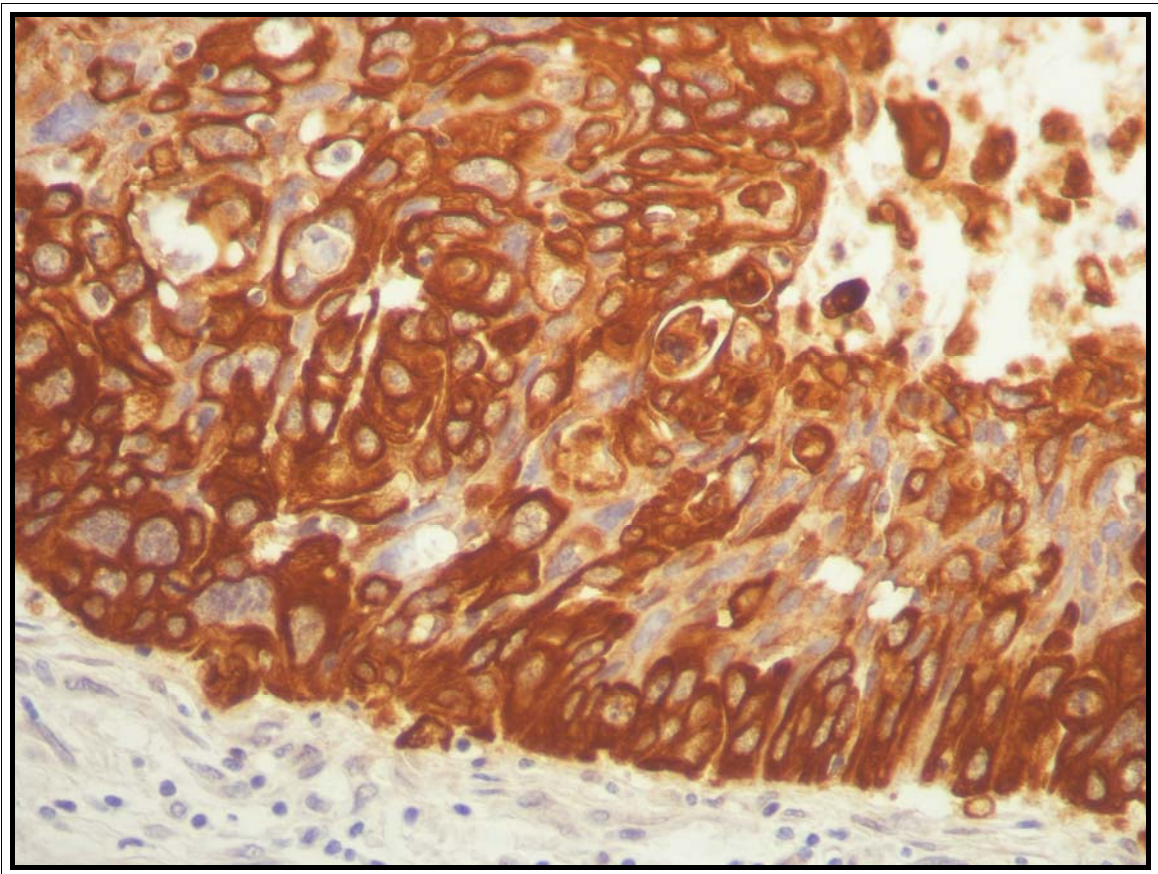


MARINA DE BROT ANDRADE

**CARCINOMAS MAMÁRIOS DE TIPO BASAL: ESTUDO
CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOFENOTÍPICO EM
MULHERES BRASILEIRAS**



BELO HORIZONTE

2008

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

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Marina De Brot Andrade

**CARCINOMAS MAMÁRIOS DE TIPO BASAL: ESTUDO
CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOFENOTÍPICO EM
MULHERES BRASILEIRAS**

BELO HORIZONTE

2008

MARINA DE BROT ANDRADE

**CARCINOMAS MAMÁRIOS DE TIPO BASAL: ESTUDO
CLÍNICO-PATOLÓGICO E IMUNOFENOTÍPICO EM
MULHERES BRASILEIRAS**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Patologia.

Área de concentração: Patologia Médica

Orientadora: Profa. Dra. Helenice Gobbi

BELO HORIZONTE
FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG
2008

Andrade, Marina De Brot.
A553c Carcinomas mamários de tipo basal [manuscrito]; estudo clínico-
patológico e imunofenotípico em mulheres brasileiras. / Marina De Brot
Andrade. - - Belo Horizonte: 2008.
113f.: il.

Orientadora: Helenice Gobbi.
Área de concentração: Patologia Médica.
Dissertação (mestrado): Universidade Federal de Minas Gerais,
Faculdade de Medicina.

