,10% | 98 | 100,00% | 0,44 |
| | Positivo (até 50%) | 143 | 50,20% | 142 | 49,80% | 285 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 254 | 47,40% | 282 | 52,60% | 536 | 100,00% | |
| | Total | 439 | 47,80% | 480 | 52,20% | 919 | 100,00% | |
| p53 | Negativo | 2 | 25,00% | 6 | 75% | 8 | 100,00% | 0,431 |
| | Positivo (até 50%) | 129 | 45,10% | 157 | 54,90% | 286 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 375 | 46,80% | 427 | 53,20% | 802 | 100,00% | |
| | Total | 506 | 46,20% | 590 | 53,80% | 1096 | 100,00% | |

Cont. Tabela 24

| Marcador | | Estádios I e II | | Estádios III e IV | | Total | | p |
|------------------|--------------------|-----------------|--------|-------------------|--------|-------|---------|-------|
| | | N | % | N | % | N | % | |
| Psoriasina | Negativo | 393 | 44,70% | 486 | 55,30% | 879 | 100,00% | 0,246 |
| | Positivo (até 50%) | 77 | 51,30% | 73 | 48,70% | 150 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 25 | 51,00% | 24 | 49,00% | 49 | 100,00% | |
| | Total | 495 | 45,90% | 583 | 54,10% | 1078 | 100,00% | |
| Ezrin citoplasma | Negativo | 218 | 44,90% | 268 | 55,10% | 486 | 100,00% | 0,008 |
| | Positivo (até 50%) | 161 | 42,10% | 221 | 57,90% | 382 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 117 | 55,20% | 95 | 44,80% | 212 | 100,00% | |
| | Total | 496 | 45,90% | 584 | 54,10% | 1080 | 100,00% | |
| Ezrina membrana | Negativo | 367 | 45,20% | 445 | 54,80% | 812 | 100,00% | 0,31 |
| | Positivo (até 50%) | 115 | 46,90% | 130 | 53,10% | 245 | 100,00% | |
| | Positivo (> 50%) | 14 | 60,90% | 9 | 39,10% | 23 | 100,00% | |
| | Total | 496 | 45,90% | 584 | 54,10% | 1080 | 100,00% | |
| EGFR citoplasma | < 10% | 83 | 42,10% | 114 | 57,90% | 197 | 100,00% | 0,232 |
| | 10% ou mais | 407 | 46,80% | 462 | 53,20% | 869 | 100,00% | |
| | Total | 490 | 46,00% | 576 | 54,00% | 1066 | 100,00% | |

Cont. Tabela 24

| Marcador | | Estádios I e II | | Estádios III e IV | | Total | | p |
|------------------|--------------------|-----------------|--------|-------------------|--------|-------|---------|-------|
| | | N | % | N | % | N | % | |
| EGFR membrana | < 10% | 465 | 46,70% | 530 | 53,30% | 995 | 100,00% | 0,048 |
| | 10% ou mais | 25 | 34,70% | 47 | 65,30% | 72 | 100,00% | |
| | Total | 490 | 45,90% | 577 | 54,10% | 1067 | 100,00% | |
| Ki-67 | Baixa atividade | 157 | 45,00% | 192 | 55,00% | 349 | 100,00% | 0,453 |
| | Moderada atividade | 250 | 47,60% | 275 | 52,40% | 525 | 100,00% | |
| | Intensa atividade | 84 | 42,60% | 113 | 57,40% | 197 | 100,00% | |
| | Total | 491 | 45,80% | 580 | 54,20% | 1071 | 100,00% | |
| Escore HER2 | Negativo | 450 | 47,60% | 496 | 52,40% | 946 | 100,00% | 0,003 |
| | Positivo | 47 | 34,10% | 91 | 65,90% | 138 | 100,00% | |
| | Total | 497 | 45,80% | 587 | 54,20% | 1084 | 100,00% | |
| Escore HER2 | Negativo | 392 | 47,90% | 427 | 52,10% | 819 | 100,00% | 0,011 |
| | Positivo/duvidoso | 58 | 45,70% | 69 | 54,30% | 127 | 100,00% | |
| | Positivo | 47 | 34,10% | 91 | 65,90% | 138 | 100,00% | |
| | Total | 497 | 45,80% | 587 | 54,20% | 1084 | 100,00% | |

Tabela 25 - Distribuição dos casos segundo perfis de expressão combinada de marcadores imunoistoquímicos e estadiamentos clínicos agrupados.

| Perfil imunoistoquímico | | EC I e II | | EC III e IV | | Total | | p |
|-----------------------------|-------|-----------|--------|-------------|--------|-------|---------|-------|
| | | N | % | N | % | N | % | |
| Basalóide | | | | | | | | |
| | Não | 432 | 46,60% | 495 | 53,40% | 927 | 100,00% | 0,369 |
| | Sim | 60 | 42,60% | 81 | 57,40% | 141 | 100,00% | |
| | Total | 492 | 46,10% | 576 | 53,90% | 1068 | 100,00% | |
| HR positivo | | | | | | | | |
| | Não | 108 | 37,80% | 178 | 62,20% | 286 | 100,00% | 0,001 |
| | Sim | 380 | 49,00% | 395 | 51,00% | 775 | 100,00% | |
| | Total | 488 | 46,00% | 573 | 54,00% | 1061 | 100,00% | |
| HER2 positivo - HR negativo | | | | | | | | |
| | Não | 472 | 46,60% | 541 | 53,40% | 1013 | 100,00% | 0,056 |
| | Sim | 16 | 32,70% | 33 | 67,30% | 49 | 100,00% | |
| | Total | 488 | 46,00% | 574 | 54,00% | 1062 | 100,00% | |
| HER2 positivo - HR positivo | | | | | | | | |
| | Não | 457 | 46,90% | 517 | 53,10% | 974 | 100,00% | 0,035 |
| | Sim | 31 | 35,20% | 57 | 64,80% | 88 | 100,00% | |
| | Total | 488 | 46,00% | 574 | 54,00% | 1062 | 100,00% | |
| Null | | | | | | | | |
| | Não | 506 | 46,30% | 588 | 53,70% | 1094 | 100,00% | 0,056 |
| | Sim | 1 | 12,50% | 7 | 87,50% | 8 | 100,00% | |
| | Total | 507 | 46,00% | 595 | 54,00% | 1102 | 100,00% | |

IIQ: imunoistoquímica; EC: estádios clínicos; HR: receptores hormonais; HER2: escore HER2 3+ / positividade forte com padrão de membrana em > 10% das células neoplásicas
 Basalóide: HR negativos, HER2 negativos e uma ou mais das CKs basais positivas (CK5.6, CK 14, CK 17); Null: HR negativos, HER2 negativos, CKs basais negativas.

5.4.1 Análise da expressão dos marcadores imunoistoquímicos, características demográficas e histológicas com a sobrevida global

Os resultados dos níveis de expressão imunoistoquímica de cada marcador, características demográficas, clínicas e histológicas foram analisados quanto a eventual associação ao tempo de sobrevida global em 60 meses das pacientes, segundo significância em pelo menos um dos grupos (EC I e II – EC III e IV) (Tabela 26).

Tabela 26 – Análise univariada dos resultados imunoistoquímicos, características clínico-demográficas e histológicas, segundo estádios clínicos agrupados (EC I e II e EC III e IV).

| ANÁLISE UNIVARIADA (Sobrevida global - 60 meses) | | | |
|---|------------------|-------------------------------|------------------|
| EC I e II – variáveis | p | EC III e IV - variáveis | p |
| Índice mitótico | <0,001 | Índice mitótico | 0,039 |
| RE | <0,001 | RE | <0,001 |
| RP | <0,001 | RP | <0,001 |
| HR positivos - HER2 negativos | <0,001 | HR positivos - HER2 negativos | <0,001 |
| HER2 positivos - HR negativos | <0,001 | HER2 positivos - HR negativos | 0,018 |
| Score HER2 (3+) x (0-2+) | 0,001 | Score HER2 (3+) x (0-2+) | <0,001 |
| Grau histológico | 0,005 | Grau histológico | <0,001 |
| Necrose | 0,011 | Necrose | 0,065 |
| Grau nuclear | 0,019 | Grau nuclear | 0,012 |
| Basalóides | 0,022 | Basalóides | <0,001 |
| Ki-67 | 0,057 | Ki-67 | 0,008 |
| CK 5,6 | 0,093 | CK 5,6 | 0,044 |
| Psoriasina | 0,18 | Psoriasina | 0,055 |
| Idade | 0,412 | Idade | 0,079 |
| Menopausa | 0,207 | Menopausa | 0,162 |
| CDIS | 0,416 | CDIS | 0,019 |
| Inflamação | 0,513 | Inflamação | 0,021 |
| Ezrina citoplasmática | 0,846 | Ezrina citoplasmática | 0,023 |
| Status nodal (pN0 x pN1-3) | 0,818 | Status nodal (pN0 x pN1-3) | 0,001 |
| Estádio (ECI x ECII) | 0,346 | Estádio (ECIII x EC IV) | <0,001 |

Valores em negrito e itálico: inversamente associados

Tabela 27 - Variáveis mais freqüentes no grupo de tumores basalóides (EC I a IV).

| VARIÁVEL | p | Variável mais freqüente nos basalóides |
|-------------------------------------|--------|--|
| Idade < ou > 50 | 0,884 | NS |
| Raça (cor) | 0,309 | NS |
| pT (1-3) | 0,008 | TUMORES > 5 cm (pT3) |
| GRAU HISTOLÓGICO | <0,001 | GH 3 |
| GRAU NUCLEAR | <0,001 | GN 3 |
| Necrose | <0,001 | NECROSE MAIS EXTENSA |
| Infiltrado inflamatório peritumoral | 0,004 | MAIOR INFILTRADO INFLAMATÓRIO |
| CDIS associado | 0,944 | NS |
| Status nodal (pN0 x pN1-3) | 0,699 | NS |
| Status menopausal | 0,876 | NS |
| História familiar (não x sim) | 0,885 | NS |
| ESTÁDIO CLÍNICO (I a IV) | 0,0127 | NS |
| Ki-67 | <0,001 | ALTA ATIVIDADE PROLIFERATIVA |
| CK8 membrana | 0,017 | CK8m NEGATIVA |
| CK8 citoplasma | 0,001 | CK8c NEGATIVA |
| CK13 | 0,88 | NS |
| CK18 membrana | <0,001 | CK18m NEGATIVA |
| CK18 citoplasma | 0,169 | NS |
| P53 | 0,284 | NS |
| P63 | 0,021 | p63 NEGATIVA |
| EGFR citoplasma | 0,873 | NS |
| EGFR membrana | <0,001 | EGFR m FORTE |
| EZRINA citoplasma | <0,001 | EZRINA c NEGATIVA |
| EZRINA membrana | <0,001 | EZRINA m NEGATIVA |
| Psoriasina | 0,158 | NS |

NS: não significativo

5.4.2 Associação dos subgrupos de expressão combinada de marcadores IIQ com sobrevida global de acordo com os estádios clínicos agrupados

- A Subgrupo basalóide: negatividade para receptores hormonais (ER e PR), negatividade para HER2, com positividade de uma ou mais das citoceratinas basais (CK 5.6, CK 14 e CK 17).

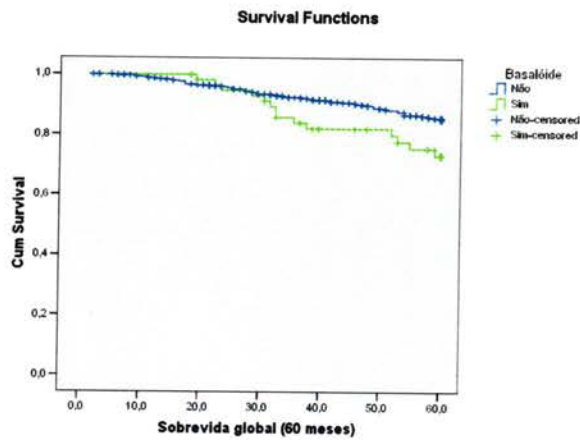


Figura 26 - Sobrevida cumulativa do subgrupo basalóide (EC I e II) (P = 0,026)

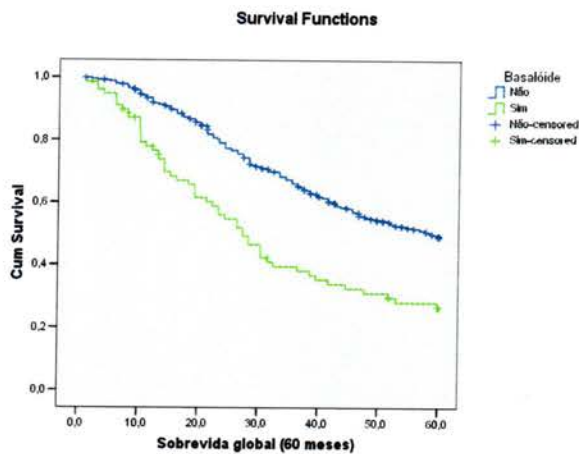


Figura 27 - Sobrevida cumulativa do subgrupo basalóide (EC III e IV – doença avançada) (P <0,001)

- B** Receptores hormonais positivos – HER2 negativos: positividade para um dos receptores hormonais (ER+ e / ou PR+); negatividade para HER2 (HER2-).

