

**MARA COSTA DUTRA**

**MARCADORES MOLECULARES EM CÂNCER DE MAMA EM  
MULHERES JOVENS (IDADE  $\leq$  35 ANOS): ESTUDO COMPARATIVO  
COM MULHERES PÓS-MENOPAUSA (IDADE ENTRE 50 - 65 ANOS)**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial à obtenção de grau de Mestre em Patologia - Área de concentração: Patologia Médica

Orientadora: Professora Dra Helenice Gobbi

BELO HORIZONTE  
FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG  
2009

**APOIO FINANCEIRO:** Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

*“Feliz aquele que transfere o que sabe e aprende o  
que ensina.”*

**Cora Coralina**

**À minha família**

## **AGRADECIMENTOS**

Meus sinceros agradecimentos:

À oportunidade concedida pela minha mestra e orientadora Professora Helenice Gobbi, pela paciência, sabedoria na sua incansável luta em transmitir conhecimentos.

Ao meu marido Sérgio Augusto da Conceição pelo amor e companheirismo dedicados à mim e aos nossos filhos.

Aos meus filhos Guto e Eduarda por aceitarem a minha ausência em tantas viagens.

Ao meu pai Izaac Pereira Dutra que soube nos mostrar a maior fonte de riqueza do ser humano: a eterna busca do conhecimento.

À minha mãe Damares Costa Dutra a razão da minha existência e presença constante em todas as dificuldades.

Aos meus irmãos Izaac Filho, Nara e Sara pelo apoio e compreensão.

À minha babá Elieth pelo apoio emocional e dedicação aos meus filhos.

Ao Dr. Élbio Cândido de Paula, patologista que têm o prazer de servir bem a todos e colaborador direto do meu projeto.

À Marina Alvarenga, aluna da iniciação científica, sempre solícita em todos os momentos.

Aos doutores e incentivadores Fernando Augusto Soares e Victor Piana de Andrade pela colaboração e apoio fornecidos durante esta jornada.

À toda equipe dos Laboratórios de Patologia Mamária da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo Horizonte – MG, do Hospital Araújo Jorge de Goiânia - GO e do Hospital do Câncer de São Paulo, A.C. Camargo que contribuíram de maneira honrosa para a conclusão deste trabalho.

Às equipes médicas do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais - Belo

Horizonte – MG, do Hospital Araújo Jorge de Goiânia - GO e do Hospital do Câncer de São Paulo, A.C. Camargo, por gentilmente, terem cedidos os casos clínicos para esta tese.

A todos os colegas do curso de Pós-Graduação, que souberam dividir os conhecimentos uns com os outros.

Ao professor Antônio Carlos Vieira Cabral pela oportunidade de conhecer a professora Helenice Gobbi e incentivador do mestrado.

Aos Residentes de Patologia do INCA, Rio de Janeiro, RJ: Simone Barreto Siqueira Parrilha Terra e do Hospital AC Camargo, São Paulo, SP: Márcio Ventura Ribeiro pela colaboração no projeto.

# SUMÁRIO

	<b>Página</b>
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS .....	09
LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS.....	11
RESUMO .....	12
ABSTRACT .....	13
1 – INTRODUÇÃO.....	14
1.1 - Câncer de mama e aspectos gerais .....	14
1.2 – Câncer de mama e idade ao diagnóstico.....	14
2 – REVISÃO DE LITERATURA .....	18
<b>2.1 – FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS .....</b>	<b>18</b>
<b>2.1.1 – Tamanho Tumoral, Linfonodos Axilares, Invasão Vascular Tumoral e Grau Histológico .....</b>	<b>19</b>
<b>2.1.2 – Receptores Hormonais .....</b>	<b>20</b>
<b>2.1.3 – HER – 2/neu (c-erbB-2).....</b>	<b>21</b>
3 – DIAGNÓSTICO MOLECULAR NO CÂNCER DE MAMA.....	24
<b>3.1 – SUBTIPOS MOLECULARES .....</b>	<b>26</b>
<b>3.2 – TUMORES DE FENÓTIPO-BASAL .....</b>	<b>27</b>
4 – MICRO ARRANJO DE TECIDO E CÂNCER DE MAMA.....	29
<b>4.1 – TÉCNICA TMA .....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.1 – Seleção dos casos e áreas a serem representadas.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.2 – Construção do bloco receptor.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.3 – Obtenção das lâminas.....</b>	<b>31</b>
<b>4.1.4 – Leitura das lâminas .....</b>	<b>31</b>
5 – JUSTIFICATIVA DO TRABALHO .....	32
6 – OBJETIVOS.....	33
7 – PACIENTES E MÉTODOS .....	34
7.1 - Construção do micrarranjo de tecido (TMA) e estudo imunoistoquímico .....	34
<b>7.2 – Estudo histopatológico .....</b>	<b>36</b>
<b>7.3 – Avaliação das reações imuno-histoquímicas .....</b>	<b>37</b>
<b>7.4 – Classificação imunofenotípica .....</b>	<b>39</b>
8 – ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	41

9 – RESULTADOS .....	42
10 – RESULTADOS ADICIONAIS .....	77
<b>10.1 – Características clínicas.....</b>	<b>77</b>
<b>10.1 – Seguimento e sobrevidas global e livre de doença .....</b>	<b>78</b>
11 – CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	80
12 – CONCLUSÕES .....	82
13 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	83
ANEXOS .....	91



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BCIRG 006 Breast Cancer International Research Group

BRCA Gene do câncer de mama (*Breast cancer gene*)

CAP Colégio americano de patologistas

cDNA Ácido desoxirribonucléico complementar

CISH - Chromogenic In Situ Hybridization

CK Citoqueratina

CMF Ciclofosfamida, Metotrexate e 5-Fluorouracil

EBCTCG Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group

EGFR Receptor do fator de crescimento epidérmico

FISH Hibridação *in situ* fluorescente

HER1 Receptor 1 do fator de crescimento epidérmico

HER2 (c-erB-b2) Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico

HERA Herceptin Adjuvant trial

IIQ Imuno-histoquímica

ILV Invasão linfo-vascular

INCA Instituto Nacional do Câncer

NCCTG N9831 - North Central Cancer Treatment Group

NSABP National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project

RE Receptor de estrógeno

RNA Ácido ribonucléico

RP Receptor de progesterona

SEER Surveillance, Epidemiology, End Results

SOE Sem outra especificação

TMA Microarranjo de tecido (*tissue microarray*)

TNM T= tamanho tumoral; N= envolvimento dos linfonodos axilares por tumor; M= presença ou ausência de metástases sistêmicas

UFMG Universidade Federal de Minas Gerais

## LISTA DE FIGURAS, TABELAS E QUADROS

### Figuras

Figura 1 – Positividade dos marcadores moleculares.....	40
Figura 2 – Sobrevida global e livre de doença das pacientes jovens e idosas com câncer de mama (probabilidade de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier). SG = sobrevida global.....	79
Figura 3 – Sobrevida global e livre de doença das pacientes jovens e idosas com câncer de mama e tumores triplo-negativos (probabilidade de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier). SVLD = sobrevida livre de doença.....	79
Figura 4 – Sobrevida global e livre de doença das pacientes jovens e idosas com câncer de mama nos tumores de fenótipo basal (probabilidade de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier). SG= sobrevida global.....	79

### Tabelas

Tabela 1 – Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imuno-histoquímicas .....	36
Tabela 2 – Características clínicas de pacientes muito jovens ( $\leq 35$ anos) e pós-menopausa (entre 50 e 65 anos) com carcinomas de mama .....	77

### Quadros

Quadro 1 – Sistemas de graduação histológica dos carcinomas mamários.....	37
Quadro 2 – Pontuação proposta por ALLRED <i>et al</i> , 1998 e confirmada pelo Consenso de Saint Gallen, 2005 .....	38
Quadro 3 – Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Sociedade Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF <i>et al</i> , 2007): coloração da membrana .....	38

## RESUMO

**Objetivo:** Avaliar características clínicas, patológicas e moleculares de carcinomas mamários em mulheres muito jovens ( $\leq 35$  anos) comparando com mulheres pós-menopausa (idade entre 50 - 65 anos).

**Material e Método:** Foram selecionados 106 casos de câncer de mama de mulheres jovens e 130 casos em mulheres pós-menopausa, e analisados dados clínicos (idade ao diagnóstico, estadiamento, ocorrência de metástases, tempos de sobrevida global e livre de doença), anátomo-patológicos (tamanho do tumor, tipo e graus histológicos do tumor primário) e marcadores moleculares (receptores de estrógeno e progesterona, HER2, p53, p63, citoqueratinas 5 e 14 e EGFR) através da imuno-histoquímica empregando microarranjo de tecido. Foi analisada a relação entre as características clínico-patológicas, imuno-histoquímicas e sobrevidas global e livre de doença.

**Resultados:** O estudo comparativo dos dois grupos mostrou que as pacientes muito jovens apresentaram maior frequência de nuliparidade ( $p = 0,03$ ), maior diâmetro dos tumores ( $p = < 0,000$ ), estadiamento clínico mais avançado ( $p = 0,01$ ), maior número de linfonodos positivos ( $p = 0,001$ ) e tumores pouco diferenciados ( $p = 0,004$ ). A maioria das pacientes jovens recebeu tratamento com quimioterapia (90,8%) e radioterapia (85,2%) e em menor proporção com tamoxifeno (31,5%) comparado às mulheres na pós-menopausa. O receptor de estrógeno apresentou baixa positividade 49,1% ( $p = 0,01$ ) e a proteína HER2 alta positividade 28,7% ( $p = 0,03$ ) nas mulheres jovens. O fenótipo triplo-negativo foi observado em 29,6% no grupo jovem e em 20% nas mulheres pós-menopausadas ( $p = 0,034$ ). Os tumores de fenótipo basal foram mais frequentes nas mulheres jovens (50%). As metástases sistêmicas ocorreram em 55,3% casos nas jovens e 39,2% nas mulheres pós-menopausa. A sobrevida global e livre de doença em 5 anos foram, respectivamente, 63% e 39% para as mulheres jovens e 75% e 67% para o grupo de mulheres pós-menopausadas.

**Conclusões:** Carcinomas mamários de mulheres muito jovens têm características clínicas, patológicas e moleculares mais agressivas quando comparadas às mulheres acima de 50 anos.

**Unitermos:** Neoplasia de mama, Grupos Etários, Mulheres, Prognóstico, Sobrevida.

## ABSTRACT

**Purpose:** The objective of this study was to evaluate the clinical, pathological and molecular characteristics in very young women ( $\leq 35$  years) and postmenopausal (50-65 years) women with breast cancer. **Methods:** We selected 106 cases of breast cancer of very young women ( $\leq 35$  years) and 130 cases of postmenopausal women. We evaluated clinical characteristics of patients (age at diagnosis, ethnic group, family history of breast cancer, staging, presence of distant metastases, overall and disease-free survival), pathological characteristics of tumors (tumors size, histological type and grade, axillary lymph nodes status) and expression of molecular markers (hormone receptors, HER2, p53, p63, cytokeratins 5 and 14 and EGFR) using immunohistochemistry and tissue microarray.

**Results:** When comparing clinicopathologic variables between the age groups, younger women demonstrated greater frequency nulliparity ( $p = 0.03$ ), larger tumors ( $p = < 0.000$ ), higher stage disease ( $p = 0.01$ ), lymph node positivity ( $p = 0.001$ ) and higher grade tumors ( $p = 0.004$ ). Most of young patients received chemotherapy (90,8%) and radiotherapy (85,2%) and less tamoxifen therapy (31,5%) comparing with postmenopausal women. Lower estrogen receptor positivity 49,1% ( $p = 0.01$ ) and higher HER2 overexpression 28,7% ( $p = 0.03$ ) were observed in young women. In 32 young patients (29.6%) and in 26 postmenopausal women (20%), the breast carcinomas were of the triple-negative phenotype ( $p = 0,034$ ). In 16 young women (50%) and in 10 postmenopausal women (7,7%), the tumors expressed positivity for cytokeratin 5 and/or 14, basal phenotype ( $p = 0,064$ ). Systemic metastases were detected in 55,3% in young women and in 39,2% in postmenopausal women. Breast cancer overall survival and disease-free survival in 5 years were, respectively, 63% and 39% for young women and 75% e 67% for postmenopausal women.

**Conclusions:** Breast cancer arising in very young women showed negatives clinicobiological characteristics and more aggressive tumors.

**Key words:** Breast Neoplasms, Biological Markers, Prognosis, Age Groups, Survival.

## 1. INTRODUÇÃO

---

### 1.1 Câncer de Mama e Aspectos Gerais

Apesar dos avanços nas pesquisas, o câncer de mama, continua sendo uma doença com altas taxas de mortalidade em todo o mundo. Fatores como etnia, idade, hábitos alimentares, estilo de vida, mudança nos fatores reprodutivos, uso de reposição hormonal, exposição a fatores ambientais, história familiar para câncer de mama, presença de mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e a alta densidade mamária são fatores que interferem no desenvolvimento e diagnóstico do câncer de mama (FEJERMAN & ZIV, 2008; VOGEL, 2008).

A mamografia é o método mais comum usado no rastreamento do câncer de mama e reduz a mortalidade em 20 a 35% em mulheres entre 50 e 69 anos (ELMORE *et al*, 2005). Uma das principais limitações para o diagnóstico e controle do câncer de mama nos países em desenvolvimento é o acesso restrito a esta metodologia diagnóstica. Sem dúvida, a sobrevivência global e as altas taxas de mortalidade são influenciadas pelo estágio tardio de apresentação da doença (SCHWARTSMANN, 2001).

O câncer de mama é o segundo tipo mais frequente de câncer no mundo e a neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres. A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. No Brasil, nas regiões sudeste, centro-oeste e nordeste, o câncer de mama é o tumor mais frequente entre as mulheres (seguido do câncer de pele não melanoma). Dados do INCA estimam 49.400 mil casos novos para o ano de 2008 (INCA, 2008). Nos Estados Unidos e Europa Ocidental há a expectativa do surgimento de quinhentos mil casos diagnosticados a cada ano (HICKS & KULKARNI, 2008).

O diagnóstico precoce e a introdução de tratamentos mais efetivos tem possibilitado o declínio das mortes por câncer de mama e melhorado a qualidade de vida de pacientes com a doença. Pesquisas sobre as características moleculares dos tumores mamários preditivos de resposta terapêutica têm permitido que estratégias de tratamento sejam definidas de maneira mais eficaz (GRALOW *et al*, 2008).

## 1.2. Câncer de mama e idade ao diagnóstico

A idade é um importante fator de risco para o desenvolvimento da maioria dos tumores humanos, incluindo o câncer de mama. Em torno de 80% de todos os carcinomas mamários ocorrem em mulheres com idade  $\geq 50$  anos. A probabilidade de desenvolver carcinoma invasor da mama em 10 anos é menor que 1,5% aos 40 anos, 3% aos 50 anos e maior que 4% aos 70 anos, resultando em risco cumulativo ao longo da vida de 13,2%. O câncer de mama ocorre com uma frequência nove vezes maior em mulheres menopausadas ( $> 50$  anos) que em mulheres muito jovens (YAU *et al*, 2007).

Enquanto a maioria dos carcinomas mamários ocorre em mulheres pós-menopausadas, aproximadamente 2 a 5% dos tumores surgem em mulheres abaixo de 35 anos (GONZALEZ-ANGULO *et al*, 2005; GUERRA *et al*, 2003; FERNANDOPULLE *et al*, 2006).

São controversos os estudos que demonstram a idade como um fator prognóstico independente de sobrevida. Enquanto alguns mostram que as mulheres jovens apresentam pior prognóstico quando comparadas com mulheres de mais idade (KROMAN *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2003; LEONG *et al*, 2004; GONZALEZ-ANGULO *et al*, 2005; EL-SAGHIR *et al*, 2006; ELKUM *et al*, 2007), outros concluíram não haver impacto da idade no prognóstico (BONETT *et al*, 1990; EPSTEIN *et al*, 1989; SUTHERLAND & MATHER, 1985; KOLLIAS *et al* 1996).

Alguns aspectos devem ser considerados em pacientes muito jovens ( $\leq 35$  anos). O diagnóstico precoce do câncer de mama nesta faixa etária está, frequentemente, dificultado pela maior densidade mamária, baixa sensibilidade à mamografia e pela interpretação equivocada dos achados como benignos (FOXCROFT *et al*, 2004). A sensibilidade da mamografia é menor em mulheres abaixo de 50 anos (63% a 86%) comparada a mulheres com idade superior a 50 anos, 89% a 94% (BRADLEY *et al*, 2002). Além disto, o diagnóstico do câncer de mama em mulheres muito jovens necessita de uma abordagem cuidadosa pois a conduta terapêutica deverá levar em consideração algumas situações especiais como gravidez, fertilidade e contracepção, sexualidade e imagem corporal, questões familiares e genéticas (AEBI, 2005).

Mulheres com idade  $\leq 35$  anos portadoras de carcinomas mamários, por apresentarem comportamento clínico-biológico diferente dos tumores que acometem mulheres pós-menopausa, foram consideradas desde a conferência de *Saint Gallen* de 1998 como um grupo de pior prognóstico, para o qual o uso de terapia sistêmica deve ser mais agressiva. Na Conferência de *Saint Gallen*, em 2005, especialistas definiram como principal fator a ser considerado na decisão do tratamento adjuvante a positividade ou não dos receptores hormonais. Propuseram também, critérios dividindo os tumores de mama em subgrupos de baixo, intermediário e alto riscos, baseados nos fatores clínicos (incluindo a idade) e histológicos, que em conjunto à presença ou ausência de receptores hormonais devem orientar a decisão sobre o tratamento a ser proposto às pacientes. Nenhum dos consensos, no entanto, concorda em como tratar as pacientes jovens com câncer de mama com axila negativa.

Segundo os critérios atualmente utilizados, cerca de 95% das mulheres jovens nos Estados Unidos e 85% na Europa seriam elegíveis para receberem quimioterapia adjuvante (TUMA, 2004). Desta forma muitas pacientes, que poderiam já estar adequadamente tratadas apenas com a cirurgia, recebem tratamentos desnecessários com potenciais efeitos adversos, trazendo mais malefícios que benefícios. Entretanto, estudos mostram que mulheres jovens consideradas de baixo risco que não recebem tratamento citotóxico adjuvante apresentam maior risco de morte (KROMAN *et al*, 2000; PEPPERCORN & PARTRIDGE, 2008).

O risco de recidiva locorregional e morte também é maior comparado a mulheres pós-menopausa após o diagnóstico (PEPPERCORN & PARTRIDGE, 2008). Os tumores nas jovens apresentam comportamento biológico mais agressivo e estão associados a prognóstico mais desfavorável. São tumores de alto grau, infiltrantes, com margens comprometidas, alta fração de proliferação, maior invasão vascular, mais linfonodos comprometidos, e normalmente, não expressam receptores hormonais (WALKER *et al*, 1996; FERNANDOPULLE *et al*, 2006; YAU *et al*, 2007; ANDERS *et al*, 2008). Apesar do tratamento agressivo, as taxas de recorrência local e metástases a distância são elevadas (BONNIE *et al*, 2005).

Além destas características, estudos descrevem que a incidência do câncer de mama em mulheres jovens está relacionado à etnia. CAREY e colaboradores (2006) mostraram que as mulheres premenopausadas, negras, afro-americanas apresentam duas vezes maior possibilidade de desenvolver carcinoma de fenótipo basal (subtipo de carcinoma mamário



caracterizado por expressão gênica de pior prognóstico) quando comparadas tanto com mulheres brancas como com mulheres pós-menopausa afro-americanas.

Mutações no gene BRCA1, gene localizado no cromossomo 17, estão presentes em 5% das mulheres com câncer de mama e apresentam risco aumentado para o aparecimento de câncer de mama de 50%-85% dos casos durante a vida da mulher. O BRCA2, gene localizado no cromossomo 13, está relacionado com o aparecimento do câncer de mama em idade precoce e à ocorrência de câncer de mama masculino. Carcinomas mamários com mutações genéticas são mais frequentes em mulheres jovens (FOULKES, 2004; ROUKOS & BRIASOULIS, 2007).

O crescente aumento nas pesquisas dos carcinomas mamários em mulheres muito jovens (idade  $\leq$  35 anos), cuja frequência da doença é baixa (2 a 5%), é baseado nas características menos favoráveis e piores curvas de sobrevida global e livre de doença deste subgrupo descritas na literatura (WALKER *et al*, 1996; GUERRA *et al*, 2003; GONZALEZ-ANGULO *et al*, 2005; FERNANDOPUPPLE *et al*, 2006).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

---

### 2.1. Fatores Prognósticos e Preditivos

Em 1977, BERNAD FISCHER descreveu o câncer de mama como uma doença sistêmica. Desde então, vários critérios têm sido discutidos na abordagem desta doença tão heterogênea e de comportamentos clínicos e biológicos distintos. Os fatores prognósticos e preditivos são usados para determinar a conduta no tratamento do câncer de mama.

O *status* linfonodal é considerado o mais importante parâmetro prognóstico. Embora o seu acometimento por metástases seja determinante de pior prognóstico, 30% das pacientes com câncer de mama linfonodo-negativas irão morrer da doença se nenhum tratamento adjuvante for realizado (SOONTRAPORNCHAI *et al*, 2007). Entretanto, apesar de ser potencialmente benéfico, o tratamento adjuvante envolve drogas citotóxicas ou hormonais que apresentam efeitos indesejáveis tornando-o restrito a um grupo de pacientes destinadas a apresentar recorrência da doença, ou morrer em decorrência desta (CIANFROCCA & GOLDSTEIN, 2004).