1. Neoplasias Mamárias. 2. Neoplasias Mamárias/patologia. 3.
Carcinoma. 4. Mama. 5. Dissertações Acadêmicas. I. Gobbi, Helenice.
II. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina. III.
Título

NLM: WP 870

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG, com apoio financeiro do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

**“... eu não sentia nada.
Só uma transformação, pesável.
Muita coisa importante falta
nome.”**

João Guimarães Rosa

**À minha família, Adseu Álvares
de Andrade, Inez Elizabeth De
Brot Andrade e Louise De Brot
Andrade**

AGRADECIMENTOS

À professora e minha orientadora, Dra. Helenice Gobbi, pelo exemplo de trabalho, pesquisa e ética, por todas as oportunidades de crescimento pessoal e acadêmico e, principalmente, pela generosidade em me guiar no início da minha vida profissional, tanto na residência médica, quanto no mestrado.

À minha mãe, Inez Elizabeth De Brot Andrade, por ter trazido a ciência para casa, fazendo com que os tubos de ensaios fossem parte das minhas brincadeiras de criança; pelas tardes de dever-de-casa no Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital Márcio Cunha, em meio às lâminas coloridas e ao cheiro de formol (meu primeiro beijo com a Patologia); e pelos dias intermináveis no ICB e na Faculdade de Medicina. Meus primeiros passos na pós-graduação foram os seus...

Ao meu pai, Adseu Álvares de Andrade, pela paciência, atenção, carinho e apoio, constantes e silenciosos.

À minha irmã e eterna amiga, Louise De Brot Andrade, por saber ler o que não está escrito e saber ouvir o que não foi dito; traduzindo, por me conhecer tão bem e me compreender como poucos conseguem.

Aos De Brot, pela torcida e amizade a cada fase da minha vida.

Ao Dr. Fernando Augusto Soares e técnicos do Hospital do Câncer A.C.Camargo, por ter-nos aberto as portas do Departamento de Patologia, com disponibilidade, generosidade e confiança únicas.

Aos funcionários do Laboratório Pittella & Andrade, por facilitarem todas as coisas, em todos os momentos.

Aos colegas do Laboratório de Patologia Mamária, especialmente Vanessa Zschaber Marinho, Cristiana Buzelin Nunes, Rafael Malagoli e Mara Dutra, pela convivência e colaboração.

A todos os professores e colegas do curso de Pós-Graduação em Patologia, pelos ensinamentos que foram complementares e fundamentais à minha formação acadêmica e profissional.

Finalmente, agradeço a todos aqueles que, longe ou perto, sempre me desejam o bem e tornam os caminhos mais alegres de serem percorridos (porque me recuso a parar de voar).

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS.....	xi
LISTA DE TABELAS, QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS.....	xv
RESUMO	xviii
ABSTRACT	xix
INTRODUÇÃO	20
1- A importância, fatores prognósticos e classificação do câncer de mama.....	20
2- A classificação molecular do câncer de mama.....	22
3- Carcinomas mamários de fenótipo basal.....	27
3.1- Histórico.....	27
3.2- Definição.....	28
3.3- Frequência.....	32
3.4- Características clínicas.....	33
3.5- Características patológicas.....	35
3.5.1- Dimensão tumoral e atividade proliferativa.....	35
3.5.2- Necrose e zona acelular central.....	36
3.5.3- Padrões arquiteturais.....	37
3.5.4- Tipos histológicos.....	38
3.5.5- Grau histológico.....	41
3.6- Imunofenótipo.....	41
3.7- Implicações terapêuticas.....	45
4- Microarranjos de tecido (<i>Tissue Microarrays</i>).....	47
4.1- Construção dos TMA.....	48

4.2- TMA e câncer de mama.....	49
5- Justificativa do trabalho.....	50
OBJETIVOS	52
MATERIAIS E MÉTODOS.....	53
1- Dados clínicos.....	54
2- Estudo anátomo-patológico.....	54
2.1- Dados histopatológicos dos laudos originais.....	54
2.2- Revisão histopatológica.....	55
2.2.1- Classificação histológica.....	55
2.2.2- Graduação histológica.....	58
3- Estudo imunoistoquímico.....	60
3.1- Construção do TMA.....	60
3.2- Reações imunoistoquímicas.....	61
3.3- Leitura das lâminas do TMA.....	63
3.4- Avaliação e graduação das reações imunoistoquímicas.....	63
4- Análise estatística.....	68
RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	69
1- Artigo- Frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal em mulheres brasileiras.....	70
2- Resultados adicionais.....	84
2.1- Características clínico-patológicas.....	84
2.2- Cor da pele <i>versus</i> carcinomas de fenótipo basal.....	86
2.3- Expressão de marcadores associados ao fenótipo basal.....	87
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	90
CONCLUSÕES	93

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	94
ANEXOS	105
Anexo 1- Parecer do Comitê de Ética	105
Anexo 2- Registro de pacientes, avaliação histológica (HE) e imunistoquímica.....	106
Anexo 3 - Protocolo para reação imunistoquímica	111
Anexo 4- Produção científica relacionada à tese	113