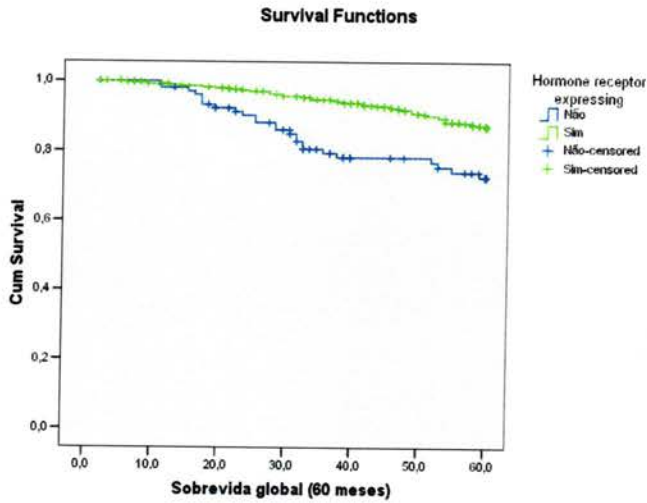


Figura 28 – Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 negativos (EC I e II - doença localizada) (P <0,001)

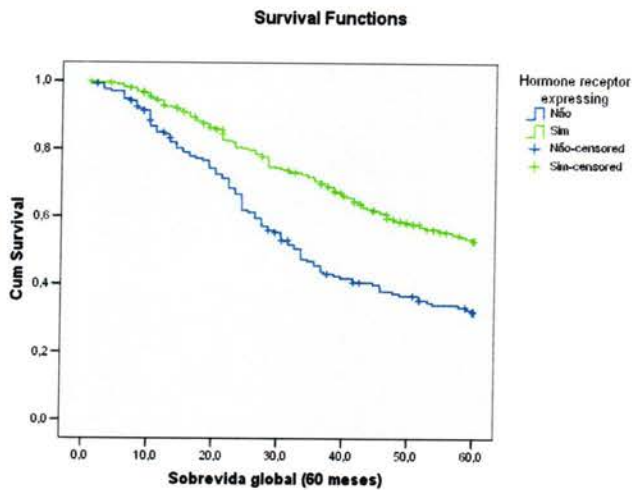


Figura 29 – Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 negativos (EC III e IV - doença avançada) (P <0,001)

C HER2 positivos / receptores hormonais negativos (ER- e PR-).

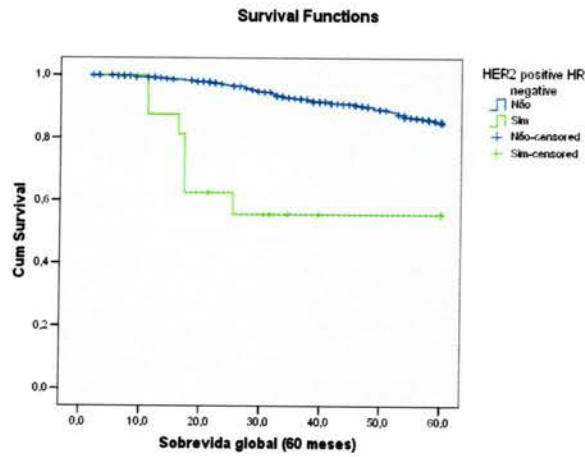


Figura 30 - Sobrevida cumulativa do subgrupo HER2 positivos / receptores hormonais negativos (EC I e II - doença localizada) ($P < 0,001$)

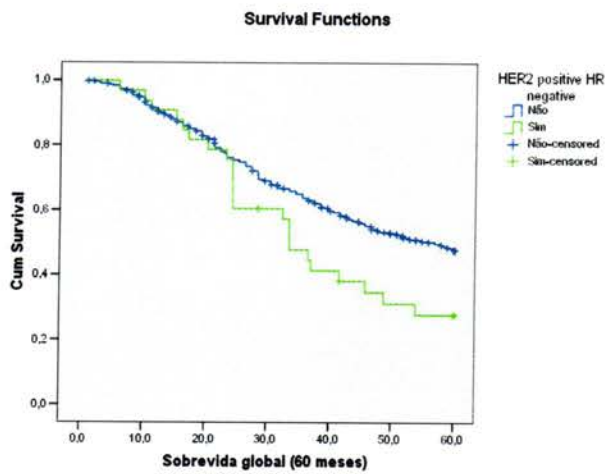


Figura 31 - Sobrevida cumulativa do subgrupo HER2 positivos / receptores hormonais negativos (EC III e IV - doença avançada) ($P = 0,025$)

- D** Receptores hormonais positivos – HER2 positivos: positividade para um ou ambos os receptores hormonais (ER+ e / ou PR+); positividade para HER2 (HER2+).

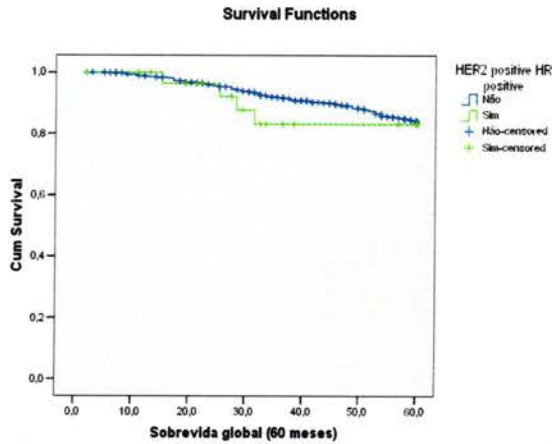


Figura 32 – Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 positivos (EC I e II - doença localizada) (P = 0,673)

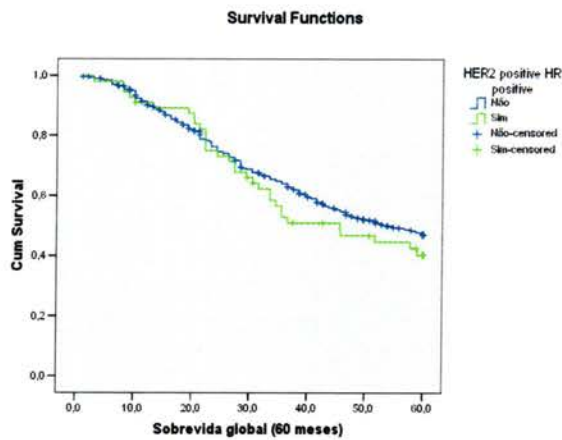


Figura 33 – Sobrevida cumulativa do subgrupo receptores hormonais positivos – HER2 positivos (EC III e IV - doença avançada) (P = 0,368)

- E** Null: grupo com negatividade para receptores hormonais, HER2 e CKs basais (ER-, PR-, HER2-, CKs basais -).

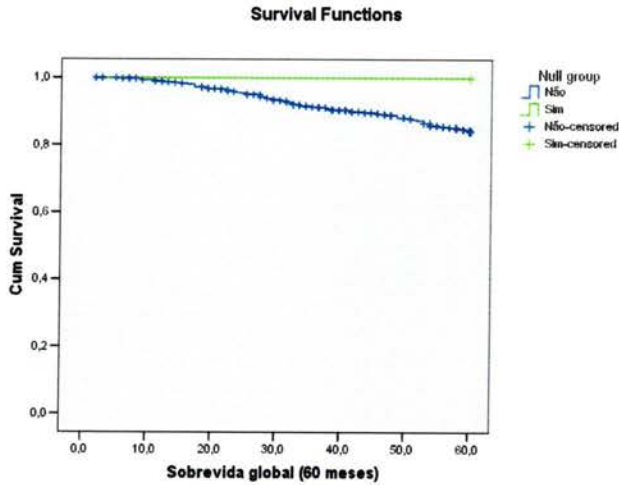


Figura 34 – Sobrevida cumulativa do subgrupo “null” (EC I e II - doença localizada) ($P = 0,678$)

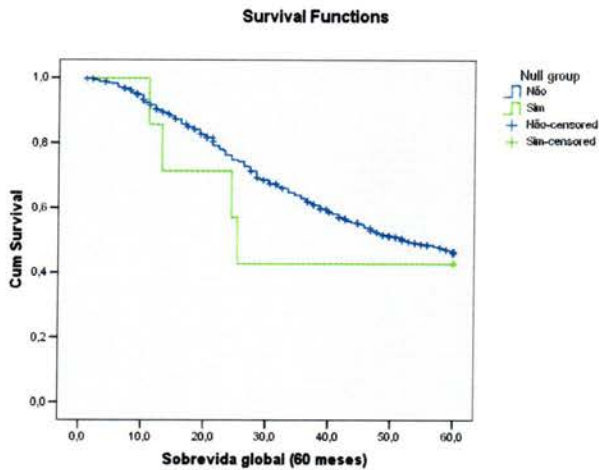


Figura 35 – Sobrevida cumulativa do subgrupo “null” (EC III e IV - doença avançada) ($P = 0,6$).

5.4.3 Curvas de sobrevida comparativas dos grupos de expressão imunohistoquímica segundo estádios clínicos agrupados.

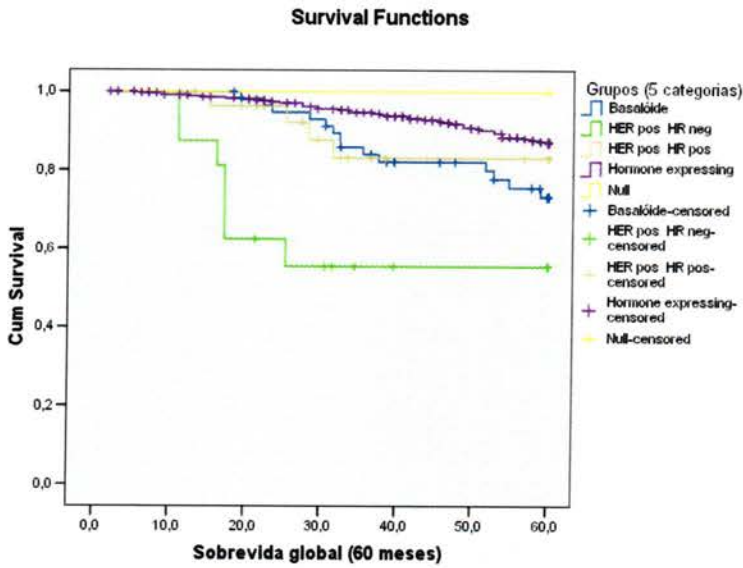


Figura 36 – Sobrevida cumulativa dos subgrupos de expressão imunohistoquímica (EC I e II - doença localizada) ($P < 0,001$)

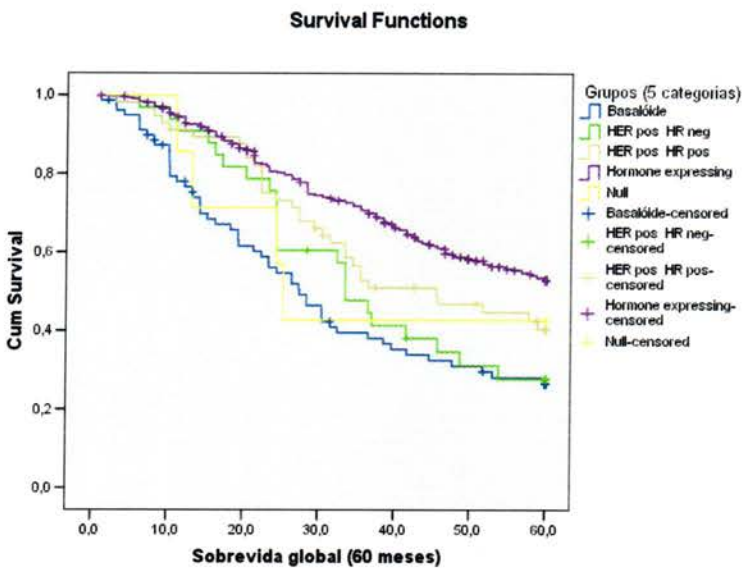


Figura 37 – Sobrevida cumulativa dos subgrupos de expressão imunohistoquímica (EC III e IV - doença avançada) ($P < 0,001$)

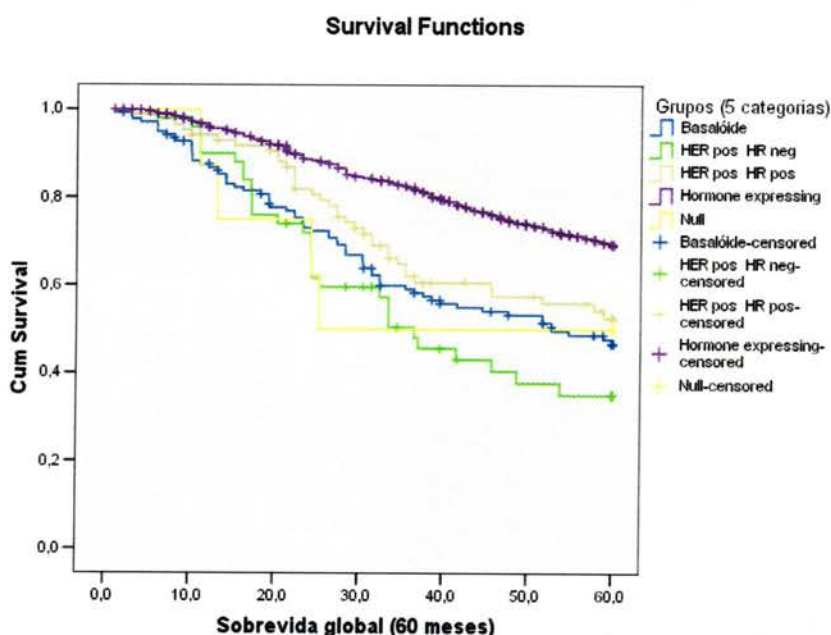


Figura 38 – Sobrevida dos subgrupos de expressão imunoistoquímica no grupo total de pacientes (EC I a IV) ($P < 0,001$)

5.5 ESTABELECIMENTO DE GRUPOS DE RISCO DE ACORDO COM VARIÁVEIS QUE TIVERAM SIGNIFICÂNCIA NA ANÁLISE MULTIVARIADA

5.5.1 Grupo Doença Localizada (EC I e II)

Todas as variáveis clínicas e biológicas significantes ($P \leq 0,05$) na análise univariada (vide Tabela 26) participaram do modelo de regressão de Cox. Os fatores de risco independentes para o óbito relacionado à doença no grupo de doença localizada (EC I e II) foram a expressão de receptores de estrógeno, o escore de HER2 com 3 categorias (negativo – escores 0 e

1+; positivo duvidoso – escore 2+; e positivo forte – escore 3+), e o período de admissão e início do tratamento.