As decisões terapêuticas usadas na conduta dos carcinomas mamários são baseadas nos fatores prognósticos e preditivos. Fatores prognósticos são características clínicas dos pacientes associados aos aspectos patológicos e biológicos de seus tumores que tem a capacidade de prever o comportamento clínico da doença ou a sobrevivência do paciente no momento do diagnóstico. Por outro lado, os fatores preditivos são definidos como características clínicas, patológicas e biológicas que são usadas para estimar a probabilidade de resposta a um determinado tipo de terapia adjuvante (ALLRED, 1998).

Os parâmetros prognósticos considerados de risco e baseados na estratificação das pacientes em grupos de baixo, intermediário e alto risco, segundo a Conferência de Consenso de Saint Gallen de 2005, são idade, tamanho do tumor, grau histológico, invasão vascular peritumoral, metástases em linfonodos e superexpressão de HER2 (GOLDHIRSCH *et al*, 2005).

### 2.1.1. Tamanho Tumoral, Linfonodos Axilares, Invasão Vascular Peritumoral e Grau Histológico

O tamanho tumoral e a condição dos linfonodos axilares são os dois mais importantes indicadores prognósticos para o câncer de mama, constituindo a base do estadiamento clínico TNM: T= tamanho tumoral; N= envolvimento dos linfonodos axilares por tumor; M= presença ou ausência de metástases sistêmicas (ABREU & KOIFMAN, 2002).

O tamanho tumoral é um importante fator prognóstico do comportamento do câncer de mama. Está relacionado ao desenvolvimento de metástases, recidiva e abordagem terapêutica ao diagnóstico. A frequência de metástases em linfonodos em tumores menores de 1cm é 10% a 20%. Pacientes com linfonodos negativos e tumores menores que 1cm têm 90% de sobrevida livre de doença em 10 anos (FITZGIBBONS *et al*, 2000).

Dados baseados no SEER (Surveillance, Epidemiology, End Results) incluindo 13464 mulheres com carcinoma mamário linfonodo-negativo observaram que pacientes com tumores < 1cm tiveram sobrevida global em 5 anos de 99%, comparada com 89% para tumores entre 1 e 3 cm e 86% para tumores entre 3 e 5 cm (CIANFROCCA & GOLDSTEIN, 2004). ROSEN e colaboradores avaliaram a relação entre o tamanho do tumor e a sobrevida livre de doença em 20 anos e encontraram 88% para tumores  $\leq$  1cm, 72% para tumores de 1,1cm a 3cm e 59% para tumores entre 3,1 e 5 cm (ROSEN *et al*, 1993).

O envolvimento dos linfonodos axilares por metástases é o principal fator prognóstico em mulheres com câncer de mama. A presença de metástases nos linfonodos aumenta o risco de metástase à distância e influencia nas decisões terapêuticas (GADJOS, 1999). Somente 20% a 30% de pacientes com linfonodos negativos desenvolverão recorrência em 10 anos comparadas com 70% para pacientes com metástases axilares (FITZGIBBONS *et al*, 2000).

Admite-se que a recorrência seja devida a metástases que não foram detectadas pelos métodos de rotina, gerando um subestadiamento das pacientes (MARINHO *et al*, 2004). O número absoluto de linfonodos envolvidos é também um importante fator prognóstico. Carcinomas mamários com 4 ou mais linfonodos comprometidos tem pior prognóstico que os que apresentam menos de 4 linfonodos envolvidos (FITZGIBBONS *et al*, 2000; GOLDBIRSCHE *et al*, 2005).

Estudos que estratificam os carcinomas mamários de acordo com o número de linfonodos acometidos mostram que a sobrevida em 5 anos de pacientes com linfonodos negativos é de 82,2% comparada com 73% para 1-3 linfonodos positivos, 45,7% para 4-12 linfonodos positivos e 28,4% para mais de 13 linfonodos positivos (FISCHER *et al*, 1983; CIANFROCCA & GOLDSTEIN, 2004). Portanto, o status do linfonodo axilar é o fator mais consistente usado na decisão da terapia adjuvante.

A invasão do espaço linfo-vascular (ILV) no carcinoma mamário é um fator preditivo independente para metástases em linfonodos axilares (COLLEONI *et al*, 2007; BARGHAVA & DABBS, 2007; MARINHO *et al*, 2008). A ILV peritumoral é, também, preditiva para recorrência local. Estudo mostrou taxa de recorrência de 38% para pacientes com carcinomas de mama em estágio I, com ILV positiva, comparada à 22% para casos com ILV negativa (ROSEN *et al*, 1989).

O grau histológico é definido como fator prognóstico por estar, fortemente, associado à sobrevida global e livre de doença (RAKHA *et al*, 2008). A graduação histológica apresenta correlação bem estabelecida com a sobrevida das pacientes. A sobrevida em 5 anos para os graus histológicos I, II e III é respectivamente, 75%, 53% e 31% (BLOOM & RICHARDSON, 1957).

Apesar da utilidade destes parâmetros na conduta terapêutica, o curso clínico da doença é variável devido às características individuais de cada tumor.

### 2.1.2. Receptores Hormonais

O receptor de estrógeno foi identificado em 1960. A partir de então, estudos têm demonstrado a sua importância no manejo do câncer de mama (MANN *et al*, 2005; WALKER, 2008).

Os receptores hormonais são proteínas nucleares expressas pelas células do epitélio mamário que controlam a mediação dos efeitos do estrogênio e da progesterona neste epitélio. Sua positividade está associada a um menor risco de recidiva e aumento da sobrevida (CIOCCA *et al*, 2006).

Os métodos utilizados para determinação dos receptores hormonais são baseados em duas estratégias distintas: a primeira envolve a ligação competitiva de um ligante esteróide radioativamente marcado para detectar o receptor, enquanto a segunda faz o reconhecimento da proteína receptora por meio de anticorpos específicos. Estudos compararam os dois métodos (ensaio de ligação do ligante x imuno-histoquímica) mostrando que a relação entre eles é elevada entre 80 e 90% (HANNA & MOBBS, 1989; ALLRED *et al*, 1990; HARVEY *et al*, 1999). Devido a sua relativa simplicidade, não exigindo o uso de equipamentos especializados, a imuno-histoquímica tem se tornado o método predominante para a medida de receptores hormonais na prática clínica (MANN *et al*, 2005).

A resposta da terapia endócrina em pacientes com câncer de mama é guiada pela expressão de dois receptores hormonais: receptor alfa de estrogênio e/ou receptor de progesterona. A identificação de pacientes com câncer de mama que responderiam à terapia anti-estrogênica é muito importante, pois estas drogas são efetivas somente naquelas pacientes com receptores hormonais positivos (ALLRED *et al*, 1998; MANN, *et al*, 2005).

Aproximadamente, 60% a 75% dos carcinomas mamários são hormônio-dependentes, positivos para receptor de estrogênio e/ou progesterona (RUGO, 2008). A manipulação endócrina com tamoxifeno, inibidor da aromatase e ablação ovariana faz parte da terapia adjuvante na doença detectada em estágio precoce e doença metastática para os carcinomas mamários (MANN *et al*, 2005).

O estudo randomizado publicado por Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group incluindo 37000 mulheres mostrou redução do risco de recorrência e mortalidade de 47% e 26%, respectivamente, para pacientes receptoras hormonais positivas tratadas com 5 anos de tamoxifeno adjuvante independente do status dos linfonodos axilares (1998).

Do ponto de vista prognóstico, a expressão destes receptores propicia às pacientes vantagens em termos de sobrevida livre de doença e sobrevida global com taxas de 10 a 15% favorecendo pacientes com receptores hormonais positivos (ALLRED *et al*, 1998).

### 2.1.3. HER2

A proteína HER2 pertence à família de receptores tirosinoquinases tipo 1 que consiste de

quatro membros: receptores de fator de crescimento epidérmico EGFR/HER1, HER2, HER3 e HER4 (ITO *et al*, 2007). Está amplamente validada como fator preditivo em câncer de mama (GOBBI *et al*, 2008).

O proto-oncogene *Her-2/neu* está localizado na banda q21 do cromossoma 17 e codifica uma proteína receptora transmembrana de 185kD que possui uma sequência de aminoácidos com atividade tirosinoquinase intracelular semelhante ao receptor de crescimento epidérmico e atua como um receptor de fator de crescimento. Está, ainda, envolvido com a diferenciação, adesão e motilidade celular (NANCY & ERIC, 2004).

A superexpressão da proteína HER2 é observada em 20% a 30% dos carcinomas invasores da mama (HICKS & KULKARNI, 2008). A informação sobre a superexpressão do HER2 é fundamental para o tratamento de pacientes com câncer de mama. Pacientes que superexpressam a proteína HER2 ou amplificam o gene *c-erbB2* são os que apresentam maior benefício com a terapia com o trastuzumab (WALKER, 2008). Estudos têm demonstrado a importância da superexpressão do HER2 como marcador prognóstico independente relacionada a menor sobrevida global e tempo livre de doença (SLAMON *et al*, 1987; MÉNARD *et al*, 2001; VIANI *et al*, 2007; RYDÉN *et al*, 2008). O estudo pioneiro foi publicado por SLAMON e colaboradores, sugerindo uma clara associação entre a expressão amplificada do gene *c-erbB2* e o pior prognóstico em 189 carcinomas mamários invasores em pacientes com linfonodos positivos. A superexpressão ainda está associada a indicador de resistência à terapia antiestrogênica com tamoxifeno e preditor de benefício com tratamento quimioterápico baseado em antraciclina e associado ao uso do anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2 (trastuzumab) tanto na adjuvância como na doença metastática (PAIK *et al*, 2000; VIANI *et al*, 2007).

O interesse na amplificação do gene ou superexpressão da proteína HER2 está na sua utilidade em prever a resposta terapêutica do câncer de mama à terapia com anticorpos anti-HER2. O exemplo é o trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado direcionado contra o domínio extra-celular da proteína HER2 usado no tratamento de carcinomas mamários HER2 positivos (PRITCHARD *et al*, 2006). A terapia com trastuzumab prolonga a sobrevida de pacientes com doença metastática quando combinada à quimioterapia e, recentemente, tem mostrado melhora significativa na sobrevida livre de doença no tratamento adjuvante quando usado conjuntamente ou seguido de quimioterapia (VIANI, 2007). HICKS & KULKARNI

(2008), em estudo de revisão descreveram os resultados de quatro grandes ensaios clínicos randomizados (NSABP B31, NCCTG N9831, HERA, BCIRG 006). Estes estudos, envolvendo 13.353 mulheres, mostraram melhora na resposta à adjuvância com trastuzumab com taxas de sobrevida livre de doença de 36 a 52%, sobrevida global de 33 a 41%, redução do risco relativo de recidiva em, aproximadamente, 50% e do risco de morte em, aproximadamente, 30% (HICKS & KULKARNI, 2008). Além do trastuzumab, outras drogas que atuam contra os receptores tirosino-quinases estão sendo desenvolvidas como terapia-alvo para o câncer de mama como o lapatinib, gefitinib e erlotinib (ITO, *et al*, 2007).

### 3. DIAGNÓSTICO MOLECULAR NO CÂNCER DE MAMA

---

Apesar dos avanços na detecção precoce e o entendimento da biologia molecular do câncer de mama, 30% das pacientes com esta neoplasia apresentam recorrência em estágio precoce da doença. Um dos maiores desafios para o estudo e tratamento do carcinoma de mama é a resolução da heterogeneidade tumoral característica destes carcinomas (PAGE *et al*, 1998). Oferecer tratamento mais efetivo e menos tóxico necessita de abordagem individualizada considerando as características clínicas das pacientes e moleculares dos carcinomas mamários (GONZALEZ-ANGULO *et al*, 2005).

A classificação morfológica atualmente utilizada é insuficiente para caracterizar os carcinomas de mama, uma vez que os tumores com o mesmo grau, estágio e tipo histológico podem apresentar diferentes prognósticos e respostas à terapia (ELSTON & ELLIS, 1991; REIS-FILHO *et al*, 2006). O surgimento das técnicas de biologia molecular iniciou uma nova era no estudo das doenças malignas. Com o advento das técnicas moleculares em larga escala, o entendimento das características moleculares dos tumores começou a desempenhar um papel importante no diagnóstico, prognóstico e como valor preditivo na maioria dos tumores malignos. A caracterização sistemática e detalhada dos tumores em uma escala genômica pôde ser correlacionada com informações clínicas, contribuindo, desta forma, para aumentar o entendimento das causas e progressões do carcinoma e para capacitar a descoberta de novos marcadores moleculares, possibilitando intervenções terapêuticas (NIELSEN *et al*, 2004). Atualmente, o câncer de mama é o tumor que mais vêm sendo estudado pelos métodos moleculares (REIS-FILHO *et al*, 2008).

O microarranjo de DNA, técnica introduzida em meados de 1990, é utilizada para analisar o perfil de expressão gênica dos tumores, isto é a expressão de genes selecionados em amostras pré-determinadas avaliando milhares de genes em uma única amostra (CHEANG *et al*, 2008). Esta técnica envolve um *chip* com seqüência genética que é analisado e hibridizado contra RNA obtido do tumor a ser estudado marcado com corante fluorescente. A combinação das cores e a intensidade de cada uma informam ao computador a expressão gênica. Cada fragmento de DNA é colocado em uma seqüência gradeada sobre uma superfície sólida (*chip*). Cada fragmento individual contém alta concentração de um único fragmento de DNA que mapeia genes específicos ou uma seqüência genômica (FU & JEFFREY, 2007).



A tecnologia de microarranjo de DNA é aplicada para classificação molecular dos subtipos de câncer de mama, na avaliação da sobrevida, na resposta ao tratamento e na identificação de novos agentes terapêuticos (FU & JEFFREY, 2007; CHEANG *et al*, 2008). Os dois tipos principais de microarranjos de expressão gênica são os de cDNA e os de oligonucleotídeos. Ambos os tipos de microarranjos são hibridizados com amostras de cDNA ou RNA obtidos dos tecidos de interesse, para avaliar as alterações em seus níveis de expressão (RAKHA *et al*, 2008; CHEANG *et al*, 2008).

A habilidade de medir a expressão dos genes em linhagens celulares e espécimes de tumor expandiram o entendimento sobre a biologia tumoral. Os primeiros estudos publicados pelo grupo da Universidade de Stanford, Califórnia, USA, mostraram que a técnica de micrarranjo de DNA complementar poderia identificar a assinatura genética das células do câncer de mama. O primeiro maior estudo publicado sobre o perfil de expressão gênica em tumores de mama foi descrito em 2000, quando PEROU e colaboradores demonstraram a classificação biológica dos tumores de mama baseada em suas similaridades genéticas (PEROU *et al*, 2000; CHEANG *et al*, 2008). Estas interpretações moleculares foram validadas por SORLIE e colaboradores (2001 e 2003).

Originalmente, PEROU *et al*, mostraram que os tumores de mama eram divididos em dois grupos principais definidos pelo *status* do receptor de estrógeno (2000). A partir daí, os carcinomas mamários foram classificados em quatro subtipos de acordo com a sua expressão molecular: luminais, HER2 positivos, basais e “mama normal” (PEROU *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2001; REIS-FILHO *et al*, 2006; JEFFREY *et al*, 2007; MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008; CHEANG *et al*, 2008). Uma importante implicação desse estudo é que os tumores clinicamente designados como receptor de estrogênio negativos abrangem pelo menos dois subtipos de tumores biologicamente distintos (basal e HER2-positivo) que devem ser tratados de forma diferente um do outro (MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

Estudos recentes têm mostrado boa correlação entre o perfil de expressão gênica e detecção dos marcadores moleculares por imuno-histoquímica. O rápido desenvolvimento de novos anticorpos proporcionou ao longo dos anos maior sensibilidade e especificidade para os marcadores moleculares (BARGHAVA & DABBS, 2007, ROCHA *et al*, 2008). A contribuição da imuno-histoquímica em carcinomas mamários é bem estabelecida por estudos que a utilizam para a seleção de tratamentos para pacientes com câncer de mama. A expressão

protéica dos receptores de estrógeno e progesterona e HER2 são fatores preditivos validados para a terapia do câncer de mama (ALLRED, 1998; FITZGIBBONS *et al*, 2000; UMEMURA *et al*, 2004; GOLDHIRSCH *et al*, 2005; GOUVÊA *et al*, 2006; BARGHAVA & DABBS, 2007; ROCHA *et al*, 2007; REIS - FILHO, 2007; GOBBI *et al*, 2008; WALKER, 2008).

### 3.1. Subtipos moleculares

**Tumores luminais** são caracterizados por expressarem os receptores de estrógeno (RE) e ter perfil semelhante ao das células luminais do epitélio mamário normal. Este subgrupo foi estratificado em luminal A, B e C por apresentarem expressão gênica distintas e diferentes comportamentos clínicos. Os tumores luminais A apresentam alta expressão de RE e genes relacionados ao RE enquanto os tumores luminais B apresentam alta expressão de genes relacionados ao ciclo celular e proliferação e ainda expressam a proteína HER2 (SORLIE *et al*, 2001, MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

Os tumores com negatividade para os receptores de estrógeno compreendem dois subgrupos distintos: um grupo com superexpressão da proteína HER2 e os tumores de fenótipo basal que apresentam comportamento clínico mais agressivo quando comparado aos tumores pertencentes aos outros subgrupos moleculares (SORLIE *et al*, 2001; SORLIE *et al* 2003; ROUZIER *et al*, 2005).

**Tumores HER2** positivos são caracterizados por altos níveis de genes pertencentes à amplificação do HER2 e negatividade para os receptores de estrogênio (MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

**Tumores de fenótipo basal** expressam genes e proteínas que são específicos das células basais do epitélio mamário, incluindo as citoqueratinas basais e negatividade para receptores de estrógeno, receptores de progesterona e HER2 (RAKHA *et al*, 2007).

E o último grupo, chamado de tumores **não-classificáveis ou tipo “mama normal”**, cujo perfil de expressão gênica é similar ao do parênquima mamário normal e fibroadenomas. Estes tumores podem sobreexpressar genes de células basais e subexpressar genes luminais epiteliais. Os carcinomas lobulares invasores podem expressar este perfil (MARCHIÒ & REIS-FILHO, 2008).

Apesar do estudo do perfil de expressão gênica, através das técnicas de microarranjo de DNA, possibilitar informações de grande valor para o entendimento da biologia tumoral, é uma técnica de alto custo e pouca aplicabilidade clínica. É uma técnica ainda inacessível na maior parte dos centros que tratam pacientes com câncer de mama. O uso de técnicas de imuno-histoquímica, possibilitando a identificação dos subtipos moleculares descritos nos estudos de análise da assinatura genética é de fundamental importância, principalmente quando consideramos as limitações econômicas encontradas em países como o Brasil.

Recentes pesquisas avaliando perfis imunoistoquímicos através da técnica de microarranjo de tecido (*Tissue microarray* ou TMA), foram capazes de, pelo menos parcialmente, replicar a referida classificação molecular (ABD EL-REHIM *et al*, 2005; NIELSEN *et al*, 2004; SORLIE *et al*, 2003). A sua utilização na determinação do perfil molecular no diagnóstico de neoplasias possibilitou validar novos marcadores tumorais, correlacionar os resultados com a aplicação terapêutica e, conseqüentemente, avaliar alvos moleculares em um grande número de amostras paralelas de tumor, num mesmo período de tempo, com o custo de uma única reação (KONONEN *et al*, 1998; VIEIRA *et al*, 2008).

Concluindo, estes avanços têm possibilitado a estratificação dos carcinomas mamários justificando a denominação de doença heterogênea, auxiliando tanto o diagnóstico quanto a conduta mais adequados para os tumores de mama.

### **3.2. Tumores de fenótipo basal**

Em 1987, DAIRKEE e colaboradores descreveram um subgrupo de carcinomas mamários que, de forma semelhante às células do epitélio normal da mama, expressavam citoqueratinas basais (CK) de alto peso molecular e apresentavam pior prognóstico. Estudos posteriores mostraram a presença das CK em carcinomas mamários e sua correlação com pior prognóstico e ausência de expressão de receptores hormonais e HER-2 (SANTINI *et al*, 1996; MALZAHN *et al*, 1998).

A importância da descrição das CK nos tumores mamários ficou melhor definida após os trabalhos de PEROU (2000) e SORLIE (2001 e 2003) mostrando a classificação dos carcinomas mamários de acordo com sua expressão gênica. Após estas pesquisas, o subgrupo

de carcinomas mamários definidos como tumores de fenótipo basal têm sido estudado, exaustivamente, devido às suas características clínicas, morfológicas e imunofenóticas de pior prognóstico. Este perfil está ligado a mutações genéticas no BRCA1 (PAREDES *et al*, 2007), e é um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois tem associação com pior prognóstico (TANNER *et al*, 2000; TURNER & REIS-FILHO, 2006) além de não possuir alvo terapêutico definido, como os demais subtipos. Portanto, não responde ao tratamento com drogas antiestrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2 (MATOS *et al*, 2005).