LISTA DE ABREVIATURAS

AWD- *Alive with disease*

BLC- *Basal-like breast cancers*

BRCA1- gene do câncer de mama tipo 1 (*Breast cancer gene 1*)

CAP- Colégio americano de patologistas

CDI-SOE- Carcinomas ductais invasores sem outra especificação

cDNA- Ácido desoxirribonucléico complementar

CK- citoqueratinas

CK5- citoqueratina 5

CK5/6- citoqueratinas 5/6

CK7/8- citoqueratinas 7/8

CK8/18- citoqueratinas 8/18

CK17- citoqueratina 17

CK19- citoqueratina 19

c-kit- receptor tirosina-quinase tipo III

COEP- Comitê de Ética em Pesquisa

DAB- diaminobenzidina

DNA- Ácido desoxirribonucléico

DOD- *Died of disease*

EGFR- Receptor do fator de crescimento epidérmico

EUA- Estados Unidos da América

FDA- *Food and Drug Administration*

Ftubi- formação tubular no laudo anátomo-patológico original

Ftubr- formação tubular após revisão histológica

FUP- *Follow-up*

GHi- grau histológico no laudo anátomo-patológico original

GHr- grau histológico após revisão histológica

GNi- grau nuclear no laudo anátomo-patológico original

GNr- grau nuclear após revisão histológica

GI - Grau I

GII - Grau II

GIII - Grau III

HC- Hospital das Clínicas

HER1- receptor 1 do fator de crescimento epidérmico

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

HER2i- imunistoquímica para HER2 no laudo original

HER3- receptor 3 do fator de crescimento epidérmico

HER4- receptor 4 do fator de crescimento epidérmico

HE- hematoxilina e eosina

Hfam- história familiar para câncer de mama

HPF- *high power view*

HT- hormonioterapia

IC- Intervalo de confiança

ID4- *inhibitor of DNA binding 4 protein*

IIQ- imunistoquímica

INCA - Instituto Nacional do Câncer

IMi- índice mitótico no laudo anátomo-patológico original

IMr- índice mitótico após revisão histológica

KIT- gene do receptor tirosina quinase tipo III

LatBIO- lateralidade da biópsia

LN- linfonodos

MTTB- *Multi-tissue tumor block*

n- número de casos

NA- Não se aplica

NED- *Alive with no evidence of disease*

OBS- Observações

PARP- Poli-ADP-ribose

PBS - Tampão salino fosfatado

p53i- imunistoquímica para p53 no laudo original

pM- Presença de metástases à distância segundo o TNM

pN- Número de linfonodos comprometidos por metástases segundo o TNM

pT- Tamanho do tumor primário segundo o TNM

QIE - Quadrante inferior externo

QII - Quadrante inferior interno

QSE - Quadrante superior externo

QSI - Quadrante superior interno

QT- quimioterapia

RAMB- Revista da Associação Médica Brasileira

RE- receptor de estrógeno

REi- imunistoquímica para receptor de estrógeno no laudo original

REC- recidiva

RG- número do registro geral

RNA- Ácido ribonucléico

RNA_m- Ácido ribonucléico mensageiro

RP- receptor de progesterona

R_{Pi}- imunistoquímica para receptor de progesterona no laudo original

RR- Risco relativo

RT- radioterapia

RT-PCR- Reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa

RU- Reino Unido

SERM- Moduladores dos receptores de estrógeno

SG- Sobrevida global

SLD- Sobrevida livre de doença

SMA- actina de músculo liso (*smooth muscle actin*)

SOE- Sem outra especificação

T- tamanho do tumor

TEMPFUP- Tempo de *follow-up*

Tipo_{Hi}- tipo histológico no laudo anátomo-patológico original

Tipo_{Hr}- tipo histológico após revisão histológica

TMA- Microarranjos de tecido (*tissue microarrays*)

TNM- T=tumor; N=número de linfonodos acometidos pela neoplasia; M= ocorrência de metástases à distância

TTO- tratamento

TTN- Tumores triplo-negativos

UFMG- Universidade Federal de Minas Gerais

VEGF- fator de crescimento endotelial vascular

LISTA DE TABELAS, QUADROS, GRÁFICOS E FIGURAS

TABELA 1 (Materiais e Métodos) Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imunistoquímicas.....62

TABELA 1 (Artigo) Anticorpos primários, diluições, fabricantes, recuperação antigênica e valores de corte dos anticorpos utilizados no estudo imunistoquímico.....76

TABELA 2 (Artigo) Expressão de citoqueratinas basais (CK5 e CK14) e outros marcadores associados ao fenótipo basal em 140 casos de carcinomas mamários triplo-negativos.....78

TABELA 2 (Resultados adicionais) Principais características clínico-patológicas da série de 105 carcinomas com fenótipo basal.....85