Tabela 28 - Fatores de risco independentes para óbito segundo o modelo de riscos proporcionais de Cox (estádios clínicos I e II).

| Variável | Categoria | P | HR | IC95% (HR) |
|------------------------|---------------------|---------|-----|------------|
| Receptor de estrogênio | Positivo (> 50%) | - | 1,0 | Referência |
| | Positivo (até 50%) | 0,527 | 1,2 | 0,4 – 2,4 |
| | Negativo | < 0,001 | 2,8 | 1,6 – 4,9 |
| Escore HER | Negativo | - | 1,0 | Referência |
| | Positivo (duvidoso) | 0,847 | 1,1 | 0,5 – 2,4 |
| | Positivo | 0,013 | 2,4 | 1,2 – 4,7 |
| Período de admissão | Até 1994 | - | 1,0 | Referência |
| | 1995 a 2003 | 0,009 | 0,5 | 0,3 – 0,8 |

HR: Hazard ratio

IC95%: Intervalo de confiança de 95%

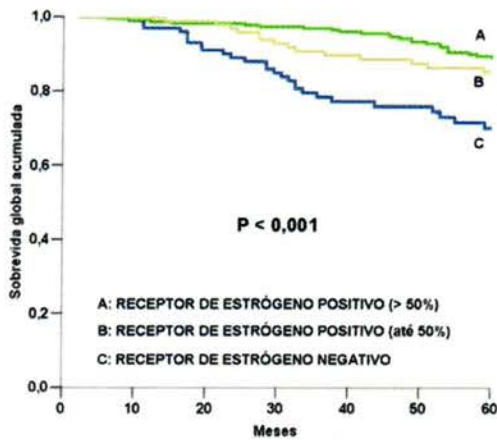


Figura 39 – Sobrevida cumulativa segundo expressão de receptores de estrogênio - EC I e II ($p < 0,001$)

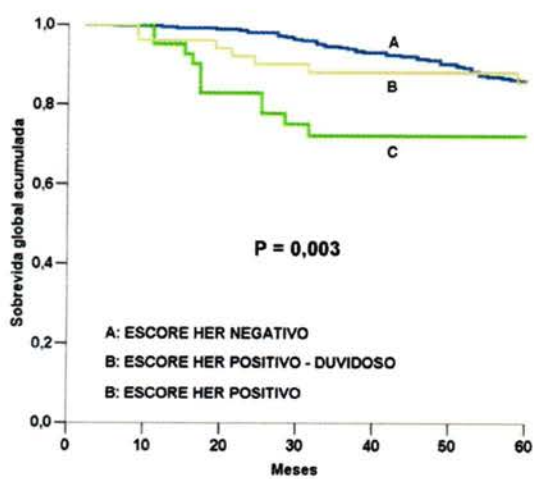


Figura 40 – Sobrevida cumulativa segundo o escore de HER2 - EC I e II ($p = 0,003$).

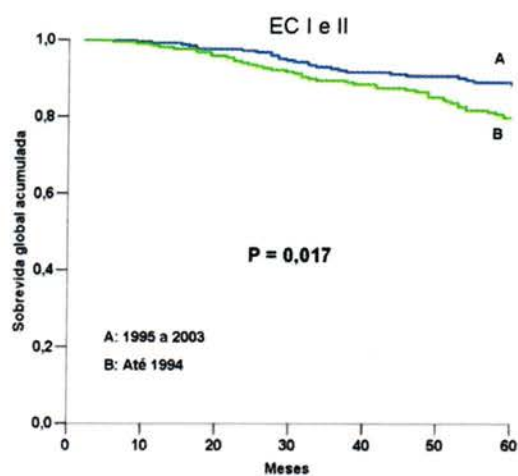


Figura 41 – Sobrevida cumulativa segundo os períodos de tratamento - EC I e II ($p < 0,001$)

As pacientes foram estratificadas em 4 grupos de acordo com o número de fatores de risco independentes para o óbito da análise multivariada (Cox).

As taxas de sobrevida global em 5 anos, de acordo com o número de fatores de risco para este grupo de pacientes foram de:

- Nenhum fator de risco: 93,5%
- Um fator de risco: 81,4%
- Dois fatores de risco: 68,3%
- Três fatores de risco: 57,1%

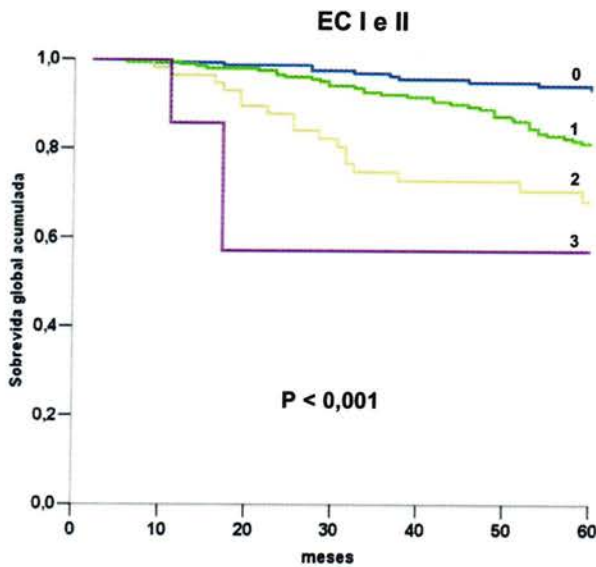


Figura 42 – Sobrevida segundo número de fatores de risco para óbito – estádios clínicos I e II ($P < 0,001$)

5.5.2 Grupo Doença Avançada (EC III e IV)

Da mesma forma que no grupo anterior, todas as variáveis clínicas e biológicas significantes ($P \leq 0,05$) (vide Tabela 26) na análise univariada das pacientes do grupo de doença avançada (EC III e IV) participaram do modelo de regressão de Cox. Os fatores de risco independentes para o óbito relacionado à doença destas pacientes foram a presença de metástases à distância, metástases nodais, a expressão de receptores de estrógeno e progesterona e a atividade proliferativa avaliada pela expressão do Ki-67.

Tabela 29 - Fatores de risco independentes para óbito segundo o modelo de riscos proporcionais de Cox (estádios clínicos III e IV).

| Variável | Categoria | P | HR | IC95% |
|--------------------------|--------------------|---------|-----|------------|
| Metástase à distância | Não (EC III) | | 1,0 | Referência |
| | Sim (EC IV) | < 0,001 | 3,9 | 2,9 – 5,1 |
| Metástase linfonodal | Não | | 1,0 | Referência |
| | Sim | < 0,001 | 2,8 | 1,6 – 5,0 |
| Receptor de estrógeno | Positivo (> 50%) | | 1,0 | Referência |
| | Positivo (até 50%) | 0,040 | 1,4 | 1,0 – 2,0 |
| | Negativo | 0,007 | 1,5 | 1,1 – 2,1 |
| Receptor de progesterona | Positivo (> 50%) | | 1,0 | Referência |
| | Positivo (até 50%) | 0,071 | 1,5 | 1,0 – 2,2 |
| | Negativo | < 0,001 | 2,5 | 1,6 – 3,8 |
| Ki 67 | Baixa atividade | | | Referência |
| | Moderada atividade | 0,095 | 1,3 | 1,0 – 1,7 |
| | Intensa atividade | 0,017 | 1,5 | 1,1 – 2,1 |

HR: Hazard ratio

IC95%: Intervalo de confiança de 95%

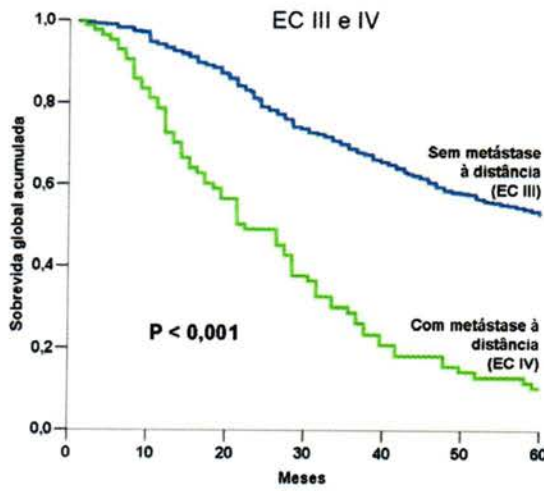


Figura 43 – Sobrevida cumulativa segundo a presença de metástases à distância - EC III e IV ($p < 0,001$)

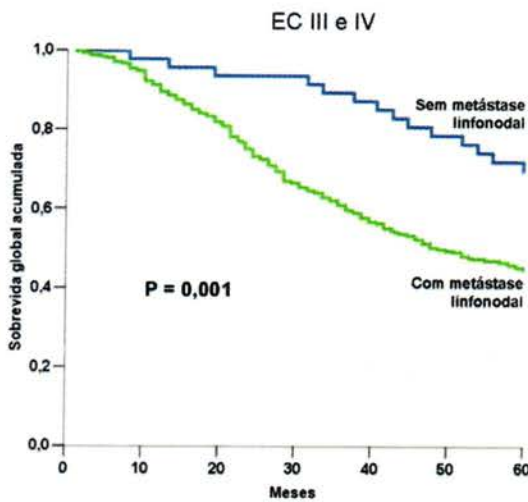


Figura 44 – Sobrevida cumulativa segundo a presença de metástases linfonodais - EC III e IV ($p = 0,001$)

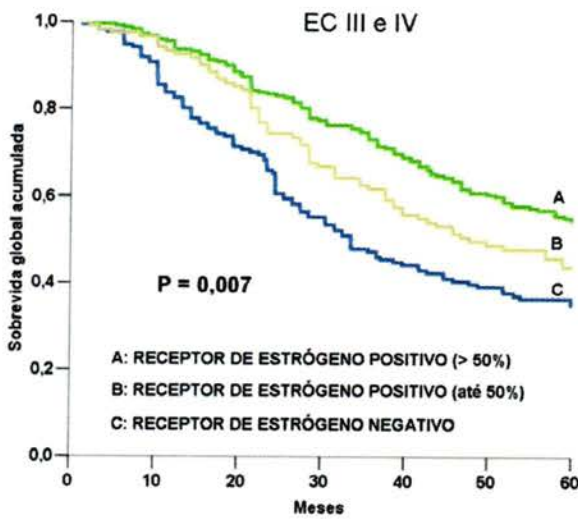


Figura 45 – Sobrevida cumulativa segundo a expressão de receptores de estrógeno - EC III e IV ($P = 0,007$).

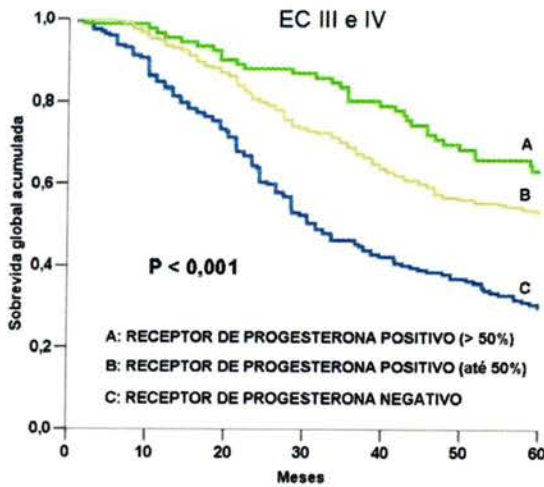


Figura 46 – Sobrevida cumulativa segundo a expressão de receptores de progesterona - EC III e IV ($P < 0,001$)

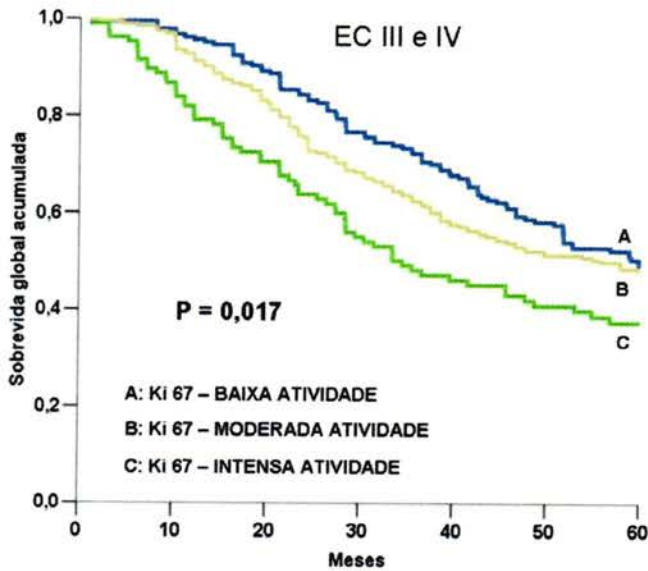


Figura 47 – Sobrevida cumulativa segundo a expressão de Ki-67 (atividade proliferativa) - EC III e IV (P = 0,017)

As pacientes foram estratificadas em 6 grupos de acordo com o número de fatores de risco independentes para o óbito da análise multivariada (Cox) (P < 0,001).