Morfologicamente, os carcinomas de fenótipo basal apresentam alto grau, altas taxas de proliferação, necrose e zona acelular central, padrão de crescimento expansivo, com bordas não infiltrativas, graus variáveis de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário peritumoral. O tipo histológico mais frequentemente associado ao fenótipo basal é o carcinoma ductal invasor sem outra especificação, com proporções que variam de 68,4% a 86% dos tumores basais (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; ABD EL-REHIM *et al*, 2005; KIM *et al*, 2006; NIELSEN *et al*, 2004; RAKHA *et al*, 2006). Entretanto, pode ser encontrado em subtipos histológicos específicos como os carcinomas metaplásicos e medulares com ou sem associação com mutações no gene BRCA1 ou esporádica mutação no gene *p53* e/ou superexpressão da proteína *p53* (KORSCHING *et al*, 2008).

A frequência do subtipo *basal* nos tumores de mama varia entre 15 e 19%, estando associados com um curto intervalo livre de doença sendo o grupo de tumores mais agressivos (SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003; NIELSEN *et al.*, 2004, KORSCHING, *et al*, 2008).

Apesar da variedade de marcadores moleculares propostos para a definição dos tumores de fenótipo basal, estudos recentes definem os tumores mamários de fenótipo basal como aqueles que expressam as citoqueratinas de alto peso molecular, independentemente da expressão de outros marcadores (RAKHA *et al*, 2007; RAKHA *et al*, 2008).

#### 4. MICROARRANJO DE TECIDO (TMA) E CÂNCER DE MAMA

---

O completo sequenciamento do genoma humano promoveu informações básicas de toda a estrutura dos genes humanos. Várias técnicas como o DNA complementar, análise seriada da expressão gênica e pesquisas proteômicas possibilitaram a análise da expressão de milhares de genes e proteínas (PEROU *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2001; SORLIE *et al*, 2003; REIS-FILHO *et al*, 2006; FU & JEFFREY, 2007).

Surgiu então, a necessidade de analisar melhor estas moléculas em amostras de tecido para elucidar sua importância como biomarcadores ou alvos fisiológicos de prevenção baseados em drogas ou tratamentos específicos (FU & JEFFREY, 2007; MARCHIÒ, 2008; CHEANG *et al*, 2008).

O TMA tem sido considerado uma etapa necessária à consolidação do conhecimento adquirido através do mapeamento genético dos estudos realizados com a técnica de “cDNA Microarrays”. Esta técnica determina quais as dezenas ou centenas de genes estão superexpressos ou hipoexpressos em um tumor e que poderiam ser responsabilizados por alguma particularidade biológica, tais como o rápido crescimento, o potencial de recorrência local ou de metástase à distância, ou ainda, resistência à quimioterapia (SAUTER *et al.*, 2002).

A técnica de microarranjo de tecido (TMA) ou tissue microarray é uma tecnologia simples que tem revolucionado as pesquisas em patologia. Esta técnica definida como o agrupamento de um grande número de amostras teciduais em um único bloco de parafina, permite a análise da expressão protéica dos tumores através da técnica imuno-histoquímica, reação de hibridação *in situ* cromogênica (CISH) ou fluorescente (FISH). A metodologia foi descrita por KONONEN *et al* (1998) e é, atualmente, aceita pela literatura mundial.

As vantagens e aplicações da técnica do TMA comparada à técnica convencional, incluem a maior velocidade da análise molecular, os tecidos não são completamente destruídos, pesquisa em larga escala de fatores prognósticos ou preditivos das neoplasias, validação ao nível protéico da hiperexpressão ou hipoexpressão gênica identificada nos estudos feitos pela análise da quantificação do DNA complementar, um grande número de marcadores moleculares podem ser analisados a partir de vários cortes consecutivos, economia de

reagentes e de tempo para a realização das reações e a avaliação uniforme de vários tumores representados em diferentes estágios, graus e subtipos histológicos. A capacidade de estudar tecidos arquivados é uma importante vantagem, que usualmente não são aplicadas às outras pesquisas genômicas (ZHANG *et al*, 2003, ANDRADE *et al*, 2007).

Na avaliação dos carcinomas mamários, estudos têm demonstrado concordância elevada (94% e 98%) com as reações nos cortes histológicos usuais para a avaliação de marcadores imunoistoquímicos e as amostras do TMA na validação da metodologia (CAMP *et al*, 2000; DE MARZO & FEDOR, 2004).

#### **4.1. Técnica do TMA**

A grande maioria dos TMAs são construídos a partir de material conservado e fixado em formalina e arquivados em blocos de parafina. Lâminas iniciais contendo tecido com suficiente representatividade tumoral são coradas com hematoxilina-eosina antes de iniciar as colorações pré-determinadas para os tecidos selecionados. A construção de um bloco de TMA segue diversos passos até a análise das reações:

##### **4.1.1. Seleção dos casos e áreas a serem representadas**

Esta seleção é feita a partir da avaliação das lâminas originais do tumor. O patologista seleciona as áreas onde o tumor é melhor representado. A seguir, estas áreas são marcadas nos blocos de parafina selecionados, denominados blocos doadores e deles são retirados cilindros de tecido cujos diâmetros podem variar de 0,6mm a 2,0mm.

##### **4.1.2. Construção do bloco receptor**

Os cilindros retirados dos blocos doadores são introduzidos em um novo bloco denominado receptor, por meio de aparelhos manuais ou semi-automatizados, seguindo uma seqüência previamente estabelecida em uma planilha. O bloco receptor final pode conter até mil amostras de tumores dependendo do diâmetro do cilindro utilizado.

#### 4.1.3. Obtenção das lâminas

Os cortes histológicos devem ser realizados de uma só vez em lâminas seqüenciais numeradas, sem descarte dos níveis intermediários para melhor aproveitamento do bloco receptor. Usualmente, são obtidas cerca de cem lâminas seqüenciais. Para a montagem, lâminas adesivas especiais, fabricadas pela Instrumedics Inc®. são utilizadas. Os cortes são colhidos em fita adesiva e aplicados nessas lâminas. Por último, a fita adesiva é retirada pela exposição à luz ultravioleta cedida pelo próprio fabricante.

#### 4.1.4. Leitura das lâminas

A leitura das lâminas do TMA é feita pelo patologista pela microscopia óptica convencional e os resultados armazenados em planilhas manuais ou computadorizadas.

## 5 – JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

---

Até o momento, os estudos sobre o perfil imunofenotípico de carcinomas mamários incluem poucas pacientes muito jovens ( $\leq 35$  anos). Além disto, há poucas séries de casos abordando marcadores tumorais, especificamente, os de fenótipo basal em câncer de mama neste grupo etário. Decidimos avaliar as características clínicas, patológicas, imunofenotípicas e evolutivas de casos de carcinomas mamários de mulheres muito jovens (idade  $\leq 35$  anos) em uma série de casos, com ênfase nos marcadores de fenótipo basal e compará-los com as mesmas características de uma série de casos de pacientes pós-menopausa (idade entre 50-65 anos).



## 6 – OBJETIVOS

---

Os objetivos deste estudo são:

- 1- Avaliar as características clínicas e patológicas de carcinomas mamários de mulheres muito jovens ( $\leq 35$  anos) e compará-las com as de mulheres com idade entre 50 e 65 anos.
- 2- Avaliar a expressão dos marcadores moleculares (receptor de estrógeno, receptor de progesterona, HER-2, p-63, p53, EGFR e citoqueratinas 5 e 14) em mulheres jovens (idade  $\leq 35$  anos) com câncer de mama e comparar a expressão dos mesmos em mulheres com idade entre 50 e 65 anos;
- 3- Avaliar a frequência dos tumores triplo-negativos e de fenótipo basal nos dois grupos selecionados;
- 4- Avaliar os tipos de tratamentos instituídos e sua relação com os fatores preditivos de resposta terapêutica;
- 5- Avaliar a sobrevida global e sobrevida livre de doença nos dois grupos em geral e, também nos tumores triplo-negativos e de fenótipo basal para estes grupos .

## 7 – PACIENTES E MÉTODOS

---

Foram selecionados 106 casos de carcinomas mamários de pacientes muito jovens (idade  $\leq 35$  anos) e 130 casos de mulheres pós-menopausa (idade entre 50-65 anos) a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, do Hospital Araújo Jorge de Goiânia, GO, e do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo, SP. Todas as pacientes foram tratadas e tinham seguimento clínico nestes hospitais. Dados clínicos e patológicos foram obtidos dos prontuários médicos e laudos anátomo-patológicos arquivados incluindo: idade, etnia (cor da pele), história familiar para câncer de mama, estadiamento clínico, características patológicas como tipo e grau histológico do tumor, tamanho tumoral, presença de metástases axilares e à distância, tratamentos realizados (quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) e evolução clínica.

Critérios de inclusão: pacientes do sexo feminino com idade  $\leq 35$  anos e entre 50-65 anos com diagnóstico de carcinoma invasor da mama, material suficiente para a construção do microarranjo de tecido (TMA), realização do tratamento cirúrgico e seguimento no mesmo hospital.

Critérios de exclusão: idade entre 35 e 50 anos e maiores que 65 anos, pacientes encaminhadas somente para tratamento de quimioterapia e/ou radioterapia e material insuficiente para a construção do microarranjo de tecido.

Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Hospital Araújo Jorge em Goiânia, Goiás, e Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, Brasil.

### **7.1. Construção do microrranjo de tecido (TMA) e estudo imunoistoquímico**

As lâminas originais foram revistas por dois examinadores (MCD e HG) e os respectivos blocos contendo amostras de tumor foram selecionados. Inicialmente, as áreas de maior representatividade do tumor foram marcadas nas lâminas. A seguir, os blocos de parafina, denominados blocos doadores, foram marcados a partir das áreas pré-definidas nas lâminas. Utilizando um equipamento manual da marca Beecher Instruments, Silver Spring, MD®, a

área selecionada foi transferida do bloco doador para o bloco receptor. Foi confeccionado um bloco de TMA contendo dois cilindros de cada bloco doador de 1,0mm de diâmetro cada. O bloco de TMA foi submetido a microtomia seriada, obtendo-se cortes histológicos com espessura de 4 µm que foram dispostos em lâminas eletricamente carregadas (Instrumedics Inc®), com o auxílio de adesivos, (Microsystems Inc®).

Os cortes histológicos sequenciais do TMA foram corados para receptor de estrógeno, receptor de progesterona, receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR ou HER1), p53 e p63, além de anticorpos dirigidos aos marcadores de diferenciação basal, citoqueratinas 5 e 14. Os clones, diluições, fabricantes e métodos de reativação antigênica são mostrados na TABELA 1. O sistema de visualização da reação utilizado foi o sistema de amplificação de polímero não biotilado (*Novolink* ®, Biosystems, Reino Unido). A análise dos marcadores seguiu critérios referidos na literatura.

**TABELA 1 - Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imuno-histoquímicas**

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante/País</b>	<b>Recuperação antigênica</b>
RE	6F11	1:1.000	Novocastra, RU	Panela elétrica a vapor/Citrato pH 6,0
RP	PGr312	1:1.000	Novocastra, RU	Panela elétrica a vapor /Citrato pH6,0
HER2	CB11	1: 80	Novocastra,RU	Não realizada
CK 5	XM26	1: 100	Neomarkers, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0
CK 14	LL002	1: 400	Biogenex, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0
EGFR	31G7	1: 200	Zymed,CA, EUA	Digestão enzimática (proteínaseK)
p63	4 <sup>a</sup> 4	1:2.000	DAKO, EUA	Banho maria/ EDTA/TRIS pH9,0
p53	D0-7	1:2.000	DAKO, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0

## 7.2. Estudo histopatológico

Todas as lâminas originais e as secções do TMA coradas pela hematoxilina e eosina (HE) foram revisadas por dois examinadores (MCD e HG) e os tumores classificados segundo as recomendações de PAGE *et al* (1998) e do Colégio Americano de Patologistas (2000). O sistema de graduação utilizado foi o estabelecido por SCARFF-BLOOM-RICHARDSON (1957) modificado por ELSTON & ELLIS (1991) no qual os tumores recebem uma pontuação

considerando-se a formação de estruturas tubulares, o grau nuclear e o índice mitótico QUADRO 1. Os tumores são classificados em grau I (bem diferenciados) quando as somas corresponderem aos resultados 3, 4 ou 5, grau II (moderadamente diferenciados) quando as somas forem 6 ou 7 e grau III (pouco diferenciados) quando os resultados forem 8 e 9.

**QUADRO 1 – Sistema de graduação histológica dos carcinomas mamários segundo ELSTON & ELLIS, 1991**

Formação tubular	Pontuação 1: > 75% da área tumoral Pontuação 2: entre 10 e 75% da área tumoral Pontuação 3: < 10% da área tumoral
Atipia nuclear	Pontuação 1: núcleos de tamanho semelhante à célula ductal normal Pontuação 2: núcleos de tamanho intermediário Pontuação 3: núcleos grandes e pleomórficos
Índice mitótico**	Pontuação 1: 1 mitose por campo de grande aumento Pontuação 2: 2 mitoses por campo de grande aumento Pontuação 3: 3 ou mais mitoses por campo de grande aumento

\*Modificado da classificação de BLOOM & RICHARDSON (1957)

\*\*Correção

Para microscópios com objetivas de grande aumento em que o campo visual possua um diâmetro de 0,48mm, o índice mitótico deve ser corrigido com a descrição seguinte [ELSTON, 1987 e SHOUSHA, 2000]:

1. 0-6 mitoses por 10 campos microscópicos de grande aumento
2. 7-12 mitoses por 10 campos microscópicos de grande aumento
3. >12 ou mais mitoses por 10 campos microscópicos de grande aumento

### 7.3. Avaliação das reações imuno-histoquímicas

A análise da positividade das reações seguiu parâmetros de análise e níveis de corte adotados na literatura internacional. Para a avaliação dos receptores hormonais foi usado o sistema de escore proposto por ALLRED *et al* que avalia a proporção de núcleos corados e a intensidade de coloração. A seguir, os dois escores são combinados e o escore total é classificado em A - escore de 0 ou 2-8. O escore total (ET) é calculado pela soma do escore de proporção e do escore de intensidade. O escore  $\geq 3$  é considerado positivo (QUADRO 2).

**QUADRO 2 – Pontuação proposta por ALLRED *et al*, 1998 e confirmada pelo Consenso de Saint Gallen, 2005**

Escore Allred	
Porcentagem do Escore	Intensidade do Escore
Escore 0 = negativo	Escore 0 = negativo
Escore 1 = 1%	Escore 1 = marcação fraca.
Escore 2 = >1 a 10%	Escore 2 = marcação moderada.
Escore 3 = >10 a 33%	Escore 3 = marcação forte.
Escore 4 = >30 a 66%	
Escore 5 = > 66 a 100%	

A análise do HER2 seguiu os critérios adotados pelo Consenso da Sociedade Americana de Oncologia Clínica e Colégio Americano de Patologistas (WOLFF *et al*, 2007), onde são considerados a intensidade e o grau de coloração da membrana (QUADRO 3).

**QUADRO 3 - Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Sociedade Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF *et al*, 2007): coloração de membrana**

PONTUAÇÃO	PADRÃO DE MARCAÇÃO
0/Negativo	Marcação da membrana ausente nas células tumorais invasivas
+1/Negativo	Coloração de membrana fraca e incompleta em qualquer proporção de células neoplásicas
+2/ Indeterminado	Coloração fraca, mas bem definida, envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática, em mais de 10% e menos de 30% das células neoplásicas
+3/Positivo	Marcação intensa e uniforme da membrana citoplasmática em mais de 30% das células tumorais

As citoqueratinas foram consideradas positivas se houvesse fraca ou forte marcação citoplasmática visualizada em 5% das células tumorais (POTEMSKI *et al*, 2005; COLLET *et*

*al* 2005 e JONES *et al*, 2004).

Os marcadores moleculares p53, p63 e EGFR foram considerados positivos, quando mais de 10% das células tumorais invasivas apresentaram marcação nuclear para o p53 e p63, (RIBEIRO-SILVA *et al*, 2003) e membranar para o EGFR (RAKHA *et al*, 2007).

#### **7.4. Classificação imunofenotípica**

Os carcinomas mamários foram classificados como tumores triplo-negativos quando apresentaram negatividade para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2 (RAKHA *et al*, 2006; CHEANG *et al*, 2008) e classificados em tumores de fenótipo basal se além do fenótipo triplo-negativo apresentassem positividade para as citoqueratinas avaliadas no estudo: CK5 e/ou CK14 (RAKHA *et al*, 2007; RAKHA *et al*, 2008).

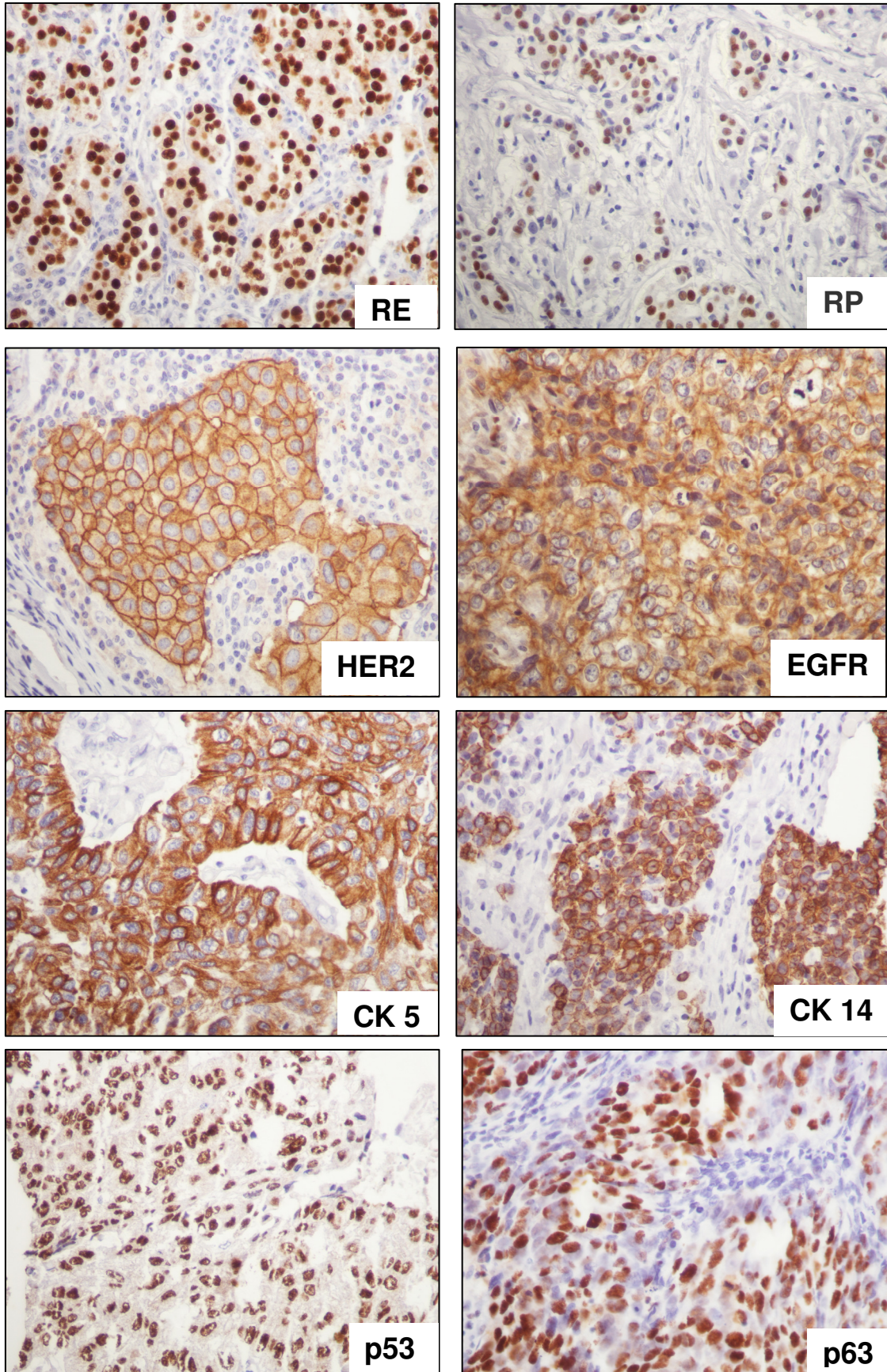


Figura 1. Positividade dos marcadores moleculares (RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona, HER2: receptor de fator de crescimento epidérmico 2, EGFR: receptor de fator de crescimento epidérmico 1; CK5: citoqueratina 5, CK14: citoqueratina 14; p53; p63)



## 8 – ANÁLISE ESTADÍSTICA

---

Foi utilizado o programa SPSS (versão 15.0) para as análises estatísticas. A associação das variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas foi verificada aplicando-se o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. As curvas de sobrevida foram estimadas usando o método de Kaplan – Meier. O teste de Log-rank foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias de sobrevida. Foi considerado o valor de 5% ( $p < 0,05$ ) como limite de significância estatística.

## **9 – RESULTADOS**

---

Os resultados obtidos serão apresentados sob a forma de dois artigos científicos submetidos a periódicos. Os artigos estão estruturados seguindo as normas do periódico aos quais foram submetidos e acompanhados das respectivas cartas de submissão.