QUADRO 1 Sistema de graduação histológica dos tumores da mama segundo ELSTON & ELLIS, 1991*.....59

QUADRO 2 Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Sociedade Americana de Oncologia e o CAP (WOLFF *et al*, 2007): coloração de membrana.....64

FIGURA 1 Diferentes tipos histológicos de tumores mamários invasores, em cortes corados pelo método de HE. Carcinoma ductal invasor SOE pouco

diferenciado (A); Carcinoma medular (B); Carcinoma metaplásico (C); Carcinoma micropapilar (D); Carcinoma apócrino (E); Carcinoma medular atípico (F)57

FIGURA 2 Estudo imunoistoquímico de carcinomas mamários triplo-negativos com diferentes marcadores associados ao fenótipo basal. Positividade para CK5 (A); CK14 (B); EGFR (C); p63 (D); Caveolina (E); e p53 (F).....67

FIGURA 3 Estudo histológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma mamário de fenótipo basal (caso 3) mostrando coexpressão de diferentes marcadores (400X). Em A, coloração de HE; em B e C, imuno-marcação de membrana e citoplasma positiva para CK5 e CK14; em D, imuno-marcação nuclear positiva para p63; em E, imuno-marcação de membrana positiva para caveolina; e em F, imuno-marcação nuclear positiva para p53.....89

GRÁFICO 1 (Artigo) Sobrevida global das pacientes com tumores basais *versus* tumores não basais (probabilidade de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier para pacientes com tumores basais *versus* pacientes com tumores não basais).....83

GRÁFICO 2 (Resultados adicionais) Sobrevida nas pacientes de cor branca *versus* pacientes de cor negra/parda com tumores de fenótipo basal. Probabilidade de sobrevivência estimada por Kaplan-Meier para pacientes de

cor branca *versus* pacientes de cor negra/parda com tumores de fenótipo basal.....87

RESUMO

Carcinomas mamários de tipo basal representam uma classe de tumores recentemente reconhecida, que apresentam perfis gênico e protéico semelhantes aos das células basais/mioepiteliais da mama normal, estando associados a pior prognóstico e comportamento biológico agressivo. **Objetivo:** Investigar a frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal em uma série de tumores triplo-negativos (TTN), definidos pela negatividade para receptores de estrógeno (RE), de progesterona (RP), e HER2. **Métodos:** Selecionamos 140 TTN, obtendo-se características clínico-patológicas e sobrevida. Microarranjo de tecido (2 cilindros de cada tumor) foi construído e submetido à imunistoquímica para RE, RP, HER2, citoqueratinas (CK) 5 e 14, EGFR, p63, caveolina e p53. Consideramos carcinomas de fenótipo basal os tumores negativos para RE, RP e HER2, e positivos para CK5. **Resultados:** Encontramos 105 carcinomas de fenótipo basal entre 140 TTN (frequência=75,0%). A idade média das pacientes foi de 54,8 anos, sendo que 34,3% estavam na pré-menopausa. A maioria dos tumores foi classificada como carcinoma ductal invasor de alto grau. Os TTN exibiram positividade para CK5 (75,0%), CK14 (29,0%), EGFR (36,4%), p63 (28,6%), caveolina (14,3%) e p53 (67,1%). Estadiamento avançado da doença foi observado em 52 pacientes (50,0%), com diâmetro tumoral maior que 5cm em 41 casos (39,0%) e metástases axilares em 61 casos (59,2%). Seguimento clínico foi obtido em 89 pacientes (média=51 meses). Destas, 45 pacientes (50,5%) evoluíram sem doença; 6 (6,7%) estavam vivas com doença; e 38 (42,6%) morreram pelo câncer. Recidiva sistêmica ocorreu em 42 pacientes (47,1%), sendo pulmões, cérebro e ossos os principais sítios de metástases. As médias das sobrevidas global e livre de doença foram de 36 e 28 meses, respectivamente. Identificou-se pior sobrevida global nas pacientes com tumores basais, em comparação àquelas com tumores não basais, com risco de morte 2,4 vezes maior nas primeiras. Esta diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa ($p=0,06$). **Conclusões:** Nosso estudo confirma comportamento clínico agressivo e elevada frequência dos carcinomas de fenótipo basal entre os TTN, semelhante ao descrito em casuísticas estrangeiras.