As taxas de sobrevida global em 5 anos de acordo com o número de fatores de risco para este grupo de pacientes foram de:

- Nenhum fator de risco: 50,0%
- Um fator de risco: 69,1%
- Dois fatores de risco: 48,3%
- Três fatores de risco: 30,2%
- Quatro fatores de risco: 17,4%
- Cinco fatores de risco: 0,00%

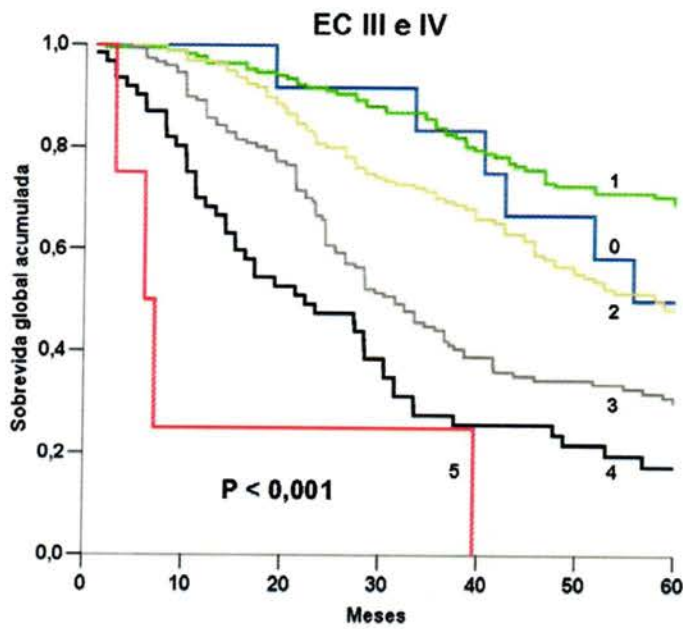


Figura 48 – Sobrevida segundo número de fatores de risco para óbito – estádios clínicos III e IV ($P < 0,001$)

6 DISCUSSÃO

Nos últimos anos, muitos estudos dos carcinomas mamários têm focado nos casos onde as características clínico-morfológicas e imunofenotípicas 'tradicionais' não permitem a identificação imediata das pacientes com maior risco de evolução desfavorável ou que terão menor resposta à quimioterapia e hormonioterapia adjuvantes. O desafio de encontrar marcadores biológicos que permitam a melhor discriminação dos casos com diferentes riscos de evolução dentro de cada grupo do estadiamento clínico é um dos grandes motivadores das inúmeras pesquisas sobre o câncer de mama.

Na rotina clínica, são utilizados para o planejamento terapêutico fatores prognósticos tradicionais, incluindo o estadiamento nodal, grau histológico tumoral, tamanho do tumor primário, a expressão dos receptores de estrógeno, progesterona e HER2. A expressão dos receptores hormonais e de HER2 tem grande importância na predição da resposta ao tratamento.

A eficácia da manipulação hormonal varia de acordo com o número de receptores hormonais expressos pelas células neoplásicas. Aproximadamente 85% dos casos com ambos receptores hormonais positivos apresentam boa resposta; cerca de 40% dos casos com expressão de apenas um dos receptores têm boa resposta; tumores negativos para ambos os receptores têm menos de 10% de resposta (DOWSETT et al. 2006; RAKHA et al. 2007a e b).

Particularmente, há grande interesse no estudo dos casos com negatividade para os receptores hormonais e para a proteína HER2, onde as opções terapêuticas são mais restritas.

Devido à reconhecida importância do estadiamento clínico em relação à sobrevida, é muito relevante, sob o ponto de vista prático para o Oncologista, a identificação de grupos de pacientes com diferentes riscos dentro de cada nível de estadiamento.

Na maioria dos casos precoces o estadiamento nodal é negativo (pN0), e as características anatomopatológicas (tamanho, tipo histológico, graus nuclear e histológico) não permitem a identificação fidedigna dos grupos de maior risco para evolução desfavorável.

As análises de expressão gênica em tecido mamário por diferentes autores (PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001; VAN'T VEER et al. 2002) permitiram a separação dos casos em 5 categorias de risco com diferentes perfis moleculares, sendo as duas mais relevantes designadas de grupos "hormone-expressing" (ou "luminal A") e "basalóide", com perfis de expressão e evolução clínica distintos, sendo o "basalóide" o grupo com pior prognóstico.

A validação desses achados em grandes séries de casos tem sido testada por diferentes grupos de pesquisa (VAN'T VEER et al. 2002; SORLIE et al. 2003; TROESTER et al. 2004; KREIKE et al. 2006; SORLIE et al. 2006; VANDEN BEMPT et al. 2006; RAKHA et al. 2006; RAKHA et al. 2007a e b; SORLIE 2007). Entretanto, há poucos estudos publicados com amostras significativas de tipos homogêneos de carcinomas mamários que

tenham analisado através do método de imunistoquímica as características relacionadas às diferenças de expressão gênica nos referidos grupos.

Os diferentes perfis IIQ devem refletir as características particulares de expressão gênica das diversas células do epitélio mamário que podem dar origem aos tumores. No entanto, essas diferenças de expressão gênica e imunistoquímica não se traduzem em características morfológicas que possam ser prontamente identificadas no exame anatomopatológico rotineiro. Daí a necessidade de complementação das análises através de métodos moleculares auxiliares para a identificação dos diferentes grupos de risco.

No presente estudo, avaliamos um grande número de pacientes com o diagnóstico exclusivo de carcinoma ductal invasivo SOE, com proporções equilibradas nos diferentes estádios clínicos e graus histológicos. Foi realizada revisão histológica da totalidade dos casos para confirmação do tipo e grau histológico (MMAS).

Estudamos a expressão das citoceratinas que caracterizam o fenótipo basal, associadamente à expressão de marcadores já bem estabelecidos como fatores preditivos e prognósticos no câncer de mama, num total de 15 marcadores. Esses fatores são os receptores hormonais, os receptores de fatores de crescimento epitelial (EGFR e HER2) e o marcador de proliferação celular Ki-67. Foram também avaliadas as expressões das proteínas p53 e p63, além das proteínas ezrina e psoriasina, intermediárias das vias de sinalização extra e intra-celulares e da interação dos receptores tirosino-quinase com as citoceratinas e outras proteínas do citoesqueleto

(TSUKITA e YONEMURA 1999; GAUTREAU et al. 1999; BRETSCHER et al. 2002).

Nosso trabalho tem uma amostragem ampla de casos constituída exclusivamente por carcinomas ductais infiltrativos mamários, num total de 1.167 pacientes femininas, com distribuição equilibrada nos diversos estádios clínicos (estádios clínicos I e II – 517 pacientes; estádios clínicos III e IV – 611 pacientes).

A homogeneidade de tipos histológicos desta amostra permitiu uma análise mais acurada da associação dos perfis de expressão imunohistoquímica com a evolução clínica, pois exclui o viés de agrupar nas análises tumores que freqüentemente têm perfil basalóide, porém apresentam comportamento biológico menos agressivo, tais como os carcinomas adenóide cístico, o medular e os secretores (ROSEN e CRANOR 1991; JENSEN et al. 1997; TRENDELL-SMITH et al. 1999).

O seguimento clínico das pacientes de nossa amostra foi bastante expressivo, com tempo médio de 75,9 meses para as pacientes do grupo de estádios clínicos I e II, e de 57,09 meses para as pacientes do grupo de estádios clínicos III e IV, conferindo importante respaldo aos resultados das associações com a evolução clínica observadas. Tivemos pequeno número de casos com perda de seguimento - apenas 12 pacientes (1% do total de casos).

Não foi observada associação significativa entre a história familiar positiva de câncer de mama nesta amostra e sobrevida ($P = 0,139$), tendo sido testados agrupamentos de diversas formas [(história negativa vs.

positiva); (história negativa vs. um familiar vs. dois ou mais familiares); (história negativa vs. um ou dois familiares vs. três ou mais familiares); (história negativa e até um familiar vs. dois ou mais familiares); (história negativa e até dois familiares vs. três ou mais familiares)]. Uma das hipóteses aventada para explicar este achado seria uma maior conscientização das familiares de pacientes que já tiveram a doença, com início do rastreamento mais precoce e, conseqüentemente, diagnóstico em estádios menos avançados. Não se assume aqui, ressaltamos, que todos os casos com história familiar positiva de câncer de mama estejam relacionados a eventual hereditariedade. Outros fatores de influência podem ser a origem étnica bastante miscigenada de nossa população, com menor incidência de grupos de risco de câncer hereditário, e hábitos alimentares diferenciados, refletidos nas diferentes taxas de incidência do câncer de mama por região do país.

Quanto à associação da cor com a sobrevida das pacientes, observamos em nossa casuística que aquelas referidas como “negras, pardas ou mulatas” tiveram evolução significativamente pior, com tamanhos tumorais maiores, maior número de óbitos, concentrando-se no grupo de estádios clínicos mais avançados, em consonância com os dados referidos na literatura. Além disso, nossos achados devem refletir a realidade de acesso restrito aos serviços de saúde, menor conscientização e nível sócio-econômico menos privilegiado desse grupo de pacientes. Não se pode desvalorizar também a grande subjetividade envolvida na categorização das

pacientes segundo os critérios de definição “clínica” ou “auto-declarada” da cor da pele.

Foi realizada a análise da evolução clínica de acordo com o estadiamento clínico registrado nos prontuários, com resultado significativo ($P < 0,001$), correspondente ao descrito em literatura.

No grupo total de pacientes deste estudo observamos que a média do tamanho tumoral foi significativamente grande - 4,42 cm, com mediana de 4,0 cm (desvio-padrão de 2,613 cm), provavelmente devido ao fato de cerca de metade de nossa amostra estar concentrada no período de 1980 a 1994 (diagnóstico e início do tratamento), anteriormente à disseminação do rastreamento mamográfico em maior escala em nossa população.

As características morfológicas foram analisadas com revisão microscópica de todos os casos em lâminas convencionais coradas pela hematoxilina / eosina, confirmando-se o tipo histológico ductal invasivo.

Características histológicas do exame anatomopatológico ‘rotineiro’ já fornecem importantes dados relacionados à evolução clínica: os graus histológico e nuclear, o índice mitótico, a extensão da necrose, a intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral, a presença de CDIS associado ao componente invasivo. Portanto, deve-se priorizar a excelência do processamento anatomopatológico, desde a fixação em tempos adequados, com formol corretamente diluído e preferencialmente tamponado, representação adequada do tumor para o exame microscópico, dissecação cuidadosa dos linfonodos axilares, avaliação microscópica minuciosa,

relatando todos os achados em laudo que siga os protocolos recomendados pela maioria dos serviços de referência mundiais em câncer de mama.

Na revisão e graduação histológica dos casos seguindo protocolos recomendados (ELSTON e ELLIS 1991; ROSEN e OBERMAN 1993), foram registrados também os dados referentes à presença de necrose, desmoplasia, intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral e presença de CDIS associado ao componente invasivo. Analisamos as eventuais associações dessas características histológicas, bem como das graduações histológica e nuclear com a sobrevida global das pacientes em 60 meses.

Observamos resultados significativos nos grupos de doença localizada (EC I-II) e avançada (EC III-IV) para as graduações histológica e nuclear e índice mitótico. No grupo de doença localizada (EC I e II), foi significativa a associação da necrose com a sobrevida ($P = 0,011$). No grupo de doença avançada (EC III e IV) houve associação da intensidade do infiltrado inflamatório peritumoral ($P = 0,021$) e da presença de CDIS associado ao componente invasivo ($P = 0,019$) com a sobrevida global.

As análises da sobrevida global em 60 meses de acordo com o tamanho tumoral, grau histológico, grau nuclear e estadiamento nodal mostraram resultados significativos, o que permite a validação de nossa amostra sob os pontos de vista clínico e morfológico (CARTER et al. 1989).

Ressaltamos que os dados referentes ao tamanho tumoral e estadiamento nodal foram compilados dos laudos anatomopatológicos originais do exame macroscópico na época do diagnóstico, porém os dados de graduação histológica e avaliação das demais características

histomorfológicas foram resultantes de nossa revisão quando da seleção dos casos para inclusão nos TMA.

O significado prognóstico do infiltrado inflamatório peritumoral tem sido abordado há vários anos (LEE et al. 1997, LEE AH 2006; HUSSEIN e HASSAN 2006), porém não existe consenso sobre sua associação com pior ou melhor evolução clínica. Em nossas análises encontramos pequeno predomínio, porém estatisticamente significativo, do maior infiltrado inflamatório peritumoral com a pior evolução clínica e menor sobrevida das pacientes no grupo de doença avançada (EC III-IV). Alguns autores postulam que a maior concentração de citocinas e enzimas proteolíticas liberadas pelas células inflamatórias e eventualmente pelas células epiteliais neoplásicas poderia estimular a invasão tumoral e a angiogênese (LEE et al. 1997). Os mesmos autores demonstraram posteriormente que o maior infiltrado inflamatório estaria associado a um melhor prognóstico, sugerindo que os mecanismos imunológicos da inflamação teriam efeito protetor predominante em relação aos efeitos pró-tumorais (LEE AH et al. 2006). Dessa forma, continua em aberto a elucidação definitiva de sua participação na evolução tumoral.

Nesta amostra observamos associação do índice mitótico com a sobrevida global em ambos os grupos (EC I-II e EC III-IV), porém, curiosamente, a avaliação imunoistoquímica da atividade proliferativa com o anticorpo Ki-67 foi significativa apenas no grupo de doença avançada (EC III-IV). Eventualmente, esse fato pode ser decorrente da avaliação do índice mitótico ter sido realizada nos cortes convencionais dos tumores, enquanto a

IIQ foi realizada nos blocos de TMA, com diferença na amostragem das áreas com maior atividade proliferativa da neoplasia ("hot spots").

Apesar de termos um número relativamente equilibrado de casos nos grupos de doença localizada e avançada, há predominância de pacientes com metástases nodais presentes na amostra total (67,77% de 1.117 casos com o dado de estadiamento nodal disponível nos prontuários clínicos). Não obstante, houve relação significativa do estadiamento nodal com o estadiamento clínico (agrupados e não-agrupados), isto é, as pacientes com menor número de linfonodos comprometidos concentraram-se no grupo de doença localizada (EC I-II).

A imunoistoquímica trouxe imensos avanços à "pesquisa translacional", possibilitando a investigação das hipóteses levantadas nos diversos ensaios da pesquisa básica e sua aplicação aos bancos de casos com evolução clínica conhecida. Entretanto, sua maior vulnerabilidade é a dificuldade de obtenção de boa reprodutibilidade técnica e a comparabilidade da marcação das reações, uma vez que o alto grau 'artesanal' da parte técnica tem imensa influência nos resultados obtidos.