Resultados adicionais, não incluídos nos artigos científicos devido ao número limitado de páginas, determinados pelas instruções dos respectivos periódicos estão a seguir. Considerações finais, conclusões gerais, lista de referências bibliográficas e anexos estão apresentados após os artigos científicos.

**Artigo I**

**Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens**

**Submetido para publicação na Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)**

Revista da Associação Médica Brasileira  
ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA  
Rua São Carlos do Pinhal, 324 CEP: 01333-903 - Caixa Postal: 8904 - São Paulo SP - Brasil  
Tel.: (11) 3178-6800 - Email: [ramb@amb.org.br](mailto:ramb@amb.org.br)

São Paulo, sexta-feira, 12 de dezembro de 2008

Ilmo(a) Sr.(a)  
Prof(a), Dr(a) Mara Costa Dutra

Referente ao código de fluxo: 918  
Classificação: Artigos Originais

Informamos que recebemos o manuscrito Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) Revista da Associação Médica Brasileira. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número de referência apresentado acima.

Obrigado por submeter seu trabalho a(o) Revista da Associação Médica Brasileira.  
Atenciosamente,

Bruno Caramelli  
Editor

««« Favor não responder esta mensagem pois ela foi gerada automaticamente pelo SGP »»»»

## Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens

### Immunophenotype and evolution of breast carcinomas in very young women

#### Autores (Authors)

**Mara Costa Dutra:** Pós-graduanda em Patologia Mamária – Mastologista do Hospital Master, Goiânia, GO, Mastologista do Instituto de Mastologia e Oncologia, Goiânia, GO; Mastologista do Sistema Regional de Prevenção, Goiânia, GO.

**Marina Alvarenga Rezende:** Acadêmica de Medicina da Faculdade Ciências Médicas, Belo Horizonte, MG – Acadêmica Medicina Faculdade Ciências Médicas, Belo Horizonte, MG; Aluna iniciação científica da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Victor Piana de Andrade:** Doutorado em Oncologia – Gerente Médico de Análises Clínicas do Grupo Fleury, Médico e Pesquisador do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, SP.

**Fernando Augusto Soares:** Pós-Doutorado – Professor Titular de Patologia Geral da FOU SP e Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, Fundação Antônio Prudente e Diretor de Pesquisa da mesma Instituição, SP.

**Élbio Cândido de Paula:** Especialista em Citopatologia e Patologia – Chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, Goiânia, GO, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

**Helenice Gobbi:** Pós-Doutorado em Patologia Mamária pela Vanderbilt University, EUA (1997-199) – Professora Adjunta do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

<p><b>Descritores (Palavras-chave)</b> Neoplasias da Mama; Prognóstico; Sobrevida; Mulheres; Grupos Etários</p>	<p><b>Keywords</b> Breast Neoplasms; Prognosis; Survival; Age Groups; Biological Markers</p>
<p><b>RESUMO</b> <b>Objetivo:</b> Avaliar as características clínico-patológicas e moleculares de carcinomas mamários de mulheres muito jovens. <b>Métodos:</b> Foram selecionados 106 casos de câncer de mama de mulheres com idade <math>\leq 35</math> anos e analisados dados clínicos (idade ao diagnóstico, estadiamento, ocorrência de metástases, tempo de sobrevida global e livre de doença), anátomo-patológicos (tamanho, tipo e graus histológicos do tumor primário, linfonodos axilares com metástases) e marcadores moleculares (receptores de estrogênio e progesterona, HER2, p53, p63, citoqueratinas 5 e 14 e EGFR) através da imuno-histoquímica empregando microarranjo de tecido. Foi analisada a relação entre as características clínico-patológicas, imuno-histoquímicas e sobrevidas global e livre de doença. <b>Resultados:</b> Idade das pacientes variou de 19 a 35 anos (média: 32,5). Seguimento clínico foi obtido em 106 casos (média = 53 meses, variando de 3 a 146 meses). Tamanho médio dos tumores foi de 4,9 cm (variação de 1 a 10 cm). A média de linfonodos dissecados foi 19,7 linfonodos/caso (variação de 1 a 31). Linfonodos positivos ao diagnóstico anátomo-patológico em 82 casos (77,4%). A avaliação imuno-histoquímica foi possível em 102 casos. Em</p>	<p><b>Background:</b> The objective of this study was to evaluate the clinical, pathological and molecular characteristics in very young women with breast cancer. <b>Methods:</b> Were selected 106 cases of breast cancer of very young women (<math>\leq 35</math> years). We evaluated clinical characteristics of patients (age at diagnosis, ethnic group, family history of breast cancer, staging, presence of distant metastases, overall and disease-free survival), pathological characteristics of tumors (tumors size, histological type and grade, axillary lymph nodes affected) and expression of molecular markers (receptor: estrogen and progesterone, HER2, p53, p63, citokeratins 5 and 14 and EGFR) were evaluated using immunohistochemistry and tissue microarray. Correlations between clinicopathological and immunohistochemical characteristics and disease-free survival and overall survival were analyzed. <b>Results:</b> The mean age of patients was 32.5 years (ranged 19-35 years). The follow-up ranged 3 to 146 months (average 53 months). The mean size of breast carcinomas was 4.9 cm (range 1-10 cm). The number of removed lymph nodes ranged from 1 to 31 (mean 19.7 lymph nodes/ cases). Lymph nodes were positive in 82 cases (77.4%). In 32 patients (29.6%), the breast carcinomas were of the triple-negative phenotype and in 16 of them (50%), the tumors expressed positivity</p>

<p>32 (29,6%) pacientes os carcinomas mamários eram triplo-negativos e 16 deles (50%) expressaram citoqueratinas 5 ou 14 (fenótipo basal). A maioria dos tumores eram carcinomas ductais invasores, de alto grau (53 casos, 49%), detectados em estadió avançado, sendo 52 casos (48,1%) casos no estágio III, com maior ocorrência de metástases sistêmicas (57 casos, 55,3%) e recidivas locorregionais (21 casos, 19,4%).</p> <p><b>Conclusões:</b> Nossos resultados mostram que carcinomas mamários de mulheres muito jovens têm características clínicas, patológicas e moleculares mais agressivas.</p>	<p>for cytokeratin 5 or 14 (basal phenotype). Most of the tumors were invasive ductal carcinomas, high grade (53 cases, 49%), detected in advanced stage (stage III in 52 cases, 48.1%), with a high rate of systemic metastases (57 cases, 55.3%) and locoregional recurrences (21 cases, 19.4%).</p> <p><b>Conclusions:</b> Very young women present breast carcinomas with more aggressive clinical behavior and tumors express biological markers associated with worse prognosis.</p>
--	--

Trabalho submetido em (Article's submission in): 4/12/2008 18:22:53

Instituição (Affiliation): Laboratório de Patologia Mamária, Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Avenida Alfredo Balena, 190, sala 305, Belo Horizonte, MG, Brasil CEP 30130-100.

Correspondência (Correspondence): Profa. Helenice Gobbi Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da UFMG Av. Alfredo Balena, 190, sala 305, Belo Horizonte, MG, Brasil CEP 30130 Telefone: (31) 34099118; fax: (31)34099664 E-mail: hgobbi@medicina.ufmg.br; helenicegobbi@gmail.com

Suporte Fincanceiro (Financial support): CNPq, CAPES, FAPEMIG

Submetido para (Submitted for): Revista da Associação Médica Brasileira

Artigo numerado no SGP sob código de fluxo (The Article was numbered in SGP for the flux code): 918

## INTRODUÇÃO

A maioria dos carcinomas mamários ocorrem em mulheres na pós-menopausa. Apenas 2 a 5% das pacientes com câncer de mama têm idade  $\leq 35$  anos ao diagnóstico<sup>1,2</sup>. O câncer de mama em pacientes jovens apresenta comportamento biológico mais agressivo, associado a pior prognóstico, quando comparados aos tumores de mulheres na pós-menopausa. Em geral são tumores maiores, de alto grau, com elevada taxa proliferativa, maior invasão vascular, maior índice de metástases axilares e, frequentemente, não expressam receptores hormonais<sup>3,4,5</sup>. Apesar do tratamento agressivo, as taxas de recorrência local e metástases à distância são elevadas<sup>6</sup>. Desde a conferência de Saint Gallen de 1998, os cânceres de mama de mulheres muito jovens foram considerados como um grupo de pior prognóstico, para o qual o uso de terapia sistêmica deve ser mais agressiva<sup>7</sup>.

Vários fatores prognósticos têm sido propostos para identificar pacientes cujos tumores poderiam ter um curso clínico mais agressivo. Atualmente, os fatores prognósticos já estabelecidos e que determinam a conduta no tratamento do câncer de mama são o tamanho tumoral, o status linfonodal, e grau do tumor, além da determinação imuno-histoquímica dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e HER2<sup>8,9,10,11</sup>. No entanto, o curso clínico

dos cânceres de mama é variável devido as características biológicas de cada tumor. Tumores com morfologia semelhante podem apresentar perfis moleculares diversos, não detectáveis pelo exame histopatológico<sup>12,13</sup>.

Recentemente, propôs-se uma classificação molecular dos carcinomas de mama, estratificando-os em subgrupos de acordo com os perfis de expressão gênica. Esta nova classificação permite prever a evolução de alguns subtipos de tumores de mama baseado em seu fenótipo molecular<sup>12,13</sup>. Estudos empregando imuno-histoquímica para avaliação de marcadores moleculares mostram boa correspondência com o perfil de expressão gênica dos carcinomas mamários avaliados através de microarranjo de DNA<sup>31,32</sup>.

Até o momento, os estudos sobre o perfil imunofenotípico de carcinomas mamários incluem poucas pacientes muito jovens ( $\leq 35$  anos). Além disto, há poucas séries de casos abordando marcadores moleculares em câncer de mama neste grupo etário<sup>1,4</sup>. O objetivo deste estudo foi avaliar o perfil imunofenotípico de carcinomas mamários de mulheres muito jovens ( $\leq 35$  anos), incluindo marcadores de fenótipo basal, correlacionando-o com as características clínicas, patológicas e sobrevidas global e livre de doença.

## **PACIENTES E MÉTODOS**

Foram revistos os arquivos do Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, do Hospital Araújo Jorge de Goiânia, GO, e do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo, SP e selecionados 106 casos de pacientes com carcinomas mamários com idade  $\leq 35$  anos ao diagnóstico com seguimento clínico nestes hospitais. Dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos e laudos anátomo-patológicos arquivados incluindo: idade, etnia (cor da pele), história familiar para câncer de mama, estadiamento clínico, características patológicas como tipo e grau histológico do tumor, tamanho tumoral, presença de metástases axilares e à distância, tratamentos realizados (quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) e evolução clínica. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Hospital Araújo Jorge em Goiânia, Goiás, e Hospital do Câncer AC Camargo, São Paulo, Brasil. O estudo foi explicado a todas as pacientes e obtido o consentimento informado.

### **Construção do micrarranjo de tecido (TMA) e estudo imunoistoquímico**

As lâminas originais foram revistas e os respectivos blocos contendo amostras de tumor foram selecionados. A partir destes, foram obtidos dois cilindros de 1mm cada com amostra

representativa do tumor e construído um bloco de TMA. Foi utilizado equipamento manual da marca Beecher Instruments, Silver Spring, MD®. O bloco TMA foi submetido a microtomia seriada, obtendo-se cortes histológicos com espessura de 4 µm que foram dispostos em lâminas eletricamente carregadas (Instrumedics Inc®), com o auxílio de adesivos (Microsystems Inc®).

Os cortes histológicos sequenciais do TMA foram corados para receptores de estrógeno e progesterona, receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), receptor de fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR ou HER1), p53 e p63, além de anticorpos dirigidos aos marcadores de diferenciação basal, citoqueratinas 5 e 14. Os clones, diluições, fabricantes e métodos de reativação antigênica estão mostrados na Tabela 1. O sistema de visualização da reação utilizado foi o sistema de amplificação de polímeros não biotinilados (*Novolink*®, Biosystems, Reino Unido).

### **Estudo Histopatológico**

Todas as lâminas originais e as secções do TMA coradas pela hematoxilina e eosina (HE) foram revisadas por dois examinadores e os tumores classificados segundo as recomendações de PAGE *et al* (1998)<sup>14</sup> e do Colégio Americano de Patologistas (2000)<sup>11</sup>. Os tumores foram graduados empregando-se o sistema de graduação de Nottingham proposto por Elston & Ellis<sup>15</sup>.

### **Avaliação das reações imuno-histoquímicas**

A análise da positividade das reações seguiu parâmetros de análise e níveis de corte adotados na literatura internacional. A análise do HER2 seguiu os critérios adotados pelo Consenso da American Society of Clinical Oncology e College of American Pathologists, onde são considerados a intensidade de coloração da membrana e a porcentagem de células coradas<sup>16</sup>. Para a avaliação dos receptores hormonais foi usado o sistema de escore proposto por Allred *et al.* que avalia a proporção de núcleos corados e a intensidade de coloração<sup>17</sup>. As citoqueratinas foram consideradas positivas se houvesse fraca ou forte marcação citoplasmática visualizada em 5% das células tumorais<sup>18,19,20</sup>. Os marcadores imunoistoquímicos p53, p63 e EGFR foram considerados positivos quando mais de 10% das células tumorais invasivas apresentaram marcação nuclear para o p53 e p63<sup>21</sup> e membranar para o EGFR<sup>22</sup>.



### **Classificação imunofenotípica**

Os carcinomas mamários foram classificados como tumores triplo-negativos quando apresentaram negatividade para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2<sup>23</sup> e classificados em tumores de fenótipo basal se além do fenótipo triplo-negativo apresentassem positividade para as citoqueratinas avaliadas no estudo: CK5 e/ou CK14<sup>24,25</sup>.

### **ANÁLISE ESTADÍSTICA**

Foi utilizado o programa SPSS (versão 15.0) para as análises estatísticas. A associação das variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas foi verificada aplicando-se o teste do qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. As curvas de sobrevida foram estimadas usando o método de Kaplan – Meier. O teste de Log-rank foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias de sobrevida.

### **RESULTADOS**

#### **Características clínicas**

A idade das pacientes variou de 19 a 35 anos (média: 32,5 ± 3,3 anos). Mulheres brancas (69,4%) e multíparas (50,9%) foram mais acometidas. História familiar para câncer de mama estava presente em 20,3% dos casos, recidivas locorregionais ocorreram em 21 casos (19,4%) e metástases sistêmicas em 57 casos (55,3%).

#### **Características patológicas dos tumores e tratamentos**

As características patológicas e tratamentos instituídos às pacientes estão apresentados na Tabela 2. Os tumores variaram de 1 a 10 cm de diâmetro (média: 4,9 cm). A maioria das pacientes (82 casos; 77,4%) apresentavam linfonodos com metástases ao estudo anátomo-patológico. Cinquenta e sete das 106 pacientes (55,3%) apresentaram metástases sistêmicas durante o seguimento clínico (7 casos apresentavam metástases sistêmicas ao diagnóstico) sendo que 61,3% (49/57 pacientes) das metástases ocorreram em pacientes com linfonodos positivos e 34,8% (8/57 pacientes) das metástases em pacientes com linfonodos negativos

#### **Características imuno-histoquímicas dos tumores**

Os resultados da análise imuno-histoquímicas foi possível em 102 casos e os resultados são mostrados na Tabela 3. Em 32 casos (29,6%), os carcinomas mamários mostraram fenótipo triplo negativo. Destes tumores 50% (16/32 casos) expressaram positividade para

citoqueratina 5 ou 14 e foram considerados de fenótipo basal. Houve co-expressão das citoqueratinas 5 e 14 em 8 casos. O EGFR foi positivo em sete casos (6,5%) sendo três deles tumores de fenótipo basal. A proteína p53 foi positiva em 40 casos (37%). A proteína p63 foi positiva em 8 casos (7,4%) sendo quatro deles de tumores de fenótipo basal.

### **Análises das sobrevidas global e livre de doença**

Seguimento clínico foi obtido das 106 pacientes, variando de 3 a 146 meses (média: 53 meses). Metástases sistêmicas ocorreram em 57 casos (55,3%). O sítio de metástase isolada mais freqüente foi óssea (15 casos, 14,2%). Houve associação de metástases ósseas e a outros órgãos em 25 casos (23,6%). O óbito ocorreu em 38% (41/106 casos). As sobrevidas global e livre de doença em 5 anos foram respectivamente 63% e 39%.

### **DISCUSSÃO**

Nosso estudo mostrou fatores de pior prognóstico associados aos carcinomas mamários em mulheres muito jovens. Analisando as variáveis clínico-patológicas, nossos resultados mostraram que as pacientes jovens apresentaram características clínicas agressivas: tumores grandes ao diagnóstico (média: 4,9cm), alta freqüência de linfonodos positivos (77,4%) alto grau histológico (49% dos casos), maior freqüência de tumores no estágio III (48,1%), baixa positividade para receptores hormonais (estrogênio: 49,1% e progesterona: 29,6%), alta expressão da proteína HER2 (28,7%), alta expressão da citoqueratina 5 (25%). Observamos ainda sobrevida global de 63% e sobrevida livre de doença em 5 anos de seguimento de 39%. Nossos resultados são semelhantes aos de outros autores que também demonstraram que carcinomas de mama nesta faixa etária têm características morfológicas relacionadas a pior prognóstico e comportamento clínico mais agressivo<sup>1,2,3,4</sup>.

As mulheres brancas foram predominantes em nossa casuística (69,4%) semelhantes a estudo de base populacional que relatou maior freqüência neste grupo étnico para câncer de mama em todas as faixas etárias<sup>26</sup>. Entretanto, apesar da população branca representar a maioria dos casos com diagnóstico de câncer de mama, a população afro-americana é descrita como o grupo de pior prognóstico. Estudos norte-americanos ressaltam a importância da etnia no comportamento prognóstico do câncer de mama revelando que tumores de pior prognóstico ocorrem em mulheres pré-menopausa afro-americanas<sup>26,27,28</sup>. Nossos dados foram levantados a partir de informações obtidas dos prontuários das pacientes. No Brasil, devido à miscigenação das raças e à heterogeneidade populacional, é difícil basear-se na cor da pele como critério para avaliar etnia.

O tipo histológico mais freqüente em nossa amostra foi o carcinoma ductal invasor, SOE (94,3%). Apesar de vários estudos mostrarem que os carcinomas mamários do tipo medular ou medular atípico ocorrem com maior freqüência em mulheres jovens<sup>25,29</sup>, em nossa casuística estes tipos tumorais representaram apenas 1,9% dos casos.

A maioria das mulheres incluídas no nosso estudo recebeu tratamento com quimioterapia (90,8%) e radioterapia (85,2%) e em menor proporção com tamoxifeno (31,5%) devido à menor positividade dos tumores para os receptores hormonais. Diferente das pacientes mais jovens, pacientes acima de 50 anos recebem menos tratamento sistêmico com quimioterapia e radioterapia, porém mais endocrinoterapia devido à maior positividade dos receptores hormonais<sup>30</sup>.

A classificação dos tumores mamários a partir de estudos de perfil de expressão gênica possibilitou a avaliação do fenótipo molecular dos carcinomas mamários<sup>12,13</sup>. Entretanto, a técnica é limitada devido ao alto custo e a imuno-histoquímica tem sido aplicada para avaliação do perfil molecular com boa correlação com o perfil de expressão gênica<sup>31</sup>.

Em nosso estudo empregamos os critérios propostos por Rakha *et al*<sup>22</sup>, que definiram a identificação dos carcinomas com diferenciação basal a partir da expressão de CK5/6 e/ou CK14. Observamos carcinomas mamários triplo-negativos em 29,6% e fenótipo basal em 50% (16/32 casos) destes tumores. Nossos resultados mostram que os tumores triplo-negativos são mais frequentes em pacientes muito jovens comparando com séries que avaliaram pacientes de todas as faixas etárias onde esta freqüência varia de 10 a 17%<sup>28</sup>. Nossa casuística mostrou freqüência semelhante à encontrada por Rakha *et al*, que identificaram fenótipo basal em 157/282 tumores triplo-negativos (55,7%) em séries de pacientes de todas as idades<sup>24</sup>.

Encontramos tumores de fenótipo basal positivos para EGFR em 18,8%, positivos para p53 em 43,8% e positivos para p63 em 25% dos casos. Nossos achados diferem dos valores descritos na literatura onde os tumores de fenótipo basal de pacientes de todas as faixas etárias têm alta expressão imuno-histoquímica de EGFR (60%), p53 (85%)<sup>25,29</sup> e p63 (55%)<sup>32</sup>.

Em relação à evolução clínica das pacientes, nossos resultados corroboram os dados da literatura mostrando que pacientes muito jovens (idade  $\leq$  35 anos), apresentam doença mais avançada no momento do diagnóstico e pior prognóstico quando comparadas à mulheres com idade superior, com curvas de sobrevida global e livre de doença em cinco anos, que não ultrapassam 70% e 65%, respectivamente<sup>1,3,5,6,33</sup>. Mulheres muito jovens apresentam tumores pouco diferenciados (de alto grau) que expressam marcadores moleculares de mau prognóstico.

## **CONCLUSÕES**

Mulheres muito jovens (idade  $\leq 35$  anos) apresentam carcinomas mamários detectados em estágio mais avançado com características clínicas, morfológicas e moleculares mais agressivas e evoluem com sobrevidas global e livre de doenças menores que pacientes mais velhas.