ABSTRACT

Basal-like cancers (BLC) are a newly recognized subtype of breast cancer defined by the expression of genes and proteins characteristic of the myoepithelial/basal cells of normal breast, and have been associated with poor prognosis and aggressive biological behavior. **Aim:** The aim of our study is to investigate basal phenotype in a series of triple-negative (estrogen and progesterone receptors-negative and HER2-negative) invasive mammary carcinomas. **Methods:** We selected 140 previously tested triple-negative tumors. Clinical, histopathological and survival data were obtained. A tissue microarray containing 2 cylinders from each tumor was constructed and immunohistochemistry for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2, cytokeratins (CK) 5 and 14, EGFR, p63, caveolin, and p53 was performed. We considered BLC to be any tumors that were ER/PR/HER2-negative and CK5-positive. **Results:** We found 105 cases of BLC from 140 triple-negative tumors (frequency=75.0%). The mean age at diagnosis was 54.8 years-old and 34.3% were premenopausal women. The majority of tumors were high grade (83.7%) and of ductal/no-special-type (80.8%). Triple-negative tumors showed immunoreactivity for CK5 (75.0%), CK14 (29.0%), EGFR (28.6%), p63 (28.6%), caveolin (14.3%), and p53 (67.1%). Tumor size larger than 5cm was observed in 41 cases (39.0%) and axillary metastases were detected in 61 patients (59.2%). Follow-up was recorded for 89 patients (mean=51 months): 45 patients (50.5%) with no evidence of disease; 6 patients (6.7%) were alive with disease; and 38 patients (42.6%) died of the disease. Relapse was detected in 42 women (47.1%), lungs, brain, and bones being the most common sites of metastases. The mean overall survival was 36 months and the mean disease-free interval was 28 months. Furthermore, the overall survival associated with BLC cases was shorter than that observed in non basal tumors (RR=2.4). However, this difference was not statistically significant (p=0.06). **Conclusions:** Our findings confirmed that BLC have a poor prognosis and are high-frequent carcinomas among triple-negative tumors, similar to the behavior previously reported in North American and European patients.

INTRODUÇÃO

1- A IMPORTÂNCIA, FATORES PROGNÓSTICOS E CLASSIFICAÇÃO DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é tema de grande relevância por sua alta prevalência e elevadas taxas de morbidade e mortalidade, representando, no Brasil e no mundo, o tipo de câncer mais freqüente entre as mulheres. É ainda, entre as neoplasias, a principal causa de morte em mulheres, com 49.400 casos estimados para o ano de 2008, segundo a Estimativa de Incidência de Câncer no Brasil (INCA Brasil, 2008).

Consideram-se fatores prognósticos em câncer de mama as características clínicas das pacientes e os aspectos patológicos e biológicos dos tumores que permitem prever a evolução clínica da doença ou sobrevida das pacientes no momento do diagnóstico inicial. Fatores preditivos, em contraste, são características clínicas, patológicas e biológicas que são utilizadas para estimar a probabilidade de resposta a um tipo particular de terapia adjuvante. Um marcador prognóstico deve ser validado tecnicamente, ter significado estatístico comprovado por testes clínicos e influenciar na decisão clínica (ALLRED *et al*, 1998; FITZGIBBONS *et al*, 2000; GOBBI *et al*, 2008).

Os principais parâmetros na avaliação dos pacientes com estratificação em grupos de risco, segundo a Conferência de Consenso de Saint Gallen de 2005, são idade, tamanho do tumor, grau histológico, invasão vascular peritumoral, *status* linfonodal e superexpressão de HER2 (GOLDHIRSCH *et al*, 2005).

O estudo histopatológico do tumor primário da mama através do exame anátomo-patológico com coloração de rotina (método de hematoxilina-eosina) continua sendo então o método de avaliação mais utilizado no câncer de mama, e as informações obtidas através deste exame são essenciais na determinação do prognóstico dos pacientes, com utilidade clínica já comprovada no tratamento (FITZGIBBONS *et al*, 2000). Diversos trabalhos demonstraram a importância prognóstica de se classificar e graduar os tumores de mama (ELSTON & ELLIS, 1991; PAGE *et al*, 1998; RAKHA *et al*, 2008g). A graduação histológica dos tumores mamários considera a capacidade de diferenciação estrutural e nuclear das células. O sistema de graduação mais utilizado na atualidade é o proposto por Scarff, Bloom e Richardson (1957) e modificado por Elston e Ellis (1998). Segundo este modelo, são avaliados a formação tubular, o grau nuclear e o índice mitótico.

O sistema de classificação histológica dos carcinomas da mama, adotado pelo CAP em sua Conferência de Consenso de 1999, segue as recomendações de Page *et al* (1998), onde os tumores são divididos em carcinoma ductal invasor sem outra especificação (SOE), tipos especiais puros e tipos especiais variantes.

Entretanto, o desafio de desenvolver esquemas de classificação, que identifiquem com acurácia as pacientes com risco ou não de recorrência e aquelas que responderão ou não ao tratamento, ainda persiste. Outros aspectos clínico-

patológicos e novos marcadores moleculares têm sido investigados para melhor prever o prognóstico e a evolução clínica do câncer de mama.