A utilização da técnica dos *tissue microarrays* combinada com o método imunoistoquímico levou a outro grande salto qualitativo nas pesquisas científicas. Aumentou-se significativamente o grau de comparabilidade de resultados, pois as reações passaram a ser feitas simultaneamente em grande número de casos e sob condições idênticas de temperatura, recuperação antigênica, concentração de anticorpos, sistemas de amplificação e coloração das reações.

A validação da técnica e da comparabilidade dos resultados da imunohistoquímica com uso de TMA com os cortes convencionais já foi estabelecida em diversos estudos (TORHORST et al. 2001; BHARGAVA et al. 2004; PRALL et al. 2004; VAN DEN EYNDEN 2004; AALTONEN et al. 2006; SEBASTIANI et al. 2006; RUIZ et al. 2006) e tem mostrado valor substancial na agilização da análise, correlação e aplicação das novas informações geradas pelos estudos genômicos e proteômicos nas pesquisas e na prática clínica. A escolha prévia de áreas mais representativas do tumor pelo patologista aumenta a qualidade da amostragem nos TMA. A realização das reações IHC em diferentes níveis de cada cilindro nos cortes seriados (ou em duplicata) tem mostrado excelente correlação dos resultados obtidos com os TMA com aqueles das reações em cortes convencionais (CAMP et al. 2000; TORHORST et al. 2001; ZHANG et al. 2003; DEMICHELIS et al. 2006), minimizando os efeitos da heterogeneidade tumoral e da amostragem relativamente reduzida dos TMA.

Durante a realização das reações IHC pode ocorrer descolamento do tecido das lâminas, tanto nos preparados convencionais quanto nos TMA, sendo que na literatura são referidas perdas de 5 a 20% dos cortes dos cilindros dos arrays (TORHORST et al. 2001; PACKEISEN et al. 2003) No total de nossa amostra estudada (1.167 casos) a média de perdas foi de 5,6% (variação de 2,9 a 18,4%).

Houve representação adequada de células tumorais nos diferentes níveis de controle histológico em pelo menos um dos cilindros de cada

tumor, com média de cilindros presentes em cada lâmina de 94,4%, reforçando a qualidade técnica dos TMA montados nesta instituição.

Testamos em nossa casuística o agrupamento dos casos segundo os perfis imunohistoquímicos que refletem os 5 subgrupos expressão gênica descritos na literatura (PEROU et al. 2000; SORLIE et al. 2001; NIELSEN et al. 2004; ABD EL-REHIM et al. 2005; FAN et al. 2006).

Os subgrupos de expressão IIQ são: [1] Basalóide; [2] Receptores hormonais positivos – HER2 negativos; [3] HER2 positivos – receptores hormonais negativos; [4] HER2 positivos – receptores hormonais positivos; e [5] “Null” – negativos para todos os marcadores referidos nos demais grupos.

Em nossa amostra foi observada associação significativa dos subgrupos de perfis imunohistoquímicos “Receptores hormonais positivos – HER2 negativos” ($P = 0,001$) e “HER2 positivos – receptores hormonais positivos” ($P = 0,035$) com os estádios clínicos agrupados. Os demais subgrupos não mostraram associação significativa com os estádios clínicos (“Basalóide” - $P = 0,369$; “HER2 positivo – receptores hormonais negativos” – $P = 0,056$; e “Null” – $P = 0,056$).

Nas análises univariadas, verificamos a associação da expressão dos marcadores IIQ com os grupos de estadiamento clínico, e observamos que houve relação significativa de duas citoceratinas basais (CK5,6 e CK14) com o grupo de doença avançada ($P = 0,048$), refletindo a maior incidência desse perfil imunofenotípico nos casos de maior tamanho tumoral e estádios mais avançados, conforme descrito na literatura.

Os casos que foram agrupados como “Basalóides”, caracterizados por serem receptores hormonais negativos (ER-, PR-), escore de HER negativos, e por apresentarem expressão diferencial de uma ou mais das citoceratinas do grupo ‘basalóide’ (CK5,6, CK14, CK17) de fato apresentaram uma pior evolução nas análises univariadas dos grupos avaliados neste estudo (doença localizada – EC I e II - e doença avançada – EC III e IV).

No grupo total de casos (EC I a IV), o subgrupo basalóide mostrou associação significativa com o maior tamanho tumoral ($P = 0,008$), grau histológico 3 ($P < 0,001$), grau 3 nuclear ($P < 0,001$), áreas extensas de necrose ($P < 0,001$), maior infiltrado inflamatório peritumoral ($P = 0,004$), alta atividade proliferativa ($P < 0,001$), expressão forte de EGFR com padrão de membrana ($P < 0,001$), expressão de CK 8 citoplasmática ($P = 0,001$), CK 8 de membrana ($P = 0,017$), CK18 de membrana ($P < 0,001$), ezrina negativa ($P < 0,001$) e p63 negativa ($P = 0,021$).

Presumimos que a eventual participação da p63 em outras vias de diferenciação estrutural do epitélio mamário possa ser responsável pela associação inversa de sua expressão com o perfil basalóide em nossa amostra.

A maior expressão de CK18 citoplasmática no grupo de EC III-IV pode estar correlacionada à inibição da apoptose modulada pelo TNF (CAULIN et al. 2000) e à ligação das CKs 14 e CK18 com a TRADD (TNFR1-associated death domain protein). A ligação das citoceratinas à TRADD compromete sua interação com TNFR1 e a ativação da apoptose via caspase 8, tornando

as células CK18 e 14 positivas mais resistentes à morte celular programada. Há evidências da interação das CK 8 e CK18 com bax, caspase 3 e bcl-2 não só em carcinomas mamários, mas também nas hepatites auto-imunes e estudos experimentais de indução de carcinogênese (INADA et al. 2001; MUROTA et al. 2003; LAU e CHIU 2007).

Nas análises univariadas de sobrevida, observamos que no grupo de doença localizada (EC I-II) os subgrupos de expressão imunoistoquímica que tiveram pior evolução foram aqueles com expressão de HER2 (com ou sem expressão de receptores hormonais) e o basalóide, ressaltando a importância da HER2 no prognóstico do câncer de mama. O grupo com melhor evolução clínica foi o de expressão de receptores hormonais e negativos para HER2 ($P < 0,001$). A única paciente do grupo "null" também teve melhor evolução clínica, mas o significado desse dado fica muito limitado pela amostragem reduzida.

No grupo de doença avançada (EC III e IV) a evolução clínica dos subgrupos foi semelhante aos do grupo de doença localizada, sendo que o basalóide foi o de pior prognóstico. O subgrupo "null" (7 pacientes) teve prognóstico intermediário, porém o número de casos é bastante reduzido comparativamente aos demais subgrupos, diminuindo o poder estatístico da análise desse dado.

Os resultados de expressão das CKs deste estudo são consoantes com o referido em literatura, e os padrões de associação entre elas evidencia sua participação ativa nas vias intra- e extra-celulares de sinalização, controle do metabolismo celular, proliferação e apoptose. As

CKs provavelmente agem como adaptadoras dos sinais extracelulares para as centrais nucleares de controle celular, formando vias de canalização e transporte intracelular, aproximando e afastando moléculas, deslocando proteínas e participando ativamente do controle do metabolismo e ciclo celular.

No grupo total de pacientes da amostra, a expressão dos receptores hormonais influenciou sensivelmente a evolução clínica, ressaltando a importância da padronização e reprodutibilidade da parte técnica e das análises desses marcadores, pois sua relevância na decisão terapêutica é fundamental. Frisamos que foi considerada como expressão positiva a presença de qualquer marcação nuclear em células neoplásicas nas reações imunoistoquímicas para os receptores hormonais pelos critérios estabelecidos para estas análises. A possibilidade de avaliar as células que efetivamente expressam os receptores hormonais e a discriminação de células epiteliais normais entremeadas ao tumor são fatores indiscutivelmente importantes para a validação da pesquisa de sua expressão através da imunoistoquímica, e foi demonstrada em diversos estudos (HARVEY et al. 1999; YAMASHITA et al. 2006)

Foi realizado ajuste dos modelos da análise multivariada pelo ano de início do tratamento clínico-cirúrgico (períodos de 1980 até 1994 e de 1995 a 2002). Para o grupo de pacientes dos estádios clínicos I e II (doença localizada), observamos que permaneceram como fatores de risco independentes para o óbito no modelo de Cox (análise multivariada) a expressão de receptores de estrógeno, o escore de HER2 e o período de

admissão e tratamento até 1994. Nesse grupo de pacientes (EC I e II), a expressão dos receptores de progesterona, cuja significância era limítrofe, passou a não ser mais um fator de risco independente. No grupo das pacientes dos estádios clínicos III e IV, o período de tratamento não desajustou o modelo e não foi uma variável independente para o óbito no modelo de Cox.

A utilização do painel de marcadores do perfil basalóide de marcação imunoistoquímica nos carcinomas mamários pode auxiliar a melhor estratificação dos subgrupos de risco dentro de cada estágio clínico, constituindo-se numa útil ferramenta à prática clínica oncológica, orientando a escolha de esquemas terapêuticos mais adequados e efetivos.

A organização dos dados clínicos, anatomopatológicos, imunoistoquímicos e de outras análises realizadas nas amostras é fator fundamental para a consistência dos resultados, e facilita a multiplicação dos estudos mais aprofundados com os mesmos grupos de pacientes e casos.

Entramos definitivamente numa nova era de diagnósticos integrados e de customização de tratamentos específicos para os diferentes tipos de doenças e neoplasias. A análise acurada, confiável, global, padronizada e reproduzível das múltiplas características gênicas e protéicas dos indivíduos é fundamental para atingir-se o grau desejável de maior eficácia e menores efeitos indesejáveis dos agentes terapêuticos que estão sendo desenvolvidos a partir dos conhecimentos gerados pelas pesquisas básicas e clínicas.

7 CONCLUSÕES

Num grupo bastante homogêneo de tumores, constituído exclusivamente por carcinomas ductais invasivos, organizados em 4 blocos de TMA, foi possível identificarmos subgrupos de pacientes com perfis imunoistoquímicos diversos, associados a evoluções clínicas diferenciadas, utilizando 15 marcadores imunoistoquímicos, num universo de 1.167 casos.

A diferenciação de casos com diferentes riscos é importante no sentido de se planejar estratégias mais eficazes para o tratamento das pacientes, adequando-as à maior ou menor agressividade dos tumores e sua responsividade a terapias específicas.

A análise histopatológica dos tumores traz informações fundamentais quanto ao prognóstico e, portanto, deve ser minuciosa e seguir os protocolos internacionalmente recomendados. Deve-se buscar uma cada vez maior otimização e padronização das fases pré-analíticas – qualidade e tempo de fixação e processamento macroscópico, uma vez que são fatores com impacto significativo na qualidade dos resultados.

Comprovou-se a associação do estadiamento clínico, grau histológico, grau nuclear, estadiamento nodal, tamanho tumoral, índice mitótico e presença de necrose com a evolução clínica num grupo de casos com acompanhamento clínico significativo (tempo médio de seguimento de 75,9 meses para as pacientes do grupo de estádios clínicos I e II, e de 57,09 meses para as pacientes do grupo de estádios clínicos III e IV).

Observamos que o perfil basalóide no grupo total de pacientes, bem como nos subgrupos de estádios clínicos I-II (doença localizada) e III-IV (doença avançada), de fato mostrou pior evolução clínica, constituindo-se, desta forma, em fator prognóstico relevante para a prática oncológica clínica.

Outras citoceratinas tais como a CK8, CK18 e CK13, e outros marcadores biológicos, como o EGFR, a p53 e ezrina, podem acrescentar informações relevantes às análises dos casos 'triplo-negativos', complementando os critérios de escolha de melhores opções de terapias adicionais ao tratamento cirúrgico das pacientes.

A padronização da fixação das amostras, dos exames macro e microscópico, das reações imunoistoquímicas e de expressão gênica, nomeadamente, através do uso de kits de anticorpos e reagentes e da eventual automatização da parte técnica, dentre outros, tem importância fundamental, e deve ser priorizada tanto na prática clínica quanto nas pesquisas, a fim de aumentar o grau de confiabilidade, comparabilidade e reprodutibilidade dos resultados obtidos.

O tamanho significativo, a homogeneidade de tipos histológicos da amostra, o número de marcadores utilizados e a padronização das reações técnicas através do uso dos *tissue microarrays* aplicados neste estudo confirmam a validade dos resultados da grande maioria das pesquisas de perfis de expressão gênica e protéica para os carcinomas ductais infiltrativos mamários.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Anonymus].The World Health Organization. Histological typing of breast tumors. **Neoplasma** 1983; 30:113-23.

[Anonymus]. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. **Lancet** 1998; 351:1451-67.

Aaltonen K, Ahlin C, Amini RM, et al. Reliability of cyclin a assessment on tissue microarrays in breast cancer compared to conventional histological slides. **Br J Cancer** 2006; 94:1697-702.

Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. **Int J Cancer** 2005; 116:340-50.

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. **Molecular biology of the cell**. 4th ed. New York: Garland Science; 2002. The cytoskeleton; p.907-82.

Al-Haddad S, Zhang Z, Leygue E, et al. Psoriasin (S100A7) expression and invasive breast cancer. **Am J Pathol** 1999; 155:2057-66.

Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, et al. Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:8534-40.

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

Alowami S, Qing G, Emberley E, Snell L, Watson PH. Psoriasin (S100A7) expression is altered during skin tumorigenesis. **BMC Dermatol** 2003; 3:1.

Amicone L, Spagnoli FM, Spath G, et al. Transgenic expression in the liver of truncated Met blocks apoptosis and permits immortalization of hepatocytes. **EMBO J** 1997; 16:495-503.

Barbieri CE, Barton CE, Pietenpol JA. Delta Np63 alpha expression is regulated by the phosphoinositide 3-kinase pathway. **J Biol Chem** 2003; 278:51408-14.