## REFERÊNCIAS

1. Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, *et al.* Women age  $\leq 35$  years with primary breast carcinoma. *Cancer*. 2005; 103: 2466-72.
2. Guerra I, Algorta J, Diaz de Otazu R, Pelayo A, Fariña J. Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women. *Molec Pathol*. 2003; 56: 323-377.
3. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years ) are different. *British Journal of Cancer*. 1996; 74:1796-1800.
4. Fernandopulle SM, Ang PCS, Tan PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. *Pathology*. 2006; 38(3):219-222.
5. Aebi S. Special issues related to the adjuvant therapy in very young women. *The Breast*. 2005; 14: 594-599.
6. Bonnie CY. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Disease*. 2005; 23:3-8.
7. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Senn HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90:1601– 8.
8. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991; 19(5): 403-10.
9. Reis-filho JS, Westbury C, Pierga J-Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J. Clin Pathol*. 2006; 59:225-231.
10. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Annals of Oncology*. 2005; 16(10):1569 -1583.
11. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124(7):966-78.
12. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000; 406 (6797):747-52.
13. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*. 2001; 98:10869-10874.
14. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1998; 51(3):195-208.

15. Elston CW, Ellis IO. Assessment of histologic grade. In: Elston CW & Ellis IO eds. *Systemic Pathology*, 1998; 3<sup>rd</sup> Ed. Vol. 13, 365-84, Churchill-Livinstone. Edinburgh, Scotland, UK.
16. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ *et al.* American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2007; 25:1-28.
17. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998; 11:155-168.
18. Jones C, Ford E, Gillett C, Ryder K, Merrett S, Reis-Filho JS, *et al.* Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin Cancer Research*. 2004; 10:5988-5997.
19. Potemski P, Kusinska R, Watala C, Pluciennik E, Bednarek AK, Kordek R. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology*. 2005; 69(6):478-485.
20. Collet K, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Wang H, Eide GE *et al.* A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005; 14:1108-1112.
21. Ribeiro-silva A, Zambelli Ramalho LN, Britto Garcia S, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127:336-340.
22. 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*. 2007;50: 434-438.
23. Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol*. 2007; 14:419-430.
24. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007;109:25-32.
25. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Impact of basal – like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology*. 2008; 75: 95-103.
26. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolin Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006; 295:2492-502.

27. Chlebowski RT, *et al.* Ethnicity and breast cancer: factors influencing differences in incidence and outcomes. *Journal of the National Cancer Institute.* 2005; 97(6): 439-48.
28. Bradley CJ, Given CW, Roberts C. Race, socioeconomic status, and breast cancer treatment and survival. *Journal of the National Cancer Institute.* 2002; 94(7): 490-496.
29. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 2008, 52, 108-118.
30. Diab SG, Elledge RM, Clark GM. Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute.* 2000; 92 (7): 550-556.
31. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS & Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology.* 2008; 52: 67-81.
32. Matos I, Rozany D, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005; 447: 688-694
33. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JFR, Blamey RW. Early-onset breast cancer – histopathological and prognostic considerations. *British Journal of Cancer.* 1997; 75(9):1318-1323.

**Tabelas enviadas para a Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)**

**Tabela 1 – Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imuno-histoquímicas**

<b>Anticorpo</b>	<b>Classe</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante/País</b>	<b>Recuperação antigênica</b>
RE	6F11	1:1000	Novocastra, RU	Panela elétrica a vapor/Citrato pH 6,0
RP	PgR312	1:1000	Novocastra, RU	Panela elétrica a vapor/Citrato pH 6,0
HER2	CB11	1:80	Novocastra, RU	Não realizada
CK 5	XM26	1:100	Neomarkers, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0
CK 14	LL002	1:400	Biogenex, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0
EGFR	31G7	1:200	Zymed, CA, EUA	Digestão enzimática (proteínaseK)
P63	4A4	1:2000	Dako, EUA	Banho maria / EDTA/TRIS pH9,0
p53	D0-7	1:2000	Dako, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0



TABELA 2. Características patológicas dos tumores e tratamentos das pacientes com carcinoma de mama e idade ≤ 35 anos

<b>Características</b>	<b>Nº de pacientes (%)</b>
<b>Total</b>	<b>106 (100)</b>
<b>Estadiamento clínico</b>	
I	4 (3,7)
IIA	21 (19,4)
IIB	22 (20,4)
IIIA	24 (22,2)
IIIB	20 (18,5)
IIIC	8 (7,4)
IV	7 (6,5)
<b>Média linfonodos dissecados</b>	<b>19,7 (1-31)</b>
<b>Linfonodos negativos</b>	<b>24 (22,6)</b>
<b>Linfonodos positivos</b>	
1-3	34 (32,1)
4-10	26 (24,5)
> 10	22 (20,8)
<b>Grau Histológico</b>	
1	5 (4,6)
2	48 (44,4)
3	53 (49)
<b>Tipo Histológico</b>	
Carcinoma ductal invasor (SOE)	100 (94,3)
Carcinoma lobular invasor	3 (2,8)
Carcinoma medular	2 (1,9)
Carcinoma micropapilar	1 (0,9)
<b>Quimioterapia</b>	
Adjuvante	72(66,7)
Neoadjuvante	26(24,1)
Ausente	8 (8,3)
<b>Radioterapia</b>	
Adjuvante	88(81,5)
Neoadjuvante	4 (3,7)
Ausente	14(14,8)
<b>Tamoxifeno</b>	
Com tratamento	34(31,5)
Sem tratamento	63(58,3)
Sem informação	9 (10,2)

Legenda: SOE = sem outra especificação

TABELA 3. Marcadores imunohistoquímicos em 102 carcinomas de mama de mulheres muito jovens (idade  $\leq 35$  anos)

<b>Marcador Molecular</b>	<b>Casos interpretados (%)</b>	<b>Positivo (%)</b>	<b>Negativo (%)</b>	<b>Perdas (%)</b>
<b>RE</b>	<b>102</b>	<b>53 (49,1)</b>	<b>51 (47,2)</b>	<b>2 (3,7)</b>
<b>RP</b>	<b>102</b>	<b>32 (29,6)</b>	<b>72 (66,7)</b>	<b>2 (3,7)</b>
<b>HER2</b>	<b>102</b>	<b>31 (28,7)</b>	<b>73 (67,6)</b>	<b>2 (3,7)</b>
<b>p53</b>	<b>94</b>	<b>40 (37)</b>	<b>60 (55,6)</b>	<b>6 (7,4)</b>
<b>p63</b>	<b>102</b>	<b>8 (7,4)</b>	<b>96 (88,9)</b>	<b>2 (3,7)</b>
<b>CK5</b>	<b>102</b>	<b>27 (25)</b>	<b>77 (71,3)</b>	<b>2 (3,7)</b>
<b>CK14</b>	<b>102</b>	<b>9 (8,3)</b>	<b>95 (88)</b>	<b>2 (3,7)</b>
<b>EGFR</b>	<b>102</b>	<b>7 (6,5)</b>	<b>97 (89,8)</b>	<b>2 (3,7)</b>

Legenda: RE: receptor de estrógeno, RP: receptor de progesterona, CK: citoqueratina, HER2:receptor de fator de crescimento epidérmico 2, EGFR: receptor de fator de crescimento epidérmico 1

## **Artigo II**

**Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens (idade  $\leq$  35anos): estudo comparativo com mulheres pós-menopausa (idade entre 50 - 65 anos)**

**Submetido para publicação na Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (RBGO)**

## CARTA DE APRESENTAÇÃO

Instituição: Laboratório de Patologia Mamária, Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG. Avenida Alfredo Balena, 190, sala 305, Belo Horizonte, MG, Brasil CEP 30130-100

Correspondência: Profa. Helenice Gobbi

Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal, Faculdade de Medicina da UFMG  
Av. Alfredo Balena, 190, sala 305

Belo Horizonte, MG, Brasil

CEP 30130-100

Telefone: (31)34099118 ; fax: (31)34099664

Email: hgobbi@medicina.ufmg.br ; [helenicegobbi@gmail.com](mailto:helenicegobbi@gmail.com)

Suporte Financeiro: CNPq, CAPES, FAPEMIG

### Carta ao editor:

Belo Horizonte, 5 de janeiro de 2009.

Prezado Sr. Editor da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (RBGO),

Submetemos o manuscrito intitulado: "**Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens (idade  $\leq$  35 anos): estudo comparativo com mulheres pós-menopausa (idade entre 50 - 65 anos)**", em anexo, para ser avaliado pelo Conselho Editorial da Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia com vistas à publicação neste periódico.

Declaramos que nos responsabilizamos pelo conteúdo do trabalho e que não possuímos conflitos de interesse (profissionais, financeiros e benefícios diretos ou indiretos), que possam ter influenciado os resultados da pesquisa ou o conteúdo do trabalho.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais, em 29 de novembro de 2006 (parecer no 457/06).

Estamos à disposição para qualquer dúvida ou outros esclarecimentos necessários.

Atenciosamente,

Mara Costa Dutra

Marina Alvarenga Rezende

Victor Piana de Andrade

Élbio Cândido de Paula

Fernando Augusto Soares

Helenice Gobbi

**Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens (idade ≤ 35 anos): estudo comparativo com mulheres pós-menopausa (idade entre 50 - 65 anos)**

**Immunophenotype and evolution of breast carcinomas in very young women (≤ 35 years): comparative study with postmenopausal women (50 – 65 years)**

**Autores (Authors)**

**Mara Costa Dutra:** Mestranda em Patologia Mamária – Mastologista do Hospital Master, Goiânia, GO; Mastologista do Instituto de Mastologia e Oncologia, Goiânia, GO; Mastologista do Sistema Regional de Prevenção, Goiânia, GO.

**Marina Alvarenga Rezende:** Acadêmica Medicina Faculdade Ciências Médicas, Belo Horizonte, MG –Aluna iniciação científica da Universidade Federal de Minas Gerais.

**Victor Piana de Andrade:** Doutorado em Oncologia – Gerente Médico de Análises Clínicas do Grupo Fleury, Médico e Pesquisador do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital AC Camargo, SP.

**Fernando Augusto Soares:** Pós-Doutorado – Professor Titular de Patologia Geral da FOUSP e Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, Fundação Antônio Prudente e Diretor de Pesquisa da mesma Instituição, SP.

**Élbio Cândido de Paula:** Especialista em Citopatologia e Patologia – Chefe do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, Professor Adjunto da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO .

**Helenice Gobbi:** Pós-Doutorado em Patologia Mamária pela Vanderbilt University, EUA (1997-199) – Professor Adjunta do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

<p><b>Descritores (Palavras-chave)</b> Neoplasias da Mama, Mulheres, Prognóstico, Grupos Etários, Sobrevida</p>	<p><b>Keywords</b> Breast Neoplasms, Women, Prognosis, Age Groups, Survival</p>
<p><b>RESUMO</b> <b>Resumo: Objetivo:</b> Avaliar características clínicas, patológicas e moleculares de carcinomas mamários em mulheres muito jovens comparando tumores de mulheres pós-menopausa. <b>Métodos:</b> Foram selecionados 106 casos de câncer de mama de mulheres jovens e 130 casos de mulheres pós-menopausa. Foram analisados dados clínicos (idade ao diagnóstico, estadiamento, ocorrência de metástases, tempo de sobrevida global e livre de doença), anátomo-patológicos (tamanho do tumor, tipo e graus histológicos do tumor primário, <i>status</i> linfonodos axilares) e marcadores moleculares (receptores de estrogênio e progesterona, HER2, p53, p63, citoqueratinas 5 e 14 e EGFR) através da imuno-histoquímica empregando microarranjo de tecido. Foi analisada a relação entre as características clínico-patológicas, imuno-histoquímicas e sobrevidas global e livre de doença. <b>Resultados:</b> O estudo comparativo dos dois grupos mostrou que as pacientes muito jovens apresentaram maior frequência de nuliparidade (<math>p = 0,03</math>), maior diâmetro dos tumores (<math>p = &lt; 0,000</math>),</p>	<p><b>ABSTRACT</b> <b>Abstract: Purpose:</b> The objective of this study was to evaluate the clinical, pathological and molecular characteristics in very young women and postmenopausal women with breast cancer. <b>Methods:</b> We selected 106 cases of breast cancer of very young women (≤ 35 years) and 130 cases of postmenopausal women. We evaluated clinical characteristics of patients (age at diagnosis, ethnic group, family history of breast cancer, staging, presence of distant metastases, overall and disease-free survival), pathological characteristics of tumors (tumors size, histological type and grade, axillary lymph nodes status) and expression of molecular markers (hormone receptors, HER2, p53, p63, cytokeratins 5 and 14 and EGFR) using immunohistochemistry and tissue microarray. Correlations between clinicopathological and immunohistochemical characteristics and disease-free survival and overall survival were analyzed. <b>Results:</b> When comparing clinicopathologic variables between the age groups, younger women demonstrated greater frequency nulliparity (<math>p = 0.03</math>), larger tumors (<math>p = &lt; 0.000</math>), higher stage disease (<math>p = 0.01</math>), lymph node positivity (<math>p = 0.001</math>) and higher grade tumors (<math>p =</math></p>

<p>estadiamento clínico mais avançado (<math>p = 0,01</math>), maior número de linfonodos positivos (<math>p = 0,001</math>) e tumores pouco diferenciados (<math>p = 0,004</math>). A maioria das pacientes jovens recebeu tratamento com quimioterapia (90,8%) e radioterapia (85,2%) e em menor proporção com tamoxifeno (31,5%) comparado às mulheres na pós-menopausa. O receptor de estrógeno apresentou baixa positividade 49,1% (<math>p = 0,01</math>) e a proteína HER2 alta positividade 28,7% (<math>p = 0,03</math>) nas mulheres jovens. O fenótipo triplo-negativo foi observado em 29,6% no grupo jovem e em 20% nas mulheres pós-menopausadas (<math>p = 0,034</math>). Os tumores de fenótipo basal foram mais frequentes nas mulheres jovens (50%). As metástases sistêmicas ocorreram em 55,3% casos nas jovens e 39,2% nas pós-menopausa. A sobrevida global e livre de doença em 5 anos foram, respectivamente, 63% e 39% para as mulheres jovens e 75% e 67% para o grupo de mulheres pós-menopausadas. <b>Conclusões:</b> Carcinomas mamários de mulheres muito jovens têm características clínicas, patológicas e moleculares mais agressivas quando comparadas às mulheres acima de 50 anos.</p>	<p>0,004). Most of young patients received chemotherapy (90.8%) and radiotherapy (85.2%) and less tamoxifen therapy (31.5%) comparing with postmenopausal women. Lower estrogen receptor positivity 49,1% (<math>p = 0.01</math>) and higher HER2 overexpression 28,7% (<math>p = 0.03</math>) were observed in young women. In 32 young patients (29.6%) and in 26 postmenopausal women (20%), the breast carcinomas were of the triple-negative phenotype (<math>p = 0,034</math>). In 16 young women (50%) and in 10 postmenopausal women (7,7%), the tumors expressed positivity for cytokeratin 5 and/or 14, basal phenotype (<math>p = 0,064</math>). Systemic metastases were detected in 55,3% in young women and in 39,2% in postmenopausal women. Breast cancer overall survival and disease-free survival in 5 years were, respectively, 63% and 39% for young women and 75% e 67% for postmenopausal women. <b>Conclusions:</b> Breast cancer arising in very young women showed negatives clinicobiological characteristics and more aggressive tumors.</p>
--	--

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama ocorre com frequência nove vezes maior em mulheres menopausadas (> 50 anos) que em mulheres muito jovens. Aproximadamente 80% dos carcinomas mamários ocorrem em mulheres acima de 50 anos<sup>1</sup>. Somente 2 a 5% dos casos incidem em mulheres muito jovens (idade  $\leq 35$  anos)<sup>2,3</sup>. Os estudos são divergentes quando descrevem a idade como fator prognóstico independente de sobrevida para o câncer de mama, associando-o a pior prognóstico<sup>4,5,6</sup>, ou sem impacto no prognóstico<sup>7</sup>. Entretanto, carcinomas mamários invasores ocorrendo em pacientes jovens (definidos com idade  $\leq 35$  anos até 40 anos) geralmente, apresentam características clínicas e patológicas associadas com doença mais agressiva<sup>6</sup>, com maior risco de recidiva locorregional e morte que tumores de mulheres pós-menopausa (> 50 anos)<sup>8</sup>. Em mulheres jovens os tumores são mais frequentemente, de alto grau, com alta fração de proliferação, maior invasão vascular, mais linfonodos comprometidos e maior número de recorrências e, frequentemente, não expressam receptores hormonais<sup>3,9,10</sup>. Apresentam taxas de recorrência local e metástases a distância elevadas<sup>11</sup>.

O câncer de mama é doença heterogênea. Tumores com morfologias semelhantes podem apresentar perfis moleculares diversos, não detectáveis pelo exame histopatológico.

Classificação molecular recente dos carcinomas de mama estratificou os tumores em subgrupos de acordo com os perfis de expressão gênica permitindo predizer a evolução de alguns subtipos de tumores de mama baseado em seu fenótipo molecular<sup>12,13</sup>. Estudos imunoistoquímicos demonstraram boa correlação com os perfis definidos através de expressão gênica<sup>14,15,16</sup>.

O objetivo deste estudo foi avaliar o imunofenótipo dos carcinomas mamários de mulheres muito jovens ( $\leq 35$  anos) analisando suas características clínico-patológicas, sobrevidas global e livre de doença e compará-los a mulheres pós-menopausa (50-65 anos).

### **Material e Método**

Foram selecionados 106 casos de carcinomas mamários de pacientes com idade  $\leq 35$  anos e 130 casos de pacientes com idade entre 50 - 65 anos a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG, do Hospital Araújo Jorge de Goiânia, GO, e do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo, SP. Todas as pacientes foram tratadas e tinham seguimento clínico nestes hospitais. Dados clínicos e patológicos foram obtidos dos prontuários médicos e laudos anátomo-patológicos arquivados incluindo: idade, etnia (cor da pele), história familiar para câncer de mama, estadiamento clínico, características patológicas como tipo e grau histológico do tumor, tamanho tumoral, presença de metástases axilares e à distância, tratamentos realizados (quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) e evolução clínica. Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Hospital Araújo Jorge em Goiânia, Goiás, e Hospital do

Câncer AC Camargo, São Paulo, Brasil. O estudo foi explicado a todas as pacientes e obtido o consentimento informado.

### **Estudo Histopatológico**

Todas as lâminas originais e as secções do TMA coradas pela hematoxilina e eosina (HE) foram revisadas por dois examinadores (MCD e HG) e os tumores classificados segundo as recomendações de PAGE *et al* (1998)<sup>17</sup> e do Colégio Americano de Patologistas (2000)<sup>18</sup>. Os tumores foram graduados empregando-se o sistema de graduação de Nottingham proposto por ELSTON & ELLIS<sup>19</sup>.

### **Construção do micrarranjo de tecido (TMA)**

A partir da revisão das lâminas originais os blocos contendo amostras de tumor foram selecionados. A partir destes, foram obtidos dois cilindros de 1mm de diâmetro de cada caso com amostra representativa do tumor e construído um bloco de TMA utilizando equipamento manual da marca Beecher Instruments, Silver Spring, MD®. O bloco TMA foi submetido a microtomia seriada, obtendo-se cortes histológicos com espessura de 4 µm que foram dispostos em lâminas eletricamente carregadas (Instrumedics Inc®), com o auxílio de adesivos (Microsystems Inc®).

### **Avaliação das reações imuno-histoquímicas**

Os cortes histológicos sequenciais do TMA foram corados para HE, receptores de estrógeno e progesterona, receptor de fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), receptor de fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR ou HER1), p53 e p63, além de anticorpos dirigidos aos marcadores de diferenciação basal, citoqueratinas 5 e 14. Os clones, diluições, fabricantes e métodos de reativação antigênica estão mostrados na Tabela 1. O sistema de visualização da



reação utilizado foi o sistema de amplificação de polímeros não biotinizados (*Novolink*®, Biosystems, Reino Unido).

A análise da positividade das reações seguiu parâmetros de análise e níveis de corte adotados na literatura internacional. Para a avaliação dos receptores hormonais foi usado o sistema de escore proposto por ALLRED *et al*<sup>20</sup> que avalia a proporção de núcleos corados e a intensidade de coloração. A análise do HER2 seguiu os critérios adotados pelo Consenso da American Society of Clinical Oncology e College of American Pathologists, onde são considerados a intensidade de coloração da membrana e a porcentagem de células coradas<sup>21</sup>. As citoqueratinas foram consideradas positivas se houvesse fraca ou forte marcação citoplasmática visualizada em 5% das células tumorais<sup>22,23,24</sup>. Os marcadores imunohistoquímicos p53, p63 e EGFR foram considerados positivos quando mais de 10% das células tumorais invasivas apresentaram marcação nuclear para o p53 e p63<sup>25</sup> e membranar para o EGFR<sup>15</sup>.

### **Classificação Imunofenotípica**

Os carcinomas mamários foram classificados como tumores triplo-negativos quando apresentaram negatividade para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2<sup>16</sup> e classificados em tumores de fenótipo basal se além do fenótipo triplo-negativo apresentassem positividade para as citoqueratinas avaliadas no estudo: CK5 e/ou CK14 segundo os critérios de RAKHA *et al*<sup>26,27</sup>.