2- A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

Atualmente o câncer de mama representa uma doença única em oncologia, na qual marcadores específicos são rotineiramente utilizados para prever a resposta terapêutica e guiar o tratamento. Estes marcadores são também fundamentais para categorizar pacientes em diferentes grupos prognósticos, quando combinados com os dados anátomo-patológicos. Numerosos marcadores moleculares foram exaustivamente estudados nos últimos anos através da imunistoquímica (BHARGAVA *et al*, 2007; GOBBI *et al*, 2008, ROCHA *et al*, 2008; WALKER *et al*, 2008). No entanto, apenas os receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP) e o HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2) estão bem estabelecidos como fatores preditivos de resposta terapêutica, de forma que sua avaliação tornou-se rotineira na seleção de pacientes para tratamentos específicos (FITZGIBBONS *et al*, 2000; GOBBI *et al*, 2008; GOLDBIRSCH *et al*, 2005; ROCHA *et al*, 2007; WALKER *et al* 2008). Pacientes com tumores positivos para RE e RP podem ser beneficiadas pelo tratamento com moduladores dos receptores estrogênicos (SERM) e com inibidores de aromatase. O receptor de estrogênio é provavelmente o marcador preditivo mais poderoso na conduta clínica do câncer de mama, tanto na determinação do prognóstico, quanto para prever a resposta à hormonioterapia (PAYNE *et al*, 2008). Pacientes com tumores que superexpressam HER2 podem

ter aumento da sobrevida quando tratados com o anticorpo monoclonal humanizado anti-HER2/neu ou trastuzumab (GOLDHIRSCH *et al*, 2005). No entanto, pacientes com tumores negativos para estes marcadores não se beneficiam destas terapêuticas específicas. É contínua a busca de novos marcadores e fatores prognósticos adicionais que melhor estratifiquem os grupos de risco e auxiliem a direcionar as alternativas terapêuticas para aqueles que efetivamente se beneficiarão, particularmente para pacientes com tumores que não expressam as moléculas-alvo acima referidas (SORLIE *et al*, 2001; VAN DE RIJN *et al*, 2002).

Os carcinomas mamários representam um grupo heterogêneo de neoplasias que diferem no comportamento, evolução e resposta terapêutica, ressaltando-se que o câncer de mama é uma doença genética complexa, caracterizada pelo acúmulo de alterações moleculares múltiplas. Até recentemente, como já mencionado, a classificação dos carcinomas mamários baseava-se essencialmente no seu aspecto morfológico (ELSTON & ELLIS, 1998; PAGE *et al*, 1998). No entanto, tumores classificados sob um mesmo termo descritivo podem ter aspectos moleculares e evolução biológica variados. A heterogeneidade molecular dos tumores mamários, não avaliável morfológicamente, é um importante desafio ao estudo e tratamento do câncer de mama (GOLDHIRSCH *et al*, 2005; PAYNE *et al*, 2008).

Avanços recentes na pesquisa do genoma humano e em tecnologias moleculares de larga escala tornaram possível lidar com a complexidade molecular do câncer de mama e têm contribuído para a concepção de que esta diversidade biológica traz implicações terapêuticas (RAKHA *et al*, 2008b). As

técnicas de análise de perfis de expressão gênica utilizando microarranjos provenientes de amostras de tecido selecionadas revolucionou a pesquisa do câncer de mama, sendo o método mais empregado atualmente (RAKHA *et al*, 2008b). 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*, 2008b). Como estas técnicas podem ser aplicadas a um número relativamente limitado de casos e utilizam genes que ainda requerem verificação, outros métodos têm sido aplicados. A reação em cadeia da polimerase com transcriptase reversa (RT-PCR) permite, simultaneamente, a amplificação e a detecção do DNA alvo ou de seqüências de cDNA. Foi também desenvolvido o uso de microarranjos de tecidos ou *tissue microarrays* (TMA), um método que permite a análise de perfis de expressão protéica em grandes coortes, a partir de arquivos de amostras de tecido embebidas em blocos de parafina, possibilitando a correlação com bancos de dados clínico-patológicos e de seguimento (KONONEN *et al*, 1998).

O grupo de Stanford foi pioneiro em demonstrar que o câncer de mama pode ser classificado em subtipos distintos com base em seus perfis de expressão gênica e em suas semelhanças com as células não neoplásicas correspondentes (PEROU *et al*, 2000). Utilizando um método de agrupamento hierárquico e seqüências intrínsecas de genes, os pesquisadores classificaram os carcinomas mamários em quatro classes moleculares. Além da separação lógica dos tumores em RE-positivos e RE-negativos (a ramificação principal), agrupamentos secundários foram observados. De acordo com este trabalho, o grupo RE-positivo