Barbieri CE, Pientenpol JA. p63 and epithelial biology. **Exp Cell Res** 2006; 312:695-706.

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. **J Clin Oncol** 2003; 21:1973-9.

Bast RC Jr, Ravdin P, Hayes DF, et al. 2000 Update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol** 2001; 19:1865-78.

Battifora H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. **Lab Invest** 1986; 55:244-8.

Bhargava R, Lal P, Chen B. Feasibility of using tissue microarrays for the assessment of HER-2 gene amplification by fluorescence in situ hybridization in breast carcinoma. **Diagn Mol Pathol** 2004; 13:213-6.

Bhargava R, Gerald WL, Li AR, et al. EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. **Mod Pathol** 2005; 18:1027-33.

Biesterfeld S, Kluppel D, Koch R, et al. Rapid and prognostically valid quantification of immunohistochemical reactions by immunohistometry of the most positive tumour focus: a prospective follow-up study on breast cancer using antibodies against MIB-1, PCNA, ER, and PR. **J Pathol** 1998; 185:25-31.

Birner P, Ritz M, Musahl C, et al. Immunohistochemical detection of cell growth fraction in formalin-fixed and paraffin-embedded murine tissue. **Am J Pathol** 2001; 158:1991-6.

Brambilla E, Gazzeri S, Moro D, et al. Immunohistochemical study of p53 in human lung carcinomas. **Am J Pathol** 1993; 143:199-210.

Bretscher A, Chambers D, Nguyen R, Reczek D. ERM-Merlin and EBP50 protein families in plasma membrane organization and function. **Annu Rev Cell Dev Biol** 2000; 16:113-43.

Bretscher A, Edwards K, Fehon RG. ERM proteins and merlin: integrators at the cell cortex. **Nat Rev Mol Cell Biol** 2002; 3:586-99.

Bruce B, Khanna G, Ren L, et al. Expression of the cytoskeleton linker protein ezrin in human cancers. **Clin Exp Metastasis** 2007; 24:69-78.

Bubendorf L, Nocito A, Moch H, Sauter G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. **J Pathol** 2001; 195:72-9.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. **Lab Invest** 2000; 80:1943-9.

Carter CL, Allen C, Henderson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer** 1989; 63:181-7.

Caulin C, Ware CF, Magin TM, Oshima RG. Keratin-dependent, epithelial resistance to tumor necrosis factor-induced apoptosis. **J Cell Biol** 2000; 149:17-22.

Chen W, Reiss M, Foran DJ. A prototype for unsupervised analysis of tissue microarrays for cancer research and diagnostics. **IEEE Trans Inf Technol Biomed** 2004; 8:89-96.

Chiappetta C, Kirkland JL, Loose-Mitchell DS, Murthy L, Stancel GM. Estrogen regulates expression of the jun family of protooncogenes in the uterus. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1992; 41:113-23.

Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. **J Clin Oncol** 1999; 17:2639-48.

Corzo C, Tusquets I, Salido M, et al. Characterization of HER1 (c-erbB1) status in locally advanced breast cancer using fluorescence in situ hybridization and immunohistochemistry. **Tumour Biol** 2005; 26:25-30.

Coulombe PA, Omary MB. 'Hard' and 'soft' principles defining the structure, function and regulation of keratin intermediate filaments. **Curr Op Cell Biol** 2002; 14:110-122.

Crepaldi T, Gautreau A, Comoglio PM, Louvard D, Arpin M. Ezrin is an effector of hepatocyte growth factor-mediated migration and morphogenesis in epithelial cells. **J Cell Biol** 1997; 138:423-34.

Dandachi N, Hauser-Kronberger C, More E, et al. Co-expression of tenascin C and vimentin in human breast cancer cells indicates phenotypic transdifferentiation during tumour progression: correlation with histopathological parameters, hormone receptors, and oncoproteins. **J Pathol** 2001; 193:181-9.

Davidson MW. **Molecular expressions cell biology and microscopy structure and function of cells & viruses**. Available from: <URL:<http://micro.magnet.fsu.edu/cells/intermediatefilaments/intermediatefilaments.html>> [2007 Jul 12].

Demichelis F, Magni P, Piergiorgi P, Rubin MA, Bellazzi R. A hierarchical Naive bayes model for handling sample heterogeneity in classification problems: an application to tissue microarrays. **BMC Bioinformatics** 2006; 7:514.

Dendukuri N, Khetani K, Mclsaac M, Brophy J. Testing for HER2-positive breast cancer: a systematic review and cost-effectiveness analysis. **CMAJ** 2007; 176:1429-34.

Dickson RB, Lippman ME. Molecular basis of breast cancer. In: Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA, editors. **Molecular basis of cancer**. 2nd ed. Philadelphia: W. B. Saunders; 2001. p.313-42.

Dowsett M, Harper-Wynne C, Boeddinghaus I, et al. HER-2 amplification impedes the antiproliferative effects of hormone therapy in estrogen receptor-positive primary breast cancer. **Cancer Res** 2001; 61:8452-8.

Dowsett M, Houghton J, Iden C, et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according oestrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. **Ann Oncol** 2006; 17:818-26.

Dunnwald LK, Rossing MA, Li CI. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. **Breast Cancer Res** 2007; 9:R6.

Elliott BE, Meens JA, SenGupta SK, Louvard D, Arpin M. The membrane cytoskeletal crosslinker ezrin is required for metastasis of breast carcinoma cells. **Breast Cancer Res** 2005; 7:R365-73.

Ellis IO, Elston CW. Tumors of the breast. In: Fletcher CDM, editor. **Diagnostic histopathology of tumors**. New York: Churchill Livingstone, 1998; p.635-689.

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

Emberley ED, Niu Y, Njue C, Kliewer EV, Murphy LC, Watson PH. Psoriasin (S100A7) expression is associated with poor outcome in estrogen receptor-negative invasive breast cancer. **Clin Cancer Res** 2003; (7):2627-31.

Emberley ED, Alowami S, Snell L, Murphy LC, Watson PH. S100A7 (psoriasin) expression is associated with aggressive features and alteration

of Jab1 in ductal carcinoma in situ of the breast. **Breast Cancer Res** 2004; 6:R308-15.

Endl E, Gerdes J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. **Exp Cell Res** 2000; 257:231-7.

Fan C, Oh DS, Wessels L, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:560-6.

Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Hewitt SM, Lissowska J, Sakoda LC, Sherman ME. Loss of antigenicity in stored sections of breast cancer tissue microarrays. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev** 2004; 13:667-72.

Folgueira MA, Carraro DM, Brentani H, et al. Gene expression profile associated with response to doxorubicin-based therapy in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2005;11:7434-43.

Franzén B, Linder S, Alaiya AA, et al. Analysis of polypeptide expression in benign and malignant human breast lesions: downregulation of cytokeratins. **Br J Cancer** 1996; 73:1632-8.

Frisch SM, Francis H. Disruption of epithelial cell-matrix interactions induces apoptosis. **J Cell Biol** 1994; 124:619-26.

Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding on intermediate filaments in health and disease. **Science** 1998; 279:514-519.

Fuchs IB, Lichtenegger W, Buehler H et al. The prognostic significance of epithelial-mesenchymal transition in breast cancer. **Anticancer Res** 2002; 22(6A):3415-9.

Gautreau A, Pouillet P, Louvard D, Arpin M. Ezrin, a plasma membrane-microfilament linker, signals cell survival through the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway. **Proc Natl Acad Sci** 1999; 96:7300-5.

Gautreau A, Louvard D, Arpin M. Morphogenic effects of ezrin require a phosphorylation-induced transition from oligomers to monomers at the plasma membrane. **J Cell Biol** 2000; 150:193-203.

Gerdes J, Li L, Schlueter C, et al. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. **Am J Pathol** 1991; 138:867-73.

Geyer CE, Forster J, Lindquist D, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. **N Engl J Med** 2006; 355:2733-43.

Gobbi H, Arteaga CL, Jensen RA, et al. Loss of expression of transforming growth factor beta type II receptor correlates with tumor grade in human breast in-situ and invasive carcinomas. **Histopathology** 2000; 36:168-177.

Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Panel members. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. **Ann Oncol** 2005; 16:1569-83.

Golouh R, Vrhovec I, Bracko M, Frkovic-Grazio S. Comparison of standardized immunohistochemical and biochemical assays for estrogen and progesterone receptors in breast carcinoma. **Pathol Res Pract** 1997; 193:543-9.

Gouvea AP, Milanezi F, Olson SJ, Leitao D, Schmitt FC, Gobbi H. Selecting antibodies to detect HER2 overexpression by immunohistochemistry in invasive mammary carcinomas. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2006; 14:103-8.

Greene FL, Page DL, Fleming ID, et al. **AJCC manual de estadiamento do câncer**. Trad. de D D Rosa. 6th ed. 2002. Porto Alegre: Artmed; 2006. Mama; p.235-54.

Gressner O, Schilling T, Lorenz K, et al. TAp63alpha induces apoptosis by activating signaling via death receptors and mitochondria. **EMBO J** 2005; 24:2458-71.

Gruvberger S, Ringner M, Chen YD, et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. **Cancer Res** 2001; 61:5979-84.

Gulmann C, Loring P, O'Grady A, Kay E. Miniature tissue microarrays for HercepTest standardisation and analysis. **J Clin Pathol** 2004; 57:1229-31.

Harvey JM, Clark GM, Osborne CK, Allred DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **J Clin Oncol** 1999; 17:1474-81.

Hay ED. An overview of epithelio-mesenchymal transformation. **Acta Anat (Basel)** 1995; 154:8-20.

Hayes DF, Thor AD. c-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. **Semin Oncol** 2002; 29:231-45.

Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. **J Cell Sci** 2001; 114:2569-75.

Hortobagyi GN. Opportunities and challenges in the development of targeted therapies. **Sem Oncol** 2004; 31:21-7.

Hussein MR, Hassan HI. Analysis of the mononuclear inflammatory cell infiltrate in the normal breast, benign proliferative breast disease, in situ and infiltrating ductal breast carcinomas: preliminary observations. **J Clin Pathol** 2006; 59:972-7.

Hutcheson IR, Knowlden JM, Jones HE et al. Inductive mechanisms limiting response to anti-epidermal growth factor receptor therapy. **Endocr Rel Cancer** 2006; 13:S89-97.

Hynes NE, Lane HA. ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. **Nat Rev Cancer** 2005; 5:341-54.

Inada H, Izawa I, Nishizawa M, Fujita E, et al. Keratin attenuates tumor necrosis factor-induced cytotoxicity through association with TRADD. **J Cell Biol** 2001; 155:415-26.

Jensen ML, Kiaer H, Andersen J, Jensen V, Melsen F. Prognostic comparison of three classifications for medullary carcinomas of the breast. **Histopathology** 1997; 30:523-32.

Joensuu H, Kellokumpu-Lehtinen PL, Bono P, et al; FinHer Study Investigators. Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. **N Engl J Med** 2006; 354:809-20.

Johannessen AL, Torp SH. The clinical value of Ki-67/MIB-1 labeling index in human astrocytomas. **Pathol Oncol Res** 2006; 12:143-7.

Jones C, Nonni AV, Fulford L, et al. CGH analysis of ductal carcinoma of the breast with basaloid/myoepithelial cell differentiation. **Br J Cancer** 2001; 85:422-7.

Jooss K, Muller R. Deregulation of genes encoding microfilament-associated proteins during Fos-induced morphological transformation. **Oncogene** 1995; 10:603-8.

Jorgensen JT, Nielsen KV, Ejlertsen B. Pharmacodiagnosics and targeted therapies - a rational approach for individualizing medical anticancer therapy in breast cancer. **Oncologist** 2007; 12:397-405.

Kay E, O'Grady A, Morgan JM, Wozniak S, Jasani B. Use of tissue microarray for interlaboratory validation of HER2 immunocytochemical and FISH testing. **J Clin Pathol** 2004; 57:1140-4.

Kennedy RD, Gorski JJ, Quinn JE, et al. BRCA1 and c-Myc associate to transcriptionally repress psoriasin, a DNA damage-inducible gene. **Cancer Res** 2005; 65:10265-72.

Kinsel LB, Szabo E, Greene GL, Konrath J, Leight GS, McCarty KS Jr. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors as a predictor of prognosis in breast cancer patients: comparison with quantitative biochemical methods. **Cancer Res** 1989; 49:1052-6.

Kirfel J, Magin TM, Reichelt J. Keratins: a structural scaffold with emerging functions. **Cell Mol Life Sci** 2003; 60:56-71.

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

Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. **Lab Invest** 2002; 82:1525-33.

Kreike B, Halfwerk H, Kristel P, et al. Gene expression profiles of primary breast carcinomas from patients at high risk for local recurrence after breast-conserving therapy. **Clin Cancer Res** 2006; 12:5705-12.

Kreitz S, Fackelmayer FO, Gerdes J, Knippers R. The proliferation-specific human Ki-67 protein is a constituent of compact chromatin. **Exp Cell Res** 2000; 261:284-92.

Krieg J, Hunter T. Identification of the two major epidermal growth factor-induced tyrosine phosphorylation sites in the microvillar core protein ezrin. **J Biol Chem** 1992; 267:19258-65.

Krop I, Marz A, Carlsson H, et al. A putative role for psoriasin in breast tumor progression. **Cancer Res** 2005; 65:11326-34.

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

Lau AT, Chiu JF. The possible role of cytokeratin 8 in cadmium-induced adaptation and carcinogenesis. **Cancer Res** 2007; 67:2107-13.

Lee AH, Happerfield LC, Bobrow LG, Millis RR. Angiogenesis and inflammation in invasive carcinoma of the breast. **J Clin Pathol** 1997; 50:669-73.

Lee AH, Gillett CE, Ryder K, et al. Different patterns of inflammation and prognosis in invasive carcinoma of the breast. **Histopathology** 2006; 48:692-701.