### **Análise Estatística**

Foi utilizado o programa SPSS (versão 15.0) para as análises estatísticas. A associação das variáveis clínico-patológicas e imuno-histoquímicas foi verificada aplicando-se o teste do qui-

quadrado ou o teste exato de Fisher. As curvas de sobrevida foram estimadas usando o método de Kaplan – Meier. O teste de Log-rank foi utilizado para avaliar as diferenças entre as médias de sobrevida. Foi considerado o valor de 5% ( $p < 0,05$ ) como limite de significância estatística.

## **Resultados**

### **Características clínicas**

A idade variou de 19 a 35 anos (média:  $32,5 \pm 3,3$  anos) no grupo jovem e de 50 a 65 anos (média:  $56,8 \pm 5,1$  anos). Mulheres brancas e multíparas foram mais acometidas em ambos os grupos. História familiar para câncer de mama esteve presente em 20,3% das jovens e 20,8% das idosas. Recidivas locorregionais ocorreram em 21 casos (19,4%) nas pacientes jovens e em 17 casos (13,1%) nas pacientes idosas ( $p = > 0,05$ ). Metástases sistêmicas em 57 casos (55,3%) no grupo jovem e em 51 casos (39,2%) no grupo pós-menopausa ( $p = 0,96$ ).

### **Características patológicas dos tumores e tratamentos**

As características patológicas e tratamentos instituídos às pacientes (quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) estão sumarizados na Tabela 2. Os tumores variaram de 1 a 10 cm de diâmetro (média: 4,9 cm) nas jovens e de 1 a 8 cm (média: 2,3cm) nas idosas ( $p < 0,000$ ). As pacientes jovens apresentaram linfonodos com metástases ao estudo anátomo-patológico em 82 casos (77,4%) enquanto nas pacientes pós-menopausadas a frequência foi de 76 casos (66,2%). A maioria das mulheres jovens, 55,3% (57/106 pacientes) apresentou metástases sistêmicas durante o seguimento clínico, sendo 61,3% (49/57 pacientes) com linfonodos positivos e 34,8% (8/57 pacientes) com linfonodos negativos. Nas mulheres acima de 50 anos as metástases sistêmicas ocorreram em 39,2% (51/130 pacientes) sendo 47,4% (36/51 pacientes) com linfonodos positivos e 27,8% (15/51 pacientes) com linfonodos

negativos. A diferença em relação às metástases sistêmicas não foi estatisticamente significativa ( $p = 0,081$ , IC 95% 0,17 – 2,89).

### **Características imuno-histoquímicas dos tumores**

Os resultados das análises imuno-histoquímicas foram obtidas em 102 casos no grupo jovem e em 124 nas mulheres pós-menopausa e estão sumarizadas na Tabela 4. Os carcinomas mamários mostraram fenótipo triplo-negativo em 32 casos (29,6%) do grupo jovem e em 26 casos (20%) do grupo das mulheres entre 50 e 65 anos ( $p = 0,034$ ). Destes tumores, 50% (16/32 casos) nas jovens e 38,4% (10/26 casos) nas idosas expressaram positividade para citoqueratinas 5 ou 14, correspondendo aos tumores de fenótipo basal ( $p = 0,064$ ). Houve co-expressão das citoqueratinas 5 e 14 em oito casos de mulheres jovens e nove casos de pacientes pós-menopausa. EGFR foi positivo em 18,8% dos tumores de fenótipo basal no grupo jovem e em 50% dos tumores de mulheres pós-menopausa. A proteína p53 foi positiva em 43,8% dos tumores de fenótipo basal nas jovens e em 7,5% dos casos pós-menopausa. A proteína p63 foi positiva em 25% dos tumores de fenótipo basal nas jovens e em 10% dos casos nas mulheres pós- menopausa.

### **Seguimento e sobrevidas global e livre de doença**

A média de seguimento foi 53 meses (variação de 3 a 146 meses) para o grupo jovem e de 68 meses (variação de 2 a 169 meses) para o grupo das mulheres na pós-menopausa. As metástases sistêmicas ocorreram em 55,3% casos em jovens e em 39,2% casos no grupo das idosas ( $p = 0,096$ ). Metástases isoladas mais freqüentes ocorreram em ossos no grupo jovem (14,2% dos casos) e nos pulmões entre mulheres pós-menopausa (10% dos casos). Óbito ocorreu em 38% dos casos (41/106) em jovens e em 33% (43/130) em idosas.

A sobrevida global e livre de doença em 5 anos foram, respectivamente, 63% e 39% para as mulheres jovens e 75% e 67% para o grupo de mulheres pós-menopausadas (Figura 2). No grupo com fenótipo triplo-negativo as sobrevidas global e livre de doença em 5 anos foram de 52% e 31% para as jovens e 71% e 59% para as pacientes pós-menopausa (Figura 3).

A sobrevida global das pacientes com tumores de fenótipo basal foi de 57% e sobrevida livre de doença de 47% para as jovens. As pacientes pós-menopausa mostraram ambas as curvas de sobrevida global e livre de doença de 60% (Figura 4).

### **Discussão**

Nosso estudo mostrou que os carcinomas mamários que ocorrem em mulheres muito jovens apresentam características clínicas, patológicas e imuno-histoquímicas desfavoráveis quando comparadas com mulheres com idade entre 50 e 65 anos. Resultados com significado estatístico foram observados em relação ao diâmetro tumoral, estadiamento clínico avançado, maior positividade dos linfonodos axilares, tumores pouco diferenciados, além da baixa positividade para o receptor de estrogênio e alta positividade da proteína HER2. Nossos dados são semelhantes aos da literatura que também mostram que os tumores de mulheres jovens apresentam frequência elevada para grau histológico III variando de 49% a 76%<sup>5,8,11</sup>, linfonodos positivos variando de 38% a 68,6%<sup>5,11,28</sup>, HER2 positivo 29,6% a 52%<sup>2,11,28</sup> e baixa positividade para receptor de estrógeno 52% a 71%<sup>2,5,11,28</sup>.

O tipo histológico mais frequente em nossa amostra foi o carcinoma ductal invasor para ambos os grupos. Apesar de estudos da literatura mostrarem que os carcinomas mamários do tipo medular ou medular atípico têm frequência elevada em mulheres jovens<sup>8,25,27</sup>, em nossa casuística foi observado em apenas 1,9% dos casos de jovens e 0,8% de pacientes pós-menopausa sem diferença significativa estatisticamente.

Os tratamentos instituídos às nossas pacientes foram semelhantes aos empregados na literatura e refletem a expressão dos marcadores moleculares preditivos de resposta terapêutica avaliados nos tumores. Em nosso estudo verificamos que tumores de pacientes jovens mostraram baixa positividade para os receptores de estrogênio e alta positividade para proteína HER2. Nossos resultados são semelhantes aos da literatura que evidenciam relação inversa significativa entre estes dois marcadores moleculares<sup>2,11,28</sup>. Estudo mostrou taxas de 53,1% das pacientes acima de 50 anos recebendo quimioterapia, enquanto 76,5% das pacientes muito jovens receberam o mesmo tratamento<sup>5</sup>.

A frequência dos tumores HER2 positivos observada em nossa casuística no grupo jovem (28,7%) foi maior que no grupo pós-menopausa (16,9%). No entanto, esta frequência foi semelhante a estudo descrito para a população em geral com câncer de mama<sup>11</sup>. É possível que este marcador, isoladamente, possa não desempenhar papel substancial nas diferenças evolutivas entre pacientes muito jovens e os tumores que ocorrem na maioria das mulheres. Não observamos diferenças na imunexpressão dos marcadores RP, p53, p63, EGFR e CK 5 e 14 entre os dois grupos analisados. Valores descritos na literatura são variáveis para estes marcadores e nem todos foram direcionados especificamente, para mulheres jovens<sup>10,14</sup>. Nossos resultados mostraram diferença estatística significativa nos tumores triplo-negativos (29,6%) em mulheres muito jovens quando comparados a mulheres pós-menopausa (20%). Na literatura a frequência de tumores triplo-negativos em mulheres de todas as idades é de 16,3%<sup>26</sup>. Não encontramos estudos que comparassem a frequência destes tumores em faixas específicas como os de nosso estudo.

Observamos frequência de tumores de fenótipo basal dentre os tumores triplo-negativos em 50% nas mulheres muito jovens e 38,4% em mulheres entre 50 e 65 anos, sem diferença significativamente estatística. Os tumores de fenótipo basal, representam 7% a 19% dos

carcinomas mamários invasores<sup>4,13</sup>, e 56% dentre os tumores triplo-negativos de todas as faixas etárias<sup>26</sup>.

Em relação à evolução clínica das pacientes, nossos resultados corroboram os dados da literatura mostrando que pacientes muito jovens (idade  $\leq 35$  anos), apresentam doença mais avançada no momento do diagnóstico e pior prognóstico quando comparadas à mulheres com idade superior, com curvas de sobrevida global e livre de doença em cinco anos, que não ultrapassam 70% e 65%, respectivamente<sup>1,3,5,6</sup>.

Apesar das pacientes jovens em nossa casuística terem recebido tratamentos mais agressivos (quimioterapias adjuvante ou neoadjuvante e radioterapia) as mesmas apresentaram pior sobrevida.

As sobrevidas global e livre de doença observada em nossa casuística foram de 63% e 39% para as mulheres jovens e 75% e 67% para o grupo de mulheres pós-menopausa, respectivamente. As curvas de sobrevidas global e livre de doença foram piores para o grupo das mulheres muito jovens tanto para os tumores em geral quanto entre os tumores triplo-negativos e de fenótipo basal.

Nossos resultados estão de acordo com a literatura e confirmam o pior prognóstico do câncer de mama em mulheres jovens mesmo quando abordado com tratamento mais agressivo, tanto local quanto sistemicamente<sup>28</sup>.

## **Conclusão**

Concluimos, através de análise comparativa, que os carcinomas mamários invasores de mulheres muito jovens apresentam comportamento clínico, patológico e perfil imunofenotípico de maior agressividade biológica, cursando com pior prognóstico e menores sobrevidas global e livre de doença, a despeito de receberem tratamentos mais agressivos.

## Referências

1. Yau C, Fedele V, Roydasgupta R, Fridlyand J, Hubbard A, Gray JW *et al.* Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone- dependent breast cancers *Breast Cancer Research*. 2007; 9(5):R59.
2. Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, *et al.* Women age  $\leq 35$  years with primary breast carcinoma. *Cancer*. 2005; 103: 2466-72.
3. Walker RA, Lees E, Webb MB, Dearing SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years ) are different. *British Journal of Cancer*. 1996; 74:1796-1800.
4. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNSA*. 2003; 100: 8418-8423.
5. El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, Geara BF, Shamseddine AI. Effect of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer*. 2006; 6:194.
6. Elkum N, Dermime S, Ajarim D, Al-Zahrani A, Alsayed A, Tulbah A, *et al.* Being 40 or younger is an independent risk factor for relapse in operable breast cancer patients: The Saudi Arabia experience. *BMC Cancer*. 2007; 7:222.
7. Kollias J, Elston CW, Ellis IO, Robertson JFR, Blamey RW. Early-onset breast cancer – histopathological and prognostic considerations. *British Journal of Cancer*. 1997; 75(9):1318-1323.
8. Peppercoorn J, Partridge AH. Breast cancer in young women: a new color or a different shade of pink. *Journal of Clinical Oncology*. 2008; 26(20):3303-3305.
9. Aebi S. Special issues related to the adjuvant therapy in very young women. *The Breast*. 2005; 14: 594-599.
10. Fernandopulle SM, Ang PCS, Tan PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. *Pathology*. 2006; 38(3):219-222.
11. Bonnie CY. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Disease*. 2005; 23:3-8.
12. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000; 406 (6797):747-52.

13. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA.* 2001; 98:10869-10874.
14. Nielsen To, Hsu Fd, Jensen K, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, *et al.* Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* 2004;10(16):5367-74.
15. 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.* 2007;50: 434-438.
16. Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol.* 2007; 14:419-430.
17. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1998; 51(3):195-208.
18. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124(7):966-78.
19. 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(5): 403-10.
20. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998; 11:155-168.
21. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ *et al.* American Society of Clinical Oncology/ College of American Pathologists guideline recommendation for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology.* 2007; 25:1-28.
22. Jones C, Ford E, Gillett C, Ryder K, Merrett S, Reis-Filho JS, *et al.* Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin Cancer Research.* 2004; 10:5988-5997.



23. Potemski P, Kusinska R, Watala C, Pluciennik E, Bednarek AK, Kordek R. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology*. 2005; 69(6):478-485.
24. Collet K, Stefansson IM, Eide J, Braaten A, Wang H, Eide GE *et al*. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiology Biomarkers & Prevention*. 2005; 14:1108-1112.
25. Ribeiro-silva A, Zambelli Ramalho LN, Britto Garcia S, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2003; 127:336-340.
26. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007;109:25-32.
27. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Impact of basal – like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology*. 2008; 75: 95-103.
28. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, *et al*. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 2008; 26: 3324-3330.

**TABELA 1 - Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imuno-histoquímicas**

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante/País</b>	<b>Recuperação antigênica</b>
RE	6F11	1: 1.000	Novocastra, RU	Panela elétrica a vapor/Citrato pH 6,0
RP	PGr312	1: 1.000	Novocastra, RU	Panela elétrica a vapor /Citrato pH6,0
HER2	CB11	1: 80	Novocastra, RU	Não realizada
CK 5	XM26	1: 100	Neomarkers, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0
CK 14	LL002	1: 400	Biogenex, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0
EGFR	31G7	1: 200	Zymed, CA, EUA	Digestão enzimática (proteinaseK)
p63	4A4	1: 2.000	DAKO, EUA	Banho-maria/ EDTA/TRIS pH9,0
p53	D0-7	1: 2.000	DAKO, EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0

TABELA 2

Características patológicas dos tumores e tratamentos das pacientes jovens ( $\leq 35$  anos) e pós-menopausa ( $\geq 50$  e 65 anos) com carcinomas mamários

Característica	Jovens	Pós-menopausa	P	IC
<b>Média do tamanho tumoral</b>	4.9 cm (1-10cm)	2,3cm (1-8cm)	<0,000	
<b>Estadiamento clínico</b>				
I	4 (3,7%)	12 (9,2%)		1
IIA	21 (19,4%)	35 (26,9%)	0.52	0,55 (0,15 - 1,94)
IIB	22 (20,4%)	35 (26,9%)	0.31	0,53 (0,15 - 1,85)
IIIA	24 (22,2%)	12 (9,2%)	0.01	0,16 (0,04 - 0,62)
IIIB	20 (18,5%)	17 (13,1%)	0.05	0,28 (0,07 - 1,04)
IIIC	8 (7,4%)	11 (8,5%)	0.28	0,45 (0,10 - 1,95)
IV	7 (6,5%)	8 (6,2%)	0.20	0,38 (0,08 - 1,74)
<b>Média linfonodos dissecados</b>	19,7 (1-31)	22,14 (2-44)	0.06	
<b>Linfonodos negativos</b>	24 (22,6%)	54 (41,5%)	0.001	
<b>Linfonodos positivos</b>				
1 – 3	34 (32,1%)	37 (28,5%)		1
4 – 10	26 (24,5%)	17 (13,1%)	0.19	0,60 (0,28 - 1,30)
>10	22 (20,8%)	22 (24,6%)	0.82	0,91 (0,43 - 1,95)
<b>Grau Histológico</b>				
1	5 (4,6%)	17 (13,1%)		1
2	48 (44,4%)	76 (58,5%)	0.19	0,49 (0,17 - 1,43)
3	53 (49%)	37 (28,5%)	0.004	0,22 (0,07 - 0,66)
<b>Tipo Histológico</b>				
CDI (SOE)	100 (94,3%)	124 (95,4%)		1
CLI	3 (2,8%)	3 (2,3%)	0.55	0,79 (0,10 - 6,09)
Carcinoma medular	2 (1,9%)	1 (0,8%)	0.42	0,39 (0,00 - 7,80)
Carcinoma micropapilar	1 (0,9%)	2 (1,5%)	0.58	1,59 (0,08 - 95,14)
<b>Quimioterapia</b>				
Adjuvante	72 (66,7%)	77 (59,2%)		1

Continuação Tabela 2

Neoadjuvante	26 (24,1%)	16 (12,3%)	0.11	0,57 (0,28 - 1,16)
Ausente	8 (9,2%)	37 (28,5%)	0.001	3,46 (1,60 - 7,46)
<b>Radioterapia</b>				
Adjuvante	88 (81,5%)	101 (77,7%)		1
Neoadjuvante	4 (3,7%)	4 (3,1%)	0.56	0,87 (0,15 - 4,82)
Ausente	14 (14,8%)	25 (19,2%)	0.37	1,36 (0,68 - 2,71)
<b>Tamoxifeno</b>				
Com tratamento	34 (31,5%)	64 (49,2%)		1
Sem tratamento	63 (58,3%)	61 (46,9%)	0.01	0,51 (0,29 - 0,88)
Total	106 (100%)	130 (100%)		

Legenda: CDI = carcinoma ductal invasor; CLI = carcinoma lobular invasor; SOE = sem outra especificação

**TABELA 3. Características imuno-histoquímicas de carcinomas de mama de pacientes jovens ( $\leq 35$  anos) e pós-menopausa (entre 50 e 65 anos)**

Marcador	Jovens			Pós-menopausa			p	IC (95%)
	Positivo (%)	Negativo (%)	Casos analisados	Positivo (%)	Negativo (%)	Casos Analisados		
RE	53(49,1)	51 (47,2)	102	83(63,8)	40 (30,8)	123	0.01	0,50 (0,29 - 0,85)
RP	32(29,6)	72 (66,7)	102	41(31,5)	81(62,3)	122	0.64	0,87 (0,50 - 1,53)
HER2	31(28,7)	73 (67,6)	102	22(16,9)	101(77,7)	123	0.03	1,94 (1,04 - 3,63)
p53	40 (37)	60 (55,6)	94	53(40,8)	68(52,3)	121	0.56	0,85 (0,49 - 1,46)
p63	8 (7,4)	96 (88,9)	102	6(4,6)	115(88,5)	121	0.39	1,59 (0,53 - 4,76)
CK5	27 (25)	77 (71,3)	102	21(16,2)	101(77,7)	122	0.11	1,68 (0,88 - 3,20)
CK14	9 (8,3)	95 (88)	102	9(6,9)	112(86,2)	121	0.73	1,17 (0,44 - 3,08)
EGFR	7 (6,5)	97 (89,8)	102	10(7,7)	114(87,7)	124	0.70	0,82 (0,30 - 2,24)

Legenda: RE = receptor de estrogênio, RP = receptor de progesterona, CK = citoqueratina, HER2 = receptor de fator de crescimento epidérmico 2, EGFR = receptor de fator de crescimento epidérmico 1

## 10 – RESULTADOS ADICIONAIS

### 10.1 – Características clínicas

A média de seguimento foi 53 meses (variação de 3 a 146 meses) para o grupo jovem e de 68 meses (variação de 2 a 169 meses) para o grupo das mulheres na pós-menopausa. As metástases sistêmicas ocorreram em 55,3% casos nas jovens e 39,2% nas idosas ( $p = 0,96$ ). O local de metástase isolada mais freqüente foi o osso no grupo jovem 14,2% e o pulmão para as mulheres pós-menopausa 10%. O óbito ocorreu em 38% dos casos (41/106) nas jovens e em 33% (43/130) nas idosas.