é caracterizado por elevada expressão de painel de genes tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama (“câncer luminal”). O grupo RE-negativo engloba três subgrupos de tumores: um com superexpressão de HER2; um que expressa genes característicos das células basais/mioepiteliais da mama normal (“câncer basal”); e outro cujo perfil de expressão gênica é similar ao do parênquima mamário normal/fibroadenomas. Estudos subseqüentes (CALZA *et al*, 2006; SORLIE *et al*, 2001; SORLIE *et al*, 2003) identificaram consistentemente os mesmos grupos de tumores inicialmente descritos por Perou *et al* (2000). Entretanto, alguns subgrupos parecem ser instáveis (RAKHA *et al*, 2008b). Por exemplo, a subclassificação dos tumores luminais pode compreender de um a três grupos (luminal A, luminal B e luminal C); tumores não classificáveis ou tipo “mama normal” parecem ser indistinguíveis do grupo de carcinomas negativos para RE em alguns trabalhos (PEROU *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2001). Posteriormente, pesquisas avaliando perfis imunistoquímicos através de 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 importância desta taxonomia molecular se reflete nos casos em que grupos moleculares distintos diferem também quanto ao comportamento clínico; além disto, as análises transcriptômicas forneceram informações sobre quais genes seriam responsáveis por cada subgrupo (RAKHA *et al*, 2008b).

Em suma, estes estudos permitiram identificar grupos distintos de tumores e desenvolver novo esquema de classificação molecular dos carcinomas mamários, associados a diferentes cursos clínicos (ABD EL-REHIM *et al*, 2005; PEROU *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2001):

Luminal A: expressão de genes e proteínas que são tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama (positividade para receptores de estrógeno, RE, e para receptores de progesterona, RP; e negatividade para HER2);

Luminal B: expressão de genes e proteínas tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama, além da expressão de genes semelhantes ao do grupo de tumores com superexpressão de HER2 (positividade para receptores de estrógeno, RE, para receptores de progesterona, RP);

Tumores com superexpressão de HER2: superexpressão de HER2 (negatividade para receptores de estrógeno, RE, e para receptores de progesterona, RP; e positividade para HER2);

Tipo basal: expressão de genes e proteínas característicos das células basais/mioepiteliais da mama (negatividade para receptores de estrógeno, RE, receptores de progesterona, RP, e HER2; e expressão de citoqueratinas basais);

Não classificável (tipo “mama normal”): expressão de genes e proteínas semelhantes aos expressos nas amostras de parênquima mamário normal e fibroadenomas (negatividade para todos os marcadores referidos acima).

Embora estudos imunoistoquímicos não forneçam análise biológica dos tumores tão acurada quanto aqueles baseados em microarranjos de cDNA, os trabalhos utilizando marcadores protéicos e TMA possibilitam identificar os grupos inicialmente determinados através da análise do perfil gênico. Há então boa reprodutibilidade entre os estudos utilizando imunoistoquímica e aqueles que empregaram microarranjos de cDNA para identificação de subtipos tumorais com características biológicas e comportamento clínico semelhantes (ABD EL-REHIM

et al, 2005; NILSEN *et al*, 2004). O sistema de classificação baseado em perfis imunohistoquímicos também permite que investigações sejam conduzidas em populações onde amostras de tecido fresco não estão disponíveis.

3- CARCINOMAS MAMÁRIOS DE FENÓTIPO BASAL

3.1- Histórico

É errônea a concepção de que os carcinomas de fenótipo basal foram descobertos através do trabalho pioneiro de Perou *et al* (2000), embora tal estudo tenha renovado o interesse para este subtipo de tumores, fornecendo informações quanto à base genética para a avaliação destas neoplasias como um grupo e adotando designações específicas para se referir a estas. Há várias décadas já era descrito um grupo de carcinomas mamários que apresentavam diferenciação mioepitelial (MURAD *et al*, 1971). Os experimentos clássicos de Moll *et al* (1982) investigaram os perfis específicos de CK na mama normal, e em lesões mamárias benignas e malignas, demonstrando que 2% a 18% dos carcinomas de mama e até 25% dos tumores de alto grau expressavam CK de alto peso molecular, e portanto tinham um fenótipo basal/mioepitelial. Foi posteriormente reconhecido que estas neoplasias eram negativas para RE, RP e HER2 (MALZAHN *et al*, 1998). Por conseguinte, o fenótipo basal já havia sido relatado na literatura, mas não fazia parte de um sistema de classificação do câncer de mama.

3.2- Definição

Atualmente, os carcinomas de fenótipo basal (também chamados de carcinomas de tipo basal, tumores basais ou basalóides) são definidos através de perfis de expressão gênica e/ou imunoistoquímica, tendo sido inicialmente descritos como neoplasias que apresentam perfis gênico e protéico semelhantes aos das células basais/mioepiteliais da mama normal (PEROU *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2001). Assim verificou-se neste grupo expressão de citoqueratinas de alto peso molecular, as chamadas citoqueratinas (CK) basais (CK5, CK14 e CK17), além de laminina, c-kit, receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR ou HER1), e P-caderina (ABD EL-REHIM *et al*, 2005; NILSEN *et al*, 2004). Os tumores de fenótipo luminal, por outro lado, expressam CK7, CK8/18 e CK19, como as células epiteliais luminais da mama normal (FULFORD *et al*, 2006; FULFORD *et al*, 2007).