Lee J, Im YH, Lee SH, et al. Evaluation of ER and Ki-67 proliferation index as prognostic factors for survival following neoadjuvant chemotherapy with doxorubicin/docetaxel for locally advanced breast cancer. **Cancer Chemother Pharmacol** 2007 May 17; [Epub ahead of print]

Lee JM, Dedhar S, Kalluri R, Thompson EW. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development and disease. **J Cell Biol** 2006; 172:973-81.

Lee S, Mohsin SK, Mao S, Hilsenbeck SG, Medina D, Allred DC. Hormones, receptors, and growth in hyperplastic enlarged lobular units: early potential precursors of breast cancer. **Breast Cancer Res** 2006; 8:R6.

Leong CO, Vidnovic N, DeYoung MP, Sgroi D, Ellisen LW. The p63/p73 network mediates chemosensitivity to cisplatin in a biologically defined subset of primary breast cancers. **J Clin Invest** 2007; 117:1370-80.

LeRoy X, Escot C, Browillet JP, et al. Decrease of c-erbB-2 and c-myc mRNA levels in tamoxifen-treated breast cancer. **Oncogene** 1991; 6:431.

Liu CL, Prapong W, Natkunam Y, et al. Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays. **Am J Pathol** 2002; 161:1557-65.

Liu D, Rudland PS, Sibson DR, Platt-Higgins A, Barraclough R. Expression of calcium-binding protein S100A2 in breast lesions. **Br J Cancer** 2000; 83:1473-9.

Liu G, Parant JM, Lang G, et al. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice.

Nat Genet 2004; 36:63-8.

Lodish H, Berk A, Zipursky SL, Matsudaira P, Baltimore D, Darnell JE.

Molecular cell biology. 4th ed. New York: W. H. Freeman; 2000. Cell motility and shape II: microtubules and intermediate filaments; p.795-847.

Mandal S, Curtis L, Pind M, Murphy LC, Watson PH. S100A7 (psoriasin)

influences immune response genes in human breast cancer. **Exp Cell Res**

2007 Mar 30; [Epub ahead of print]

Masood S, Bui MM. Prognostic and predictive value of HER2/neu oncogene

in breast cancer. **Microsc Res Tech** 2002; 59:102-8.

Mazzucchelli L. Protein S100A4: too long overlooked by pathologists? **Am J**

Pathol 2002; 160:7-13.

McGowan EM, Weinberger RP, Graham JD, et al. Cytoskeletal

responsiveness to progestins is dependent on progesterone receptor a

levels. **J Mol Endocrinol** 2003; 31:241-53.

Megha T, Ferrari F, Benvenuto A, et al. p53 mutation in breast cancer.

Correlation with cell kinetics and cell of origin. **J Clin Pathol** 2002; 55:461-6.

Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de

Câncer. **Estimativa/2006 incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro:

INCA; 2005.

Moll R. Molecular diversity of cytokeratins: significance for cell and tumor differentiation. **Acta Histochem** 1992, 41 (Suppl.):117-27.

Moll UM, Slade N. p63 and p73: roles in development and tumor formation. **Mol Cancer Res** 2004; 2:371-86.

Monteagudo C, Merino MJ, San-Juan J, et al. Immunohistochemical distribution of type IV collagenase in normal, benign and malignant breast tissue. **Am J Pathol** 1990; 136:585.

Montoro AF, Giannotti Filho O, Monteiro DM, Montoro FF, Pinho MA, Figueiredo MT. Hormonal receptors in mammary carcinoma: comparison between quantitative and qualitative methods. **São Paulo Med J** 1997; 115:1471-4.

Munster PN, Norton L. Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer. **Breast Cancer Res** 2001; 3:361-4.

Murota M, Watanabe S, Fujita J, et al. Aberrant cytokeratin expression and high susceptibility to apoptosis in autoimmune hepatitis. **Hepatol Res** 2003; 25:271-280.

Murphy LJ. Estrogen induction of insulin-like growth factors and myc proto-oncogene expression in the uterus. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1991; 40:223.

Nagahata T, Onda M, Emi M, et al. Expression profiling to predict postoperative prognosis for estrogen receptor-negative breast cancers by analysis of 25,344 genes on a cDNA microarray. **Cancer Sci** 2004; 95:218-25.

[NCCN] National Comprehensive Cancer Network. **Clinical practice guidelines in oncology** – v.1. 2007. Breast Cancer. Version 1.2007. Available from: <URL:http://www.nccn.org/professionals/physician_gls/PDF/breast-screening.pdf> [2007 Jul 12].

[NCI] National Cancer Institute. Surveillance Epidemiology and End Results-SEER. **Fast Stats: breast Cancer. Surveillance Research Program, NCI.** Available from: <URL:<http://seer.cancer.gov/faststats/sites.php?stat=Incidence&site=Breast+Cancer&x=7&y=15#trend>> [2007 jul 13].

Navolanic PM, Steelman LS, McCubrey JA. EGFR family signaling and its association with breast cancer development and resistance to chemotherapy. **Int J Oncol** 2003; 22:237-52.

Nguyen R, Reczek D, Bretscher A. Hierarchy of merlin and ezrin N- and C-terminal domain interactions in homo- and heterotypic associations and their relationship to binding of scaffolding proteins EBP50 and E3KARP. **J Biol Chem** 2001; 276:7621-9.

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

Nishio M, Koshikawa T, Kuroidhi T. Prognostic of abnormal p53 accumulation in primary, resected non-small cell lung cancers. **J Clin Oncol** 1996; 14:497-502.

O'Grady A, Flahavan CM, Kay EW, Barrett HL, Leader MB. HER-2 analysis in tissue microarrays of archival human breast cancer: comparison of

immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2003; 11:177-82.

Omary MB, Coulombe PA, McLean WHI. Intermediate filament proteins and their associated diseases. **N Eng J Med** 2004; 351:2087-100.

Osborne CK. Steroid hormone receptors in breast cancer management. **Breast Cancer Res Treat** 1998a; 51:227-38.

Osborne CK. Tamoxifen in the treatment of breast cancer. **N Engl J Med** 1998b; 339:1609-18.

Osborne CK, Bardou V, Hopp TA, et al. Role of the estrogen receptor coactivator AIB1 (SRC-3) and HER-2/neu in tamoxifen resistance in breast cancer. **J Natl Cancer Inst** 2003; 95:353-61.

Osborne CK, Shou J, Massarweh S, Schiff R. Crosstalk between estrogen receptor and growth factor receptor pathways as a cause for endocrine therapy resistance in breast cancer. **Clin Cancer Res** 2005; 11:865s-70s.

Owens MA, Horten BC, Da Silva MM. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. **Clin Breast Cancer** 2004; 5:63-9.

Oyama T, Ishikawa Y, Hayashi M, Arihiro K, Horiguchi J. The effects of fixation, processing and evaluation criteria on immunohistochemical detection of hormone receptors in breast cancer. **Breast Cancer** 2007; 14:182-8.

Ozols RF, Herbst RS, Colson YL, et al. Clinical cancer advances 2006: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening--a report from the American Society of Clinical Oncology. **J Clin Oncol** 2007; 25:146-62.

Packeisen J, Korsching E, Herbst H, Boecker W, Buerger H. Demystified...tissue microarray technology. **Mol Pathol** 2003; 56:198-204.

Paine TM, Fontanini G, Basolo F, Geronimo I, Elliot JW, Russo J. Mutated c-Ha-ras oncogene alters cytokeratin expression in the human epithelial cell line MCF-10A. **Am J Pathol** 1992; 140:1483-8.

Palacios J, Honrado E, Osorio A, et al. Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 90:5-14.

Paramio JM. A role for phosphorylation in the dynamics of keratin intermediate filaments. **Eur J Cell Biol** 1999; 78:33-43.

Paramio JM, Casanova ML, Segrelles C, et al. Modulation of cell proliferation by cytokeratins K10 and K16. **Mol Cell Biol** 1999; 19:3086-94.

Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL. Inhibition of protein kinase B (PKB) and PKCzeta mediates keratin K10-induced cell cycle arrest. **Mol Cell Biol** 2001a; 21:7449-59.

Paramio JM, Segrelles C, Ruiz S, et al. The ink4a/arf tumor suppressors cooperate with 21cip1/waf in the processes of mouse epidermal differentiation, senescence, and carcinogenesis. **J Biol Chem** 2001b; 276:44203-11.

Paramio JM, Jorcano JL. Beyond structure: do intermediate filaments modulate cell signalling? **Bioessays** 2002; 24:836-44.

Park D, Karsen R, Noren T, Sauer T. Ki-67 expression in primary breast carcinomas and their axillary lymph node metastases: clinical implications. **Virchows Arch** 2007 Jun 7; [Epub ahead of print]

Pearson MA, Reczek D, Bretscher A, Karplus PA. Structure of the ERM protein moesin reveals the FERM domain fold masked by an extended actin binding tail domain. **Cell** 2000; 101:259-70.

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

Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:1659-72.

Prall F, Ostwald C, Nizze H, Barten M. Expression profiling of colorectal carcinomas using tissue microarrays: cell cycle regulatory proteins p21, p27, and p53 as immunohistochemical prognostic markers in univariate and multivariate analysis. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2004; 12:111-21.

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

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. **Histopathology** 2007a; 50:434-8.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer** 2007b; 109:25-32.

Reiner A, Neumeister B, Spona J, Reiner G, Schemper M, Jakesz R. Immunocytochemical localization of estrogen and progesterone receptor and prognosis in human primary breast cancer. **Cancer Res** 1990; 50:7057-61.

Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, et al. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. **Breast Cancer Res** 2005; 7:R1028-35.

Robert N, Leyland-Jones B, Asmar L, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:1673-84.

Rolland P, Spendlove I, Madjid Z, Rakha EA, Patel P, Ellis IO, Durrant L. The p53 positive Bcl-2 negative phenotype is an independent marker of prognosis in breast cancer. **Int J Cancer** 2007; 120:1311-7.

Romond EH, Perez EA, Bryant J, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med** 2005; 353:1673-84.

Rosen PP, Cranor ML. Secretory carcinoma of the breast. **Arch Pathol Lab Med** 1991; 115:141-4.

Rosen PP, Oberman HA. **Tumors of the mammary gland**. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology; 1993. (Atlas of Tumor Pathology. 3rd series. Fascicle 7)



Ross DT, Scherf U, Eisen M, et al. Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. **Nat Genet** 2000; 24:227-35.

Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, et al. Targeted therapy in breast cancer: the HER-2/neu gene and protein. **Mol Cell Proteomics** 2004; 3:379-98.

Ruiz C, Seibt S, Al Kuraya K, et al. Tissue microarrays for comparing molecular features with proliferation activity in breast cancer. **Int J Cancer** 2006; 118:2190-4.

Salomon DS, Bradt R, Ciardiello F, Normanno N. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit Rev Oncol Haematol** 1995; 19:183-232.

Santos M, Paramio JM, Bravo A, Ramirez A, Jorcano JL. The expression of keratin k10 in the basal layer of the epidermis inhibits cell proliferation and prevents skin tumorigenesis. **J Biol Chem** 2002; 277:19122-30.

Santos M, Perez P, Segrelles C, Ruiz S, Jorcano JL, Paramio JM. Impaired NF-kappa B activation and increased production of tumor necrosis factor alpha in transgenic mice expressing keratin K10 in the basal layer of the epidermis. **J Biol Chem** 2003; 278:13422-30.

Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Dotor A, Calero F, Hardisson D, Palacios J. Abnormal ezrin localization is associated with clinicopathological features in invasive breast carcinomas. **Breast Cancer Res Treat** 2006; 98:71-9.

Sbisà E, Catalano D, Grillo G, et al. p53FamTaG: a database resource of human p53, p63 and p73 direct target genes combining in silico prediction and microarray data. **BMC Bioinformatics** 2007; 8 Suppl 1:S20.

Schlessinger J. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. **Cell** 2000; 103:211-25.

Schnitt SJ, Jacobs TW. Current status of HER2 testing: caught between a rock and a hard place. **Am J Clin Pathol** 2001; 116:806-10.

Schraml P, Bucher C, Bissig H, et al. Cyclin E overexpression and amplification in human tumours. **J Pathol** 2003; 200:375-82.

Sebastiani V, Botti C, Di Tondo U, Visca P, Pizzuti L, Santeusanio G, Alo PL. Tissue microarray analysis of FAS, Bcl-2, Bcl-x, ER, PgR, Hsp60, p53 and Her2-neu in breast carcinoma. **Anticancer Res** 2006; 26:2983-7.

Skloris GP, Lewis A, Emberley E, et al. Estrogen receptor-beta regulates psoriasin (S100A7) in human breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2007; 104:75-85.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science** 1987; 235:177-82.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **N Engl J Med** 2001; 344:783-92.

Slamon D, Eiermann W, Robert N, et al. Phase III randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel (ACT) with doxorubicin and cyclophosphamide followed by docetaxel and trastuzumab (ACTH) with docetaxel, carboplatin and trastuzumab (TCH) in HER2 positive early breast cancer patients: BCIRG 006 study [Abstract]. **Breast Cancer Res Treat** 2005; 94:S5.

Sobin LH, Wittekind CH. **TNM classificação de tumores malignos**. 6th ed. Rio de Janeiro: INCA; 2006. Tumores de mama; p.137-48.

Song J, Bai J, Yang W, Gabrielson EW, Chan DW, Zhang Z. Expression and clinicopathological significance of oestrogen-responsive ezrin-radixin-moesin-binding phosphoprotein 50 in breast cancer. **Histopathology** 2007; 51:40-53.

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

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

Sorlie T, Wang Y, Xiao C, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics** 2006; 7:127.

Sorlie T. Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. **Methods Mol Biol** 2007; 360:91-114.

Stierer M, Rosen H, Weber R, et al. Comparison of immunohistochemical and biochemical measurement of steroid receptors in primary breast cancer: evaluation of discordant findings. **Breast Cancer Res Treat** 1998; 50:125-34.

Streuli CH, Bailey N, Bissell MJ. Control of mammary epithelial differentiation: basement membrane induces tissue-specific gene expression

in the absence of cell-cell interaction and morphological polarity. **J Cell Biol** 1991; 115:1383.

Tan PH, Bay BH, Yip G, et al. Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. **Mod Pathol** 2005; 18:374-81.

Tavassoli FA, Devilee P. **Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs**. Lyon: IARC Press; 2003. (World Health Organization Classification of Tumors)

Thuler LCS, Mendonça GA. Estadiamento inicial dos casos de câncer de mama e colo de útero em mulheres brasileiras. **Rev Bras Ginecol Obstet** 2005; 27:656-60.

Todd JH, Dowle C, Williams MR, et al. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. **Br J Cancer** 1987; 56:489-92.

Torhorst J, Bucher C, Kononen J, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. **Am J Pathol** 2001; 159:2249-56.

Trask DK, Band V, Zajchowsky DA, Yaswen P, Suh T, Sager R. Keratins as markers that distinguish normal and tumor-derived mammary epithelial cells. **Proc Natl Acad Sci** 1990; 87:2319-23.

Trendell-Smith NJ, Peston D, Shousha S. Adenoid cystic carcinoma of the breast: a tumour commonly devoid of oestrogen receptors and related proteins. **Histopathology** 1999; 35:241-8.

Troester MA, Hoadley KA, Sorlie T, et al. Cell-type-specific responses to chemotherapeutics in breast cancer. **Cancer Res** 2004; 64:4218-26.

Tsukita S, Yonemura S. Cortical actin organization: lessons from ERM (ezrin/radixin/moesin) proteins. **J Biol Chem** 1999; 274:34507-10.

Vanden Bempt I, Vanhentenrijk V, Drijkoningen M, De Wolf-Peeters C. Comparative expressed sequence hybridization reveals differential gene expression in morphological breast cancer subtypes. **J Pathol** 2006; 208:486-94.

van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. **Am J Pathol** 2002; 161:1991-6.

van de Rijn M, Gilks CB. Applications of microarrays to histopathology. **Histopathology** 2004; 44:97-108.

van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, et al. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. **Breast Cancer Res Treat** 2004; 85:13-22.

van Der Burg B, De Groot RP, Isbruecker L, et al. Oestrogen directly stimulates growth factor signal transduction pathways in human breast cancer cells. **J Steroid Biochem Mol Biol** 1991; 40:215.

van't Veer LJ, Dai HY, van de Vijver MJ, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature** 2002; 415:530-6.

Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **J Clin Oncol** 2002; 20:719-26.

Watson PH, Leygue ER, Murphy LC. Psoriasin (S100A7). **Int J Biochem Cell Biol** 1998; 30:567-71.

Westfall MD, Pientenpol JA. p63: molecular complexity in development and cancer. **Carcinogenesis** 2004; 25:857-64.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 Testing in Breast Cancer. **Arch Pathol Lab Med** 2007a; 131:18.

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol** 2007b; 25:118-45.

[YSM] Yale University School of Medicine. **What are tissue microarrays?** Available from: <URL:<http://tissuearray.org/yale/tisarray.html>> [2007 jul 13]

Yamashita H, Yando Y, Nishio M, et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. **Breast Cancer** 2006; 13:74-83.

Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. The Role of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. **Breast Cancer** 2001a; 8:171-83.

Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. **J Clin Oncol** 2001b; 19:2334-56.

Yaziji H, Goldstein LC, Barry TS, et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. **JAMA** 2004; 291:1972-7.

Zagouri F, Sergentanis TN, Zografos GC. Precursors and preinvasive lesions of the breast: the role of molecular prognostic markers in the diagnostic and therapeutic dilemma. **World J Surg Oncol** 2007; 315:57.

Zatloukal K, Stumptner C, Lehner M, Denk H, Baribault H, Eshkind LG, Franke WW. Cytokeratin 8 protects from hepatotoxicity, and its ratio to cytokeratin 18 determines the ability of hepatocytes to form Mallory bodies. **Am J Pathol** 2000; 156: 1263-74.

Zhang D, Salto-Tellez M, Do E, Putti TC, Koay ES. Evaluation of HER-2/neu oncogene status in breast tumors on tissue microarrays. **Hum Pathol** 2003; 34:362-8.

Anexo 1 - Ficha de registro de dados epidemiológicos, clínicos, histológicos e terapêuticos.

| | | | | |
|----------------|--|--------------------|---------------|--|
| Nome | | | RGH | |
| Nascimento | | Atendimento em: | Idade: | |
| Cor | | Menarca | Menopausa | |
| Paridade | | Hist Fam Ca mama | | |
| OBS | | | | |
| N AP BX | | Data | Bloco/Lam | |
| N AP MX | | Data | Bloco/Lam | |
| Outros AP | | | | |
| ILPC | | Data | Bloco/Lam | |
| DX: | | Tamanho | G histo | |
| G Nuclear | | G tubular | Mitoses | |
| Necrose | | Desmoplasia | Inflamação | |
| DCIS assoc | | Invasão Venosa | Inv. Linfa | |
| Inv Perineural | | Margens | LN+/T | |
| RE | | RP | p53 | |
| c-erbB-2 | | Ki-67 | CK 3 | |
| CK 5 / 6 | | CK 6 | CK 7 | |
| CK 8 | | CK 10 | CK 13 | |
| CK 14 | | CK 15 | CK 16 | |
| CK 17 | | CK 18 | CK 19 | |
| CK 20 | | CK HMW basic | CK LMW acidic | |
| CK HMW 34BE12 | | CAM 5.2 | Vimentina | |
| Desmoplaquina | | | | |
| QT NEOADJ | | DROGAS | CICLOS | |
| Início | | Término | Resposta | |
| Cirurgia | | | Data | |
| QT ADJ | | DROGAS | CICLOS | |
| Início | | Término | | |
| HT | | Droga | Tempo (anos) | |
| RXT Pré | | Data | cGy | |
| RXT Pós | | Data | cGy | |
| QT recidiva | | Drogas | Ciclos | |
| Início | | Término | | |
| cTNM | | pTNM | Estádio | |
| Evolução | | | | |
| Data Rec Local | | Data Rec Sistêmica | Sítio 1 | |
| Sítio 2 | | Sítio 3 | Sítio 4 | |
| Último retorno | | Data Revisão RGH | Revisor | |
| OBS | | | | |

Anexo 2 - Estadiamento anatomopatológico.

| pT – Tumor primário | |
|--|---|
| pTx | Impossibilidade de avaliação do tamanho do tumor primário* |
| pT0 | Sem evidência de tumor primário |
| pTis | Carcinoma <i>in situ</i> : carcinoma ductal <i>in situ</i> , carcinoma lobular <i>in situ</i> ou doença de Paget** da papila sem tumor subjacente |
| pT1 | Tumor < 2 cm em sua maior dimensão |
| pT1mic | Microinvasão < 0.1 cm em sua maior dimensão*** |
| pT1a | Tumor > 0.1 e < 0.5 cm ou menos em sua maior dimensão |
| pT1b | Tumor > 0.5 cm e < 1 cm em sua maior dimensão |
| pT1c | Tumor > 1 cm e < 2 cm em sua maior dimensão |
| pT2 | Tumor > 2.0 cm < 5 cm em sua maior dimensão |
| pT3 | Tumor > 5.0 cm em sua maior dimensão |
| pT4 | Tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede do tórax ou pele [^] |
| pT4a | Extensão à parede do tórax, excluindo-se o músculo peitoral ^{^^} |
| pT4b | Edema (incluindo <i>peau d'orange</i>) ou ulceração da pele da mama ou nódulos cutâneos satélites contíguos na mesma mama |
| pT4c | Soma de pT4a e pT4b |
| pT4d | Carcinoma inflamatório ^{^^^} |
| pN – Linfonodos regionais [#] | |
| pNx | Linfonodos regionais não podem ser avaliados (ex: remoção anterior ou não ressecados) |
| pN0 | Ausência de metástases histológicas; pesquisa de células tumorais isoladas (ITC ^{##}) não realizada |
| pN0(i-) | Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC negativa por técnicas histológicas – hematoxilina/eosina e imunoistoquímica. |
| pN0(i+) | Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC positiva por técnicas histológicas – hematoxilina/eosina e imunoistoquímica; grupo de ITC < 0,2 mm |
| pN0(mol-) | Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC negativa por técnicas moleculares (RT-PCR) |
| pN0(mol+) | Ausência de metástases histológicas; pesquisa de ITC positiva por técnicas moleculares |
| pN1 | Metástases para 1 a 3 linfonodos (LN) axilares ou mamários internos com doença microscópica detectada através de dissecação de linfonodos sentinelas (DLS), mas clinicamente inaparente ^{###} |
| pN1mi | Micrometástases ^{####} > 0,2 mm e < 2 mm |
| pN1a | Metástases para 1 a 3 LN axilares (pelo menos um grupo de células tumorais > 2.0 mm) |
| pN1b | Metástases em LN mamários internos detectados por DLS, mas clinicamente inaparentes |
| pN1c | Metástases para 1 a 3 LN axilares e mamários internos com doença microscópica detectada por DLS mas clinicamente inaparente. Se associados a mais de 3 LN axilares positivos, os LN mamários internos são classificados como pN3b para refletir a carga tumoral aumentada |
| pN2 | Metástases em 4 a 9 LN axilares; ou LN mamários internos clinicamente aparentes na ausência de metástases em LN axilares |
| pN2a | Metástases para 4 a 9 LN axilares (pelo menos um grupo de células tumorais > 2.0 mm) |
| pN2b | Metástases para LN mamários internos clinicamente aparentes na ausência de metástases para LN axilares |
| pN3 | Metástases 10 ou mais LN axilares, ou em LN infraclaviculares, ou em LN mamários internos ipsilaterais clinicamente aparentes na presença de 1 ou mais LN axilares positivos; ou em mais de 3 LN axilares com micrometástases clinicamente inaparentes em LN mamários internos ou LN supraclaviculares ipsilaterais |
| pN3a | Metástases em 10 ou mais LN axilares (pelo menos um grupo de células tumorais > 2.0 mm); ou metástases para LN infraclaviculares |
| pN3b | Metástases em LN mamários internos clinicamente aparentes na presença de 1 ou mais LN axilares positivos; ou em mais de 3 LN axilares e LN mamários internos com doença microscópica detectada por DLS mas clinicamente inaparente |
| pN3c | Metástases em LN supraclaviculares ipsilaterais |
| pM – Metástases à distância | |
| pMx | Não avaliada |
| pM0 | Ausência de metástases |
| pM1 | Metástases à distância, incluindo metástases em LN supraclaviculares homolaterais |

OBSERVAÇÕES:

* Se houver tumor presente na margem de ressecção macroscópica, o caso é codificado como pTx por impossibilidade de acesso ao tamanho completo do tumor.

** Doença de Paget associada a tumor subjacente é classificada de acordo com o tamanho do tumor

***Microinvasão é a extensão de células neoplásicas além da membrana basal aos tecidos adjacentes, com focos não maiores que 0,1 cm em sua maior dimensão. Quando há múltiplos focos de microinvasão, o tamanho do maior foco é utilizado para classificar a microinvasão (não deve ser usada a soma de todos os focos individuais). A presença de múltiplos focos deve ser quantificada e notificada, bem como a presença de múltiplos focos maiores de carcinomas invasivos.

^ Invasão dérmica isolada (sem ulceração, nódulos satélites ou carcinoma inflamatório) não altera a categoria T. Os casos são classificados como T1, T2 ou T3, dependendo de seu tamanho.

^^ Tumor no músculo peitoral deve ser medido em conjunto com o tumor mamário contíguo para a determinação do tamanho tumoral e a categoria T final.

^^^ Carcinoma inflamatório da mama é uma entidade clínico-patológica caracterizada por eritema difuso e edema envolvendo a maior parte da pele da mama, freqüentemente sem massa palpável subjacente. A apresentação clínica é devida a êmbolos tumorais em linfáticos, apesar deles poderem não ser observados numa biópsia da pele. O diagnóstico é estabelecido pela combinação dos achados clínicos com uma biópsia evidenciando o carcinoma no parênquima mamário ou nos linfáticos dérmicos. A presença de êmbolos linfáticos dérmicos sem o quadro clínico típico não é diagnóstica de carcinoma inflamatório. Num caso de carcinoma inflamatório clínico (cT4d) se a biópsia de pele da mama for negativa e não houver carcinoma localizado subjacente mensurável, a categorização patológica deve ser pTx. Retração da pele ou do mamilo, bem como outras alterações cutâneas, exceto aquelas dos estádios T4b e T4d, podem ocorrer em tumores T1, T2 ou T3 sem afetar sua classificação.

Há situações onde o patologista não pode fazer a avaliação completa dos linfonodos (LN) em decorrência do procedimento cirúrgico realizado para a sua abordagem, ou porque os dados de procedimentos prévios não estão disponíveis ou estão incompletos. Nessas situações, deve-se classificar o estadiamento nodal como "pNx" ao invés do número do TNM.

A classificação é baseada na dissecação dos LN axilares com ou sem a dissecação dos LN sentinela. Quando a classificação for baseada apenas na dissecação dos linfonodos sentinela sem dissecação axilar subsequente, deve-se acrescentar a abreviatura (sn) à classificação, por exemplo, pN0(i+)(sn).

Células tumorais isoladas (ITC) são definidas como células únicas isoladas ou em pequenos grupos não maiores que 0,2 mm. Elas podem ser detectadas através de exame histológico de rotina, por imunohistoquímica ou métodos moleculares (RT-PCR). As ITC geralmente não mostram evidências de atividade maligna (ex: proliferação ou reação estromal).

Doença clinicamente **aparente** é definida pela detecção de LN através de estudos de imagem (excluindo linfocintilografia) ou através de exame clínico.

Micrometástases podem mostrar evidência histológica de atividade maligna (ex: proliferação ou reação estromal).