**TABELA 2. Características clínicas de pacientes muito jovens ( $\leq 35$  anos) e pós-menopausa (entre 50 e 65 anos) com carcinomas de mama**

Características	Jovens	Pós-menopausa	P	IC 95%
Média de idade	32 anos (19 - 35)	56,8 anos (50 - 65)		
<b>Raça</b>				
Branças	75 (69.4%)	94 (72,3%)		1
Pardas	16 (14.8%)	19 (14,6%)	0.88	0,94 (0,45 - 1,96)
Negras	7 (6.5%)	11 (8,5%)	0.65	1,25 (0,46 - 3,39)
Outros	8 (9.3%)	6 (4,6%)	0.16	0,47 (0,16 - 1,37)
<b>Paridade</b>				
Múltiparas	55 (50.9%)	100 (76,9%)		1
Nulíparas	22 (20.4%)	19 (14,6%)	0.03	0,47 (0,23 - 0,95)
1 Filho	21 (19.4%)	3 (2,3%)	<0,001	0,07 (0,02 - 0,27)
<b>História familiar para câncer de mama</b>				
Negativa	78 (72.2%)	97 (74,6%)		1
Parentes de 1º grau	9 (8.3%)	17 (13,1%)	0.34	1,51 (0,64 - 3,60)

Continuação Tabela 2

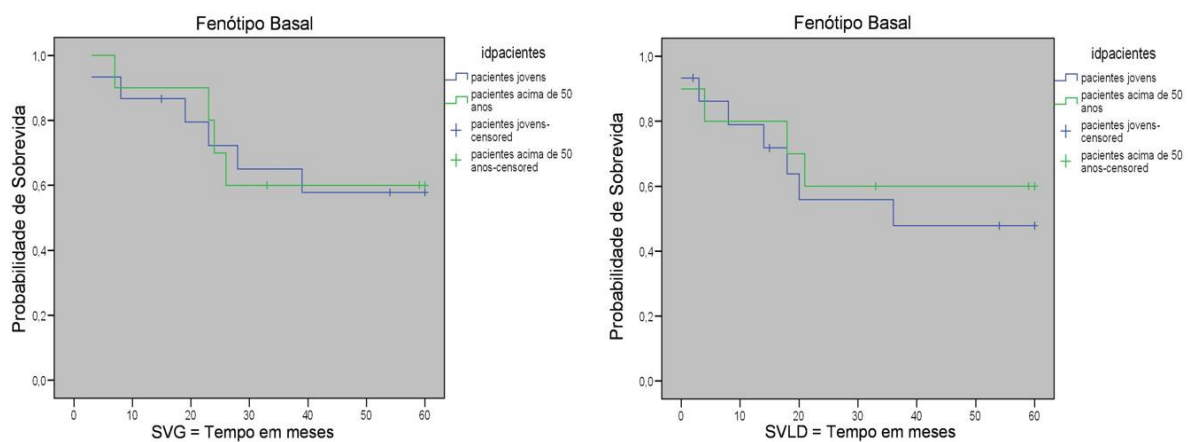
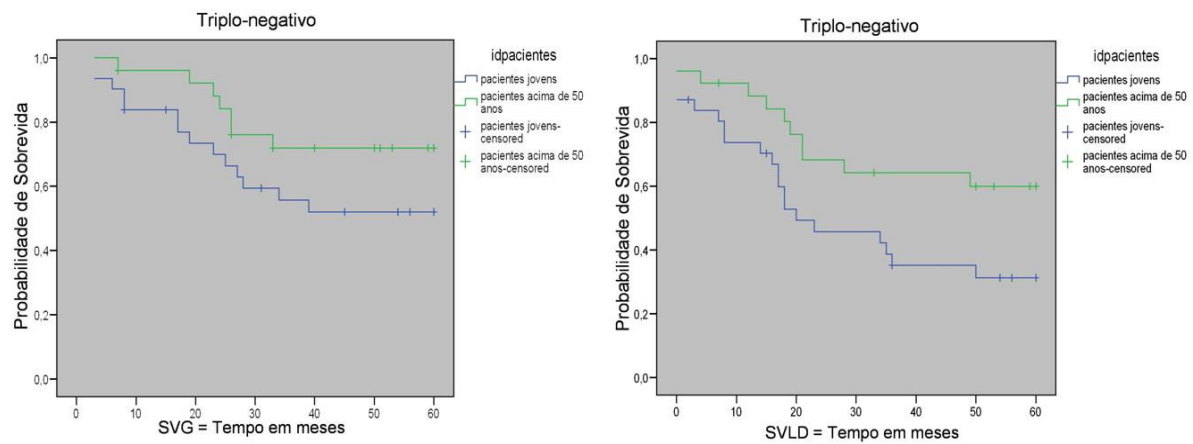
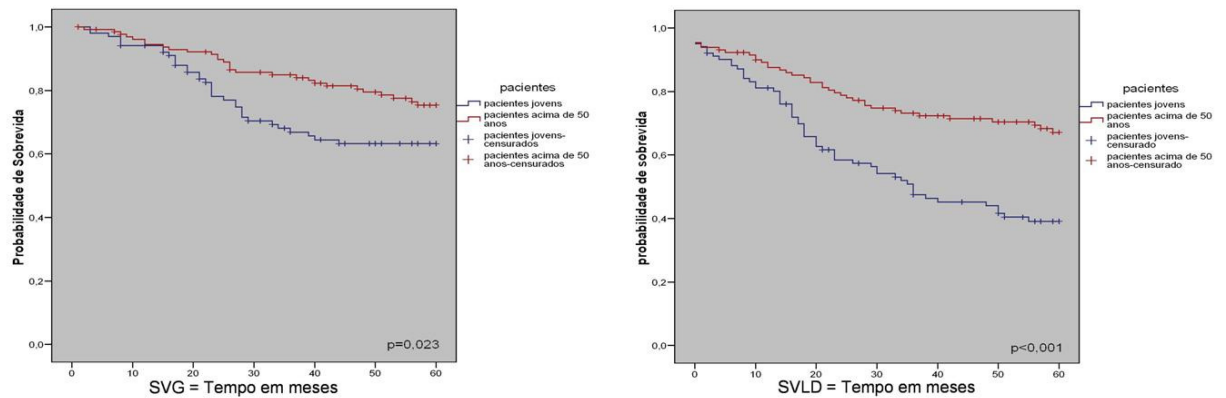
Parentes de 2º grau	13 (12%)	10 (7,7%)	0.28	0,61 (0,25 - 1,48)
Recidivas locorregionais	21 (19,4%)	17 (13,1%)		1
Metástases sistêmicas	57 (55,3%)	51 (39,2%)	0.96	1,01 (0,48 - 2,12)
Total	106 (100%)	130 (100%)		

### 10.2 – Seguimento e sobrevidas global e livre de doença

A sobrevida global e livre de doença em 5 anos foram, respectivamente, 63% e 39% para as mulheres jovens e 75% e 67% para o grupo de mulheres pós-menopausadas (FIGURA 2).

No grupo com fenótipo triplo-negativo as sobrevidas global e livre de doença em 5 anos foram de 52% e 31% para as jovens e 71% e 59% para as idosas (FIGURA 3).

A sobrevida global dos tumores de fenótipo basal foi de 57% e sobrevida livre de doença de 47% para as jovens enquanto, as pacientes idosas mostraram curvas de sobrevida global e livre de doença de 60% ambas (FIGURA 4).



## 11 – CONSIDERAÇÕES FINAIS

---

Nosso estudo comparou características clínicas das pacientes e patológicas de carcinomas mamários definidos por idade das pacientes: muito jovens (pacientes com idade  $\leq 35$  anos) e de pacientes com idade entre 50 e 65 anos, onde a prevalência da doença é maior.

Nossos resultados confirmam os dados de trabalhos descritos na literatura que mostram os carcinomas mamários em mulheres muito jovens apresentando piores características patológicas e imunofenóticas: tumores maiores, pouco diferenciados, detectados em estadiamento clínico avançado, com maior número de linfonodos axilares positivos, baixa positividade para receptor de estrogênio e superexpressão da proteína HER2.

A frequência dos tumores triplo-negativos foi maior no grupo das pacientes muito jovens quando comparadas às mulheres pós-menopausa com diferença significativa estatisticamente. Entretanto, para os carcinomas de fenótipo basal esta diferença não foi significativa estatisticamente. Entretanto, sabemos que estes grupos tumorais têm características específicas em relação ao comportamento clínico, evolução e opção terapêutica.

As curvas de sobrevida global e livre de doença foram piores para o grupo das pacientes muito jovens tanto quando analisamos os dois grupos em geral, quanto quando comparamos os tumores triplo-negativos e de fenótipo basal. Estudos têm comparado as curvas de sobrevida em carcinomas mamários de acordo com a idade mostrando que pacientes jovens apresentam menores sobrevida global e livre de doença quando comparados às mulheres na pós-menopausa. Entretanto, não encontramos estudos analisando somente os tumores triplo-negativos e de fenótipo basal nestas faixas etárias.

Apesar das diferentes estratégias terapêuticas empregadas para pacientes de alto e baixo riscos incluídas no mesmo estudo, observamos pior prognóstico no grupo das pacientes muito jovens.

Nossos dados de uma casuística adequada de pacientes muito jovens mostram maior frequência de tumores triplo-negativos e de fenótipo basal neste grupo etário. Apesar dos tratamentos mais agressivos as pacientes apresentaram pior prognóstico. Nossos dados



confirmam a necessidade da descoberta de tratamentos mais específicos para pacientes com tumores não responsivos à hormonioterapia e esquemas quimioterápicos habituais.

## 12 – CONCLUSÕES

---

Os resultados de nosso trabalho nos permite concluir que:

1. Pacientes muito jovens exibem carcinomas mamários com características clínicas e patológicas associadas a pior prognóstico quando comparadas com pacientes pós-menopausa com valores significativos estatisticamente: tumores maiores, estágio clínico mais avançado, mais linfonodos axilares acometidos por metástases, maior frequência de tumores de alto grau histológico.
2. Tumores de mulheres jovens foram mais, frequentemente, negativos para receptor de estrógeno ( $p = 0,01$ ) e positivos para HER2 ( $p = 0,03$ ). Não observamos diferenças estatisticamente significativa na imunexpressão do receptor de progesterona, p53, p63, EGFR e CK 5 e 14 entre os tumores dos dois grupos analisados.
3. A frequência dos tumores triplo-negativos e de fenótipo basal foi maior no grupo das pacientes jovens havendo diferença estatisticamente significativa somente entre os tumores triplo-negativos ( $p = 0,034$ ).
4. Houve relação entre a positividade para receptores hormonais e indicação de hormonioterapia que foi significativamente mais empregada nas pacientes pós-menopausa ( $p = 0,01$ ). As pacientes mais jovens foram tratadas com maior frequência com quimioterapia adjuvante ou neoadjuvante que as pacientes pós-menopausa ( $p = 0,001$ ).
5. As curvas de sobrevida global e livre de doença foram piores nas mulheres mais jovens, com maior frequência de recidivas locorregionais e metástases sistêmicas nesta faixa etária.

### 13 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

ABD EL-REHIM DM, BALL G, PINDER SE, RAKHA E, PAISH C, ROBERTSON JF, *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. In *J. Cancer*. V.116, n.3, p.340-50. Sep, 2005.

ABD EL-REHIM DM, PINDER SE, PAISH CE, BELL J, BLAMEY RW, ROBERTSON JF, *et al.* Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J. Pathol*, v. 203, n.2, p.661-71, Jun. 2004.

ABREU E, KOIFMAN S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Revista Brasileira de Cancerologia*. v. 48(1), p.113-31, 2002.

AEBI S. Special issues related to the adjuvant therapy in very young women. *The Breast*. 2005; 14: 594-599.

ALLRED DC, HARVEY JM, BERARDO M, CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. v.11, p. 155-168, 1998.

ANDERS CK, HSU DS, BROADWATER G, ACHARYA CR, FOEKENS JA, ZHANG Y *et al.* Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression *J. Clin Oncol*. v. 26, n. 20, p. 3324-3330, July, 2008.

ANDRADE VP, CUNHA IW, SILVA EM, AYALA F, SATO Y, FERREIRA SS, *et al.* O arranjo em matriz de amostras teciduais (tissue microarray): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. *J. Bras.Patol. Méd. Lab*. v.43, n.1.Rio de Janeiro, Fev, 2007.

BHARGAVA R, DABBS DJ. Use of Immunohistochemistry in diagnosis of breast epithelial lesions. *Adv Anat Pathol*. v.14, p. 93–107, 2007.

BLOOM HJG, RICHARDSON WW. Histological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br.J. Cancer*, v. 11, p. 359-77, 1957.

BONETT A, DORSCH M, RODER D, ESTERMAN A. Infiltrating ductal carcinoma of the breast in South Australia. Implications of trends in tumour diameter, nodal status and case survival rates for cancer control. *Med J Aust*. v.152, p.19-23, 1990.

BONNIE CY. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Disease*, v.23, n.1, p. 3-8, 2005.

CAMP RL, CHARETTE LA., RIMM D.L. *et al.* Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*, v.80, n.12, p. 1943-9, Dec. 2000.

CAREY LA, PEROU CM, LIVASY CA, DRESSLER LG, COWAN D, CONWAY K, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer. *JAMA*. v.295, p.2492-2502, 2006.

CHEANG MC, VODUC D, BAJDK C, LEUNG S, MCKINNEY S, CHIA SK, PEROU CM, NIELSEN TO. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* v.14, n.5, p. 1368-76, Mar. 2008.

CIANFROCCA M, GOLDSTEIN LJ. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer, in *The Oncologist Breast Cancer*, 2004

CIOCCA DR, GAGO FE, FANELLI MA, CALDERWOOD SK. Co-expression of steroid receptor (estrogen receptor alpha and/or progesterone receptors and HER-2neu: clinical implications. *Journal of Steroid biochemistry & Molecular Biology.* v. 102, p.32-40, 2006.

COLLEONI M, ROTMENSZ M, MAISONNEUVE P, SONSO GNI A, PRUNERI G, CASADIO C *et al.* Prognostic role of the extent of peritumoral vascular invasion in operable breast cancer. *Ann Oncol.* v.18, p.1632-40, 2007.

COLLET K, STEFANSSON IM, EIDE J, BRAATEN A, WANG H, EIDE GE, *et al.* A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* v. 14, n.5, p.1108-12, May, 2005.

DAIRKEE SH, LJUNG BM, SMITH H, HACKETT A. Immunolocalization of human basal epithelium specific keratin in benign and malignant breast disease. *Breast Cancer Res Treat.* v. 10, p. 11-20, 1987.

DE MARZO AM, FEDOR H. Molecular analysis of tissues using gene expression arrays and tissue microarrays. Short Course #47. United States and Canadian Academy of Pathology, 93<sup>rd</sup> Annual Meeting, 2004.

EARLY BREAST CANCER TRIALIST' COLLABORATIVE GROUP. Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomized trials. *Lancet.* v. 351, p.1451-67, 1998.

EL-SAGHIR NS, SEOUD M, KHALIL MK, CHARAFEDDINE M, SALEM ZK, GEARA BF, SHAMSEDDINE AI. Effect of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer.* v.6, p.194, Jul, 2006.

ELKUM N, DERMIME S, AJARIM D, AL-ZAHRANI A, ALSAYED A, TULBAH A, *et al.* Being 40 or younger is an independent risk factor for relapse in operable breast cancer patients: The Saudi Arabia experience. *BMC Cancer.* v.7, p. 222, 2007.

ELMORE JG, ARMSTRONG K, LEHMAN CD, FLETCHER SW. Screening for breast cancer. *Jama.* v.293, n.10, p.1245-1256, 2005.

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.* v.19, n.5 p. 403-410, 1991.

EPSTEIN AH, CONNOLLY JL, GELMAN R, *et al.* The predictors of distant relapse following conservative surgery and radiotherapy for early breast cancer are similar to those following mastectomy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* v. 17, p. 755-60, 1989.

FEJERMAN L, ZIV E. Population differences in breast cancer severity. *Pharmacogenomics.* v. 9, n. 3, p. 323-333, 2008.

FERNANDOPULLE SM, ANG PC-H, TAN PH. Breast carcinoma in women 35 years and younger: a pathological study. *Pathology*. v. 38, n.3, p. 219–222, June, 2006.

FISCHER B, BAUER M, WICKERHAM DL *et al.* Relation of the number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*. v. 52, p.1551-1557, 1983

FISCHER B. Biological and clinical considerations regarding the use of surgery and chemotherapy in the treatment of primary breast cancer. *Cancer*. v.40, p.574-587, 1977.

FITZGIBBONS PL, PAGE DL, WEAVER D, THOR AD, ALLRED DC, CLARK GM, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000; 124(7):966-78.

FOXCROFT LM, EVANS EB, PORTER AJ. The diagnosis of breast cancer in women younger than 40. *Breast*. v. 13, n.4, p. 297-306, August, 2004.

FU J, JEFFREY S. Transcriptomic signatures in breast cancer. *The Royal Society of Chemistry*, 2007

GADJOS C, TARTTER PI, BLEIWEISS I J. Lymphatic invasion, tumor size, and age are independent predictors of axillary lymph node metastases in women with T1 breast cancer. *Ann. Surg*, v.230, n.5, p.692-696, 1999.

GOBBI H, ROCHA RM, NUNES CB. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. *J Bras Patol Med Lab*. v. 44, n. 2, p. 131-140, 2008.

GOLDHIRSCH A, GLICK JH, GELBER RD, SENN HJ. Meeting highlights: International Consensus Panel on the Treatment of Primary Breast Cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1998; 90:1601– 8.

GOLDHIRSCH A, GLICK JH, GELBER RD, COATES AS, THÜRLIMANN B, SENN HJ *et al.* Meeting highlights: International expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Annals of Oncology*. v. 16, p. 1569 -1583, 2005.

GONZALEZ-ANGULO AM, BROGLIO K, KAU SW, ERALP Y, ERLICHMAN J, VALERO V, *et al.* Women age  $\leq$  35 years with primary breast carcinoma. *Cancer*. v.103, p. 2466-72, 2005.

GRALOW J, OZOLS RF, BAJORIN DF, CHESON BD, SANDLER HM, WINER EP, *et al.* Clinical cancer advances 2007: major research advances in cancer treatment, prevention, and screening. A report from the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. v.26, n.2, p.313-325, 2008.

GUERRA I, ALGORTA J, DIAZ DE OTAZU R, PELAYO A, FARINA J. Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women. *Molec Pathol*. v. 56, p. 323-377, 2003.

HANNA W, MOBBS B., Comparative evaluation of ER-ICA and enzyme immunoassay for the quantitation of estrogen receptors in breast cancer. *Am J Clin Pathol*. v.91, p.182, 1989.

HICKS DG & KULKARNI S. Trastuzumab as adjuvant therapy for early breast cancer. Arch Pathol Lab Med. v.132, p.1008-1015, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2008.

ITO Y. Does lapatinib, a small-molecule tyrosine kinase inhibitor, constitute a breakthrough in the treatment of breast cancer? Breast Cancer.v. 14, n. 2, p. 156- 162, 2007.

JONES C, FORD E, GILLETT C, RYDER K, MERRETT S, REIS-FILHO JS, *et al.* Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. Clin Cancer Research. 2004; 10:5988-5997.

KOLLIAS J, ELSTON CW, ELLIS IO, ROBERTSON JFR, BLAMEY RW. Early-onset breast cancer – histopathological and prognostic consideration. British Journal of Cancer. v.75(9), p.1318-1323, 1997).

KIM MJ, RO JY, AHN SH, KIM HH, KIM SB, GONG G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer a comparison with hormone receptor and Her-2/neu-overexpression phenotypes. Human Pathol. v.37, n.9, p.1217-26, Sep. 2006.

KONONEN J, BUBENDORF L, KALLIONIEMI A, BARLUND M, SCHRAML P, LEIGHTON S. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling tumor of specimens. Nature Med. v. 4, n.7, p.844-7, 1998.

KORSCHING JEFFREY SS, MEINERZ W, DECKER T, BOECKER W, BUERGER H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. J Clin Pathol. v. 61, p.553-560, 2008.

KROMAN N, JENSEN M-B, WOHLFAHRT J, MOURIDSEN HT, ANDERSEN PK, MELBYE M. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. BMJ. v. 320, p. 474-9, 2000.

LEONG C, BOYAGES J, JAYASINGHE UW *et al.* Effects of margins on ipsilateral breast tumor recurrence after breast conservation therapy for lymph node-negative breast carcinoma. Cancer. v. 100, p.1823-32, 2004.

MALZAHN K, MITZE M, THOENES M, MOLL R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. Virchows Arch. v.433, n.2, p.119-29, Aug. 1998.

MANN GB, FAHEY VD, FELEPPA F, BUCHANAN MR. Reliance on Hormone Receptor Assays of Surgical Specimens May Compromise Outcome in Patients With Breast Cancer. J Clin. Oncol.v. 23, n.22, Aug. 2005.

MARCHIÒ C. & REIS-FILHO J. Molecular diagnosis in breast câncer. Diagnostic Histopathology. v.14 (5), p. 202-213, 2008.

MARINHO VFZ, ZAGURY MS, CALDEIRA LG, GOBBI H. Micrometástases de

carcinoma da mama em linfonodos axilares: detecção por imuno-histoquímica *versus* hematoxilina e eosina. *J Bras Patol Med Lab.* v. 40(2), p. 127-132, abril, 2004.

MARINHO VFZ, METZE K, SANCHES FSF, ROCHA GFS, GOBBI H. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. *Rev Assoc Med Bras.* v.54, n.3, p. 203-7, 2008.

MATOS I, DUFLOTH R, ALVARENGA M, ZEFERINO LC, SCHMITT F. p63, cytokeratin 5, and p-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchow Arch.* v. 447, n.4, p.668-94. Oct. 2005.

MÉNARD S, VALAGUSSA P, PILOTTI S, GIANNI L, BIGANZOLI E, BORACCHI P *et al.* Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluoracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol.* v. 19, n.2, p. 329-35, 2001.

NANCY UL, ERIC PW. New targets for therapy in breast cancer: small molecule tyrosine kinase inhibitors. *Breast Cancer Research*, v. 6(5), p.204-210, 2004.

NIELSEN TO, HSU FD, JENSEN K, HU Z, HERNANDEZ-BOUSSARD T, LIVASY C, *et al.* Immunohistochemical and Clinical Characterization of the Basal-Like Subtype of Invasive Breast Carcinoma. *Clinical Cancer Research.* v.10, n.16, p.5367-74. Aug. 2004.

PAGE DL, JENSEN RA, SIMPSON JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* v. 51(3), p. 195-208, 1998.

PAIK, S BRYANT J, TAN-CHIU E, YOTHERS G, PARK C, WICKERHAM DL, WOLMARK N. HER2 and choice of adjuvant chemotherapy for invasive breast cancer: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol B-15. *J. Natl. Cancer Inst.* v. 92, n. 24, p. 1991-8, 2000.

PAREDES J, LOPES N, MILANEZI F, SCHMITT FC. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas insitu. *Virchows Arch.* v.450, n.1, p.73-80, 2007.

PATEY D & SCARFF R. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. *Lancet.* v.1, p. 801-804, 1928.