Como o uso das técnicas de microarranjos de cDNA ainda não é rotineiro, a maioria dos trabalhos define os carcinomas de fenótipo basal imunoistoquimicamente. Por conseguinte, para auxiliar a padronizar as investigações, uma definição precisa destes tumores seria necessária, estabelecendo um subtipo mais uniforme de neoplasias e aumentando a probabilidade de que características prognósticas/preditivas possam ser aplicáveis para todo o grupo. Ainda não há, entretanto, consenso internacional determinando precisamente quais marcadores devem ser empregados para definir e identificar os carcinomas de tipo basal (FADARE & TAVASSOLI, 2007; RAKHA *et al*, 2008c). A maioria dos autores incluiu em suas definições imunopositividade para CK5 ou

CK5/6 (ABD EL-REHIM *et al*, 2005; ARNES *et al*, 2005; BANERJEE *et al*, 2006; FOULKES *et al*, 2004; KIM *et al*, 2006; LAAKSO *et al*, 2005; MATOS *et al*, 2005; NILSEN *et al*, 2004; RAKHA *et al*, 2006a; RAKHA *et al*, 2006b; RAKHA *et al*, 2007b; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006; SIZIOPIKOU *et al*, 2007; VAN DE RIJN *et al*, 2002). Outros marcadores também já requeridos para a inclusão no grupo de tumores basais foram CK14 (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; ABD EL-REHIM *et al*, 2005; BANERJEE *et al*, 2006; FULFORD *et al*, 2006; KIM *et al*, 2006; LAAKSO *et al*, 2005; RAKHA *et al*, 2006a; RAKHA *et al*, 2006b; RAKHA *et al*, 2007b), CK17 (BANERJEE *et al*, 2006; VAN DE RIJN *et al*, 2002), EGFR (KIM *et al*, 2006; NILSEN *et al*, 2004; REIS-FILHO *et al*, 2006; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006), c-kit (KIM *et al*, 2006; NILSEN *et al*, 2004), p63 (LAAKSO *et al*, 2005; MATOS *et al*, 2005; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005) e P-caderina (ARNES *et al*, 2005; MATOS *et al*, 2005).

Os trabalhos pioneiros de Perou *et al* (2000) e Sorlie *et al* (2001) identificaram os carcinomas basais no grupo dos tumores negativos para RE, RP e HER2, os chamados tumores triplo-negativos (TTN). Em decorrência disto, alguns estudos exigiram especificamente a ausência de imunorreatividade para estes marcadores como critério de definição dos tumores de tipo basal (KIM *et al*, 2006; MATOS *et al*, 2005; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006), enquanto outros não apresentavam esta exigência. Apesar de haver grande sobreposição entre os TTN e os carcinomas de fenótipo basal, esta não é completa (RAKHA *et al*, 2008a). Análises quanto ao *status* de RE, RP e HER2 em carcinomas de mama classificados como basais através de seus perfis de expressão gênica/protéica mostram que estes tumores expressam pelo menos um destes três marcadores

em 15% a 54% dos casos (CALZA *et al*, 2006; NIELSEN *et al*, 2004; SOTIRIOU *et al*, 2003). É importante frisar, portanto, que TTN e tumores de fenótipo basal não são sinônimos (REIS-FILHO & TUTT, 2008).

Utilizando blocos de parafina provenientes dos tumores de fenótipo basal previamente identificados por Sorlie *et al* (2001) em seus trabalhos com microarranjos de DNA, Nielsen *et al* (2004) realizaram estudo imunoistoquímico para citoqueratina 5/6 (CK5/6), HER1, c-KIT, RE e HER2. A partir de 21 tumores de carcinomas de tipo basal, identificados através de seus perfis gênicos, observou-se que este subtipo era tipicamente negativo para RE e HER2, e positivo para CK5/6, HER1 e c-kit, sendo que os 16 casos com este perfil protéico apresentavam o perfil gênico de tipo basal, demonstrando sensibilidade de 76% e especificidade de 100%. Aplicando estes marcadores e empregando microarranjos de tecido de carcinomas de mama representativos de 930 pacientes e com um tempo médio de seguimento de 17,4 anos, a expressão de CK5/6 foi associada com baixa sobrevida livre de doença. A expressão de HER1 foi identificada em 54% dos casos CK5/6-positivos (e em 11% dos casos CK 5/6-negativos), estando também associada com pior sobrevida. Foi proposto então, pela primeira vez, um painel imunoistoquímico de quatro anticorpos (RE, HER2, HER1 e CK5/6), para identificar com acurácia e elevada especificidade os tumores de fenótipo basal.

Ribeiro-Silva *et al* (2005) aplicaram nove marcadores (p63, CK5, CK8/18, BRCA1, RE, RP, p53, c-erbB-2 e Ki67) em amostras provenientes 102 carcinomas ductais invasores. Os casos positivos para