PEROU CM, SORLIE T, EISEN MB, VAN DE RIJN M, JEFFREY SS, REES CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumors. *Nature.* 2000; 406 (6797):747-52

POTEMSKI P, KUSINSKA R, WATALA C, PLUCIENNIK E, BEDNAREK AK, KORDEK R. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology*, v. 69(6), p.478-485, 2005.

PRITCHARD KI, SHEPHERD LE, O'MALLEY FP, ANDRULIS IL, TU D, BRAMWELL VH, *et al.* HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* v. 354, n. 20, p.2103-11, May 18, 2006.

RAKHA EA, PUTT ITC, ABD EL-REHIM DM, PAISH C, GREEN AR, POWE DG, *et al*

Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J. Pathol.* v. 2008, n.4, p.495-506. Mar. 2006

RAKHA EA, EL-SAYED ME, GREEN AR, LEE AHS, ROBERTSON JF, ELLIS IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* v. 109, p.25-32, 2007.

RAKHA EA, REIS-FILHO JS, ELLIS IO. Impacto of basal – like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology.* v. 75, p.95-103, 2008.

RAKHA EA, EL-SAYED ME, LEE AH, ELSTON CW, GRAINGE MD, HODI Z *et al.* Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J Clin Oncol.* v.26, n. 19, p. 3153-8, 2008.

REIS-FILHO JS, WESTBURY C, PIERGA J-Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J. Clin Pathol.* v. 59, p.225-231, 2006.

REIS-FILHO JS, TUTT, ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* v.52, n.1, p.108-18. Jan. 2008.

RIBEIRO-SILVA A, ZAMBELLI RAMALHO LN, BRITTO Garcia S, ZUCOLOTO S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med.* v. 127, p.336-340, 2003.

ROCHA RM, NUNES CB, ROCHA GFS, OLIVEIRA FN, SANCHES FSF, GOBBI H. A comparison between the novel rabbit monoclonal antibodies (SP1 and B644) and mouse antibodies for evaluating estrone receptor in breast tumors. *J. Bras patol med Lab.* v. 43, n. 6, p.435-40. Dez. 2007.

ROCHA RM, NUNES C, ROCHA G, OLIVEIRA F, SANCHES F, GOBBI H. Rabbit monoclonal antibodies show higher sensitivity than mouse monoclonals for estrogen and progesterone receptor evaluation in breast cancer by immunohistochemistry. *Pathology – Research and Practice.* v. 204, p. 655-662, Jun. 2008.

ROSEN PP, S GROSHEN, DW KINNE AND L NORTON. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol.* v. 11, p. 2090-2100, 1993.

ROSEN PP, GROSHEN S, SAIGO PE, KINNE DW, HELLMAN S. Pathological prognostic factors in stage I (T1N0M0) and stage II (T1N1M0) breast carcinoma: a study of 644 patients with median follow-up of 18 years. *J Clin Oncol.* v. 10, p.1239-1251, 1989.

ROUKOS DH, BRIASOULIS E. Individualized preventive and therapeutic management of hereditary breast ovarian cancer syndrome. *Nature Clinical Practice Oncology.* v. 4, n. 10, p. 578-590, 2007.

ROUZIER R, PEROU CM, SYMMANS WF. *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* v. 11, p. 5678–85, 2005. management options focusing on aromatase inhibitors. *Annals of Oncology.* v. 19, p. 16-27, 2008.



RUGO HS. The breast cancer continuum in hormone-receptor-positive breast cancer in postmenopausal women: evolving management options focusing on aromatase inhibitors. *Annals of Oncology*. v. 19, p. 16-27, 2008.

RYDÉN L, LANDBERG G, STÅL O, NORDENSKJÖLD B, FERNÖ M, BENDAHL PO. HER2 status in hormone receptor positive premenopausal primary breast cancer adds prognostic, but not tamoxifen treatment predictive, information. *Breast Cancer Res Treat*. v. 109, p. 351-357, 2008.

SANTINI D CECCARELLI C, TAFFURELLI M, PILERI S, MARRANO D. Differentiation pathways in primary invasive breast carcinoma as suggested by intermediate filament and biopathological marker expression. *J Pathol*. v. 179, p. 386-391, 1996.

SAUTER G, MIRLACHER M. Tissue microarrays for predictive molecular pathology. *J Clin Pathol*, v.55, n.8, p.575-6, Aug. 2002.

SCHWARTSMANN G. Breast cancer in South American: challenges to improve early detection and medical management of a public health problem. *Journal of Clinical Oncology*. v.19, n. 18S (september 15 supplement), p.118-124, 2001.

SLAMON DJ, CLARK GM, WONG SG, *et al*. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/NEU oncogene. *Science*. v. 235, p.177, 1987.

SOONTRAPORNCHAI P, CHANVITAN A, KOONTONGKAEW S, SUNPAWERAVONG S. The prognostic value of p53 immunostaining in node-negative breast carcinoma. *J Med Assoc Thai*. V. 90(9), p.1833-8, 2007.

SORLIE T, PEROU CM, TIBSHIRANI R, AAS T, GEISLER S, JOHNSEN H *et al*. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl. Acad. Sci, USA*. 2001; 98:10869-10874.

SORLIE T, TIBSHIRANI R, PARKER J, HASTIE T, MARRON JS, NOBEL A, *et al*. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNSA*. 2003; 100: 8418-8423.

SHOUSA S. Reporting breast biopsies. *Cur. Diag. Pathol*. v. 6, p. 140-45, 2000.

SUTHERLAND CM, MATHER FJ. Long-term survival and prognostic factors in patients with regional breast cancer (skin, muscle, and/or chest wall attachment). *Cancer*.v. 55, p.1389-97, 1985.

TANNER M, GANCBERG D, DI LEO A, LARSIMONT D, ROUAS G, PICCART M J, *et al*. Chromogenic in situ hybridization: a practical alternative for fluorescence in situ hybridization to detect HER-2/neu oncogene amplification in archival breast cancer samples. *Am J Pathol*. v. 157 n. 5, p.1467-72, 2000.

TUMA RS. A big trial for a new technology: TransBIG Project takes microarray into clinical trials. *Journal of the National Institute*. v. 96(9), p. 648-649, 2004.

TURNER NC & REIS-FILHO JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. v.25, n.43, p.5846-53, 2006.

UMEMURA S, KUROSUMI M, MORIYA T, OYAMA T, ARIHIRO K, YAMASHITA H, *et al.* Immunohistochemical evaluation of hormone receptors in breast cancer. *Appl Immunohistochem. Mol. Morphol.* v. 12, n. 1, March, 2004.

VIANI GA AFONSO SL, STEFANO EJ, DE FENDI LI, SOARES FV. Adjuvant trastuzumab in the treatment of her-2-positive early breast cancer: a meta-analysis of published randomized trials. *BMC Cancer*. v.7, n.153, p.1-11, 2007.

VIEIRA DSC, DUFLOTH RM, SCHMITT FCL, ZEFERINO LC. Breast cancer: new concepts in classification. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* v.30, n.1, p. 42-7, 2008.

VOGEL VG. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. *Menopause: The Journal of The North American Menopause Society*. v.15, n.4, p.782-789, 2008.

WALKER RA. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. *J. Clin Pathol.* v. 61, n.6, p.689-96. Jun. 2008.

WALKER RA, LEES, E, WEBB MB, DEARING SJ. Breast carcinomas occurring in young women (< 35 years ) are different. *British Journal of Cancer*, v.74, p.1796-1800, 1996.

YAU C, FEDELE V, ROYDASGUPTA R, FRIDLAND J, HUBBARD A, GRAY JW *et al.* *et al.* Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone- dependent breast cancers *Breast Cancer Research* v. 9 n. 5, 2007.

ZHANG D-H, SALTO-TELLEZ M, PUTTI TC, DO E, KOAY ES. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol.* v. 17, n. 1, p. 79-85, 2003.

**ANEXOS**

## ANEXO 1-A

**Pareceres dos Comitês de Ética**

Universidade Federal de Minas Gerais  
Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG - COEP

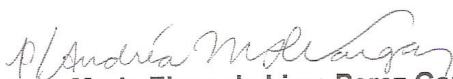
**Parecer nº. ETIC 0457/06**

**Interessada: Profa. Helenice Gobbi**  
**Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal**  
**Faculdade de Medicina-UFMG**

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP, aprovou no dia 29 de novembro de 2006, o projeto de pesquisa intitulado **"Marcadores moleculares em câncer de mama em mulheres jovens (idade de 35 anos): estudo comparativo em câncer de mulheres pós-menopausa (idade  $\geq$  50 anos)"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido do referido projeto.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

  
**Profa. Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia**  
**Presidente do COEP/UFMG**

## ANEXO 1-B

CEP/ACCG - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA  
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

---

**PROTOCOLO CEPACCG Nº 063/06**

**Goiânia, 18/01/2007**

**INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES):** Dra. Mara Costa Dutra

**TÍTULO:** Marcadores moleculares em câncer de mama em mulheres jovens (idade  $\leq$  35 anos): Estudo comparativo com mulheres pós menopausa (idade  $\geq$  50 anos).


**Área Temática:** Grupo III

**Local de Realização:** ACCG/Hospital Araújo Jorge – Laboratório e Arquivo

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

  
**DR. GERALDO SILVA QUEIROZ**  
Coordenador do CEP/ACCG

**ANEXO 2 - REGISTRO DE PACIENTES, AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA (HE) E  
IMUNO-HISTOQUÍMICA**

**PROTOCOLO DE PESQUISA - REGISTRO DE PACIENTES**

NOME: \_\_\_\_\_

REGISTRO: \_\_\_\_\_

NÚMERO DA BIÓPSIA : \_\_\_\_\_

ANO: \_\_\_\_\_

EXAME IMUNOISTOQUÍMICO (IIQ): \_\_\_\_\_ ANO: \_\_\_\_\_

PROCEDÊNCIA: 1- Hospital Araújo Jorge/Goiânia; 2- HC/UFMG; 3- Hospital do Câncer A.C. Camargo/São Paulo

**I - CLÍNICA**

**Idade:** número inteiro (se não tiver, deixar em branco)

**Cor:** 1- branca; 2- parda; 3- negra; 4- não consta

**História familiar (Hfam):**

- 1- Ca de mama em parente de 1º grau: mãe, irmã (1a = 1parente; 1b =2 ou mais parentes)
- 2- Ca de mama em parente de 2º grau: tia, prima
- 3- Negativa
- 4- Não consta

**II - TRATAMENTO**

**Quimioterapia:**

1. Adjuvante
2. Negativa
3. Neoadjuvante
4. Não consta

**Radioterapia:**

1. Adjuvante
2. Negativa
3. Neoadjuvante
4. Não consta

**Tamoxifeno**

1. Sim
2. Não
3. Não consta

**Terapia de reposição hormonal**

1. Sim
2. Não
3. Não consta

### III -ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

#### Tipo do espécime:

- 1- Biópsia
- 2- Tumorectomia
- 3- Setorectomia/Quadrantectomia
- 4- Mamoplastia
- 5- Mastectomia simples
- 6- Mastectomia com esvaziamento axilar
- 7- Setorectomia/Quadrantectomia com esvaziamento axilar
- 8- Imuno-histoquímica p/ marcadores prognósticos
- 9- Outros

#### Lateralidade:

- 1- Unilateral
- 2- Bilateral
- 3- Não consta

**Quadrante:** informar com letras (QSE; QSI; QIE; QII)

Lateralidade da biópsia (LatBIO):

- 1- Direita
- 2- Esquerda
- 3- Não consta

#### Estadiamento anátomo-patológico (TNM):

- 1- 0 ; 2- I; 3- IIA; 4- IIB; 5- IIIA; 6- IIIB; 7- IIIC; 8- IV 9- sem informes

pT: Tx (tumor não disponível) T0 (sem evidência de tumor) T1 ( $\leq 2$ cm) T2 ( $>2-5$ cm)  
T3( $>5$ cm) T4 Invasão da parede torácica/pele

pN: Nx- Linfonodos regionais não avaliados

No- Ausência de metástases ao exame histológico de rotina (HE)

N1- Metástases em 1 a 3 linfonodos axilares e/ou nos linfonodos da cadeia mamária interna pela biópsia de linfonodo sentinela, mas não detectável clinicamente.

N2- Metástases em 4 a 9 linfonodos ou em linfonodos da cadeia mamária interna clinicamente aparente, na ausência de metástase axilar.

N3- Metástases em 10 ou + linfonodos axilares, ou linf. infraclaviculares, ou em linf. supraclavicular ipsilateral.

pM Metástases a distância

Mx- não avaliável

M0- ausente

M1- Metástase a distância

**Número de linfonodos dissecados:** valor

**Número de linfonodos positivos:** valor

**Tipo histológico geral ao diagnóstico inicial e após revisão histológica (TipoHi e r):**

1- Carcinoma ductal invasor (CDI) SOE: mais de 60% a 75% do tumor apresenta tipo não especial

2- Tipo especial puro: mais de 90% do tumor apresenta tipo especial. Especificar

3- Tipo especial variante: 75% a 90% do tumor apresenta tipo especial. Especificar

**Subtipo histológico:** Especificar

**Formação tubular ao diagnóstico inicial e após revisão histológica (Ftubi e Ftubr ) :**

1- 1 ( mais de 75% do tumor)

2- 2 ( de 25% a 75% do tumor)

3- 3 ( menos de 25% do tumor)

**Grau nuclear (GNi e r):**

1- 1 (discreto pleomorfismo nuclear)

2- 2 ( moderado)

3- 3 (acentuado)

**Índice mitótico (IMi e r):**

1- 1 (0 a 6 figuras de mitose por 10 HPF)

2- 2 (7 a 12 figuras de mitose por 10 HPF)

3- 3 (mais de 12 figuras de mitose por 10 HPF)

**Grau histológico (GH i e r):**

1- GI (Bem diferenciado)

2- GII (Moderadamente diferenciado)

3- GIII (Pouco diferenciado)

4- Não se aplica

**IV- ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO****Receptor de estrógeno (RE) inicial (i) e após repetição da reação imuno-histoquímica:**

1- Positivo

2- Negativo

3- Não consta

**Receptor de progesterona (RP) inicial (i) e após repetição:**

1- Positivo

2- Negativo

3- Não consta

**HER2 (c-erb-B2/neu) inicial (i) e após repetição:**

1- Positivo

2- Negativo

3- Não consta

**EGFR:**

1- Positivo

2- Negativo



**CK 5:**

- 1- Positivo
- 2- Negativo

**CK 14:**

- 1- Positivo
- 2- Negativo

**p63:**

- 1- Positivo
- 2- Negativo

**p53 inicial ( i ) e após repetição:**

- 1- Positivo
- 2- Negativo
- 3- Não consta

**V- SEGUIMENTO CLÍNICO*****Follow-up* (FUP):**

- 1- Viva sem evidência da doença
- 2- Óbito pela doença
- 3- Viva sem doença
- 4- Perda de *follow-up*

**Tempo de *follow-up* (TEMPFUP):** número de meses

**Recidiva da doença (REC):**

- 1- Presença de recidiva
- 2- Ausência de recidiva
- 3- Não consta

**Local (is) da recidiva:** Especificar

**Sobrevida global (SG):** número de meses

**Sobrevida livre de doença (SLD):** número de meses

<b>PROTOCOLO DE PESQUISA</b>
------------------------------

**NOME:****BIÓPSIA:****ANO:**

Sexo: Idade: Cor:

RG:

IIQ:

Ano:

Procedência:

Tipo de espécime:

Lateralidade:

Quadrante:

LatBIO:

Data do diagnóstico inicial:

Data da última visita/óbito:

Hfam:

Tipos de TTO:

TipoHi:

TipoHr:

Subtipo histológico:

Ftubi:

Ftubr:

GNi:

GNr:

IMi:

IMr:

GHi:

GHr:

Tamanho do tumor (T):

LN:

Linfonodo sentinela:

Estadiamento (TNM):

*Follow-up* (FUP):Tempo de *follow-up* (TEMPFUP):

Recorrências (local ou a distância):

REi:

RE:

RPi:

RP:

HER2i:

HER2:

p53i:

p53:

CK5:

CK14:

EGFR:

p63:

## **ANEXO 3 - PROTOCOLO PARA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA**

### **Protocolo Imunoistoquímico do Polímero Não Biotinilado (Novolink Max Polymer, Novocastra, UK)**

#### **Desparafinização:**

- 1) Imergir as lâminas em xilol - 3 banhos em xilol (5 minutos cada)
- 2) Imergir as lâminas em álcool - 4 banhos (mergulhar 10X)
- 3) Lavagem por 5 minutos em água corrente

#### **Reativação antigênica: conforme o anticorpo primário**

- 4) Recuperação antigênica na Pascal (Câmara de Pressão): em solução Citrato pH 6,0 à 125° C (30 segundos após atingir 125°C)
- 5) Recuperação antigênica com digestão enzimática: mergulhar as lâminas em solução de proteinase k da Dako (diluição 1:20 em tris pH 7,5) e deixar por 7 minutos
- 6) Deixar as lâminas resfriando em temperatura ambiente por 20 a 30 minutos
- 7) Depois de frias, lavagem em água corrente por 5 minutos

#### **Bloqueio da peroxidase endógena:**

- 8) Imergir as lâminas em Peróxido de Hidrogênio (10 volumes) durante 5 minutos
- 9) Lavagem em tampão PBS: 3 banhos, com duração de 5 minutos cada

#### **Bloqueio de proteínas:**

- 10) Pingar o Bloqueador de Proteínas e deixar por 20 minutos
- 11) Lavagem em PBS: 3 banhos, com duração de 5 minutos cada

#### **Anticorpo primário:**

- 12) Incubação com o anticorpo primário por 2 horas
- 13) Lavagem em PBS

#### **Bloqueador pós-primário:**

- 14) Incubação com Bloqueador pós-primário por 30 minutos
- 15) Lavagem em PBS

**Aplicação do polímero:**

- 16) Incubação com NovoLink Polymer (NovoLink Max Polymer, Novocastra,UK) por 30 minutos
- 17) Lavagem em PBS

**Revelação da reação:**

- 18) Revelação da reação com cromógeno diaminobenzidina (DAB): 5 minutos (Kit Liquid DAB + Substrate Chromogen System; DakoCytomation, Carpinteria, Califórnia)
- 19) Lavagem em água corrente

**Contracoloração:**

- 20) Contracoloração com Hematoxilina de Harris por 2 minutos
- 21) Lavagem em água corrente por 5 minutos

**Desidratação, diafanização e montagem:**

- 22) Imergir as lâminas em álcool absoluto: 3 minutos em cada cuba
- 23) Imergir as lâminas em xilol: 10X em cada uma das 2 cubas
- 24) Manter as lâminas na 2ª cuba de xilol enquanto se realiza a montagem com lamínula e Enthelan®.

#### **ANEXO 4 - PRODUÇÕES CIENTÍFICAS RELACIONADAS À TESE**

##### **Tema livre apresentado como pôster no XIV Congresso Brasileiro de Mastologia**

DUTRA MC, ANDRADE VP, SOARES FA, DE PAULA EC, REZENDE MA, GOBBI H. Carcinomas mamários em mulheres jovens ( $\leq 35$  anos): características clínicas e anátomo-patológicas. XIV Congresso Brasileiro de Mastologia Fortaleza – Ceará 17 de outubro de 2007.

##### **Tema livre apresentado como pôster em Encontro de Pós – Graduação**

DUTRA MC, ANDRADE VP, SOARES FA, DE PAULA EC, REZENDE MA, GOBBI H. Carcinomas mamários em mulheres jovens ( $\leq 35$  anos): características clínicas e anátomo-patológicas. I Encontro de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, Belo Horizonte, 17 e 18 de abril de 2008.

##### **Tema livre selecionado para apresentação oral**

DUTRA MC, ANDRADE VP, SOARES FA, DE PAULA EC, REZENDE MA, GOBBI H. Carcinomas mamários em mulheres jovens ( $\leq 35$  anos): características clínicas e anátomo-patológicas. 34ª Jornada Goiana de Ginecologia e Obstetrícia / II Simpósio Internacional de Ginecologia e Obstetrícia de Goiás – Goiânia – 18 a 21 de junho de 2008.

**Artigo enviado para submissão em periódico indexado**

DUTRA MC, REZENDE MA, ANDRADE VP, SOARES FA, DE PAULA EC, GOBBI H. “Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens” Submetido em 12/12/2008 (artigo original, código de fluxo 918). *Revista da Associação Médica Brasileira (RAMB)*.

**Artigo enviado para submissão em periódico indexado**

DUTRA MC, REZENDE MA, ANDRADE VP, SOARES FA, DE PAULA EC, GOBBI H. “Imunofenótipo e evolução de câncer de mama em mulheres muito jovens (idade  $\leq$  35 anos): estudo comparativo com mulheres pós-menopausa (idade entre 50 - 65 anos)” Submetido em 05/01/2009 via correio, aguardando e-mail de recebimento. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia (RBGO)*.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
FACULDADE DE MEDICINA  
DEPARTAMENTO DE ANATOMIA PATOLÓGICA E MEDICINA LEGAL

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Mara Costa Dutra**

**MARCADORES MOLECULARES EM CÂNCER DE MAMA EM  
MULHERES JOVENS (IDADE  $\leq$  35 ANOS): ESTUDO COMPARATIVO  
COM MULHERES PÓS-MENOPAUSA (IDADE ENTRE 50 - 65 ANOS)**

BELO HORIZONTE

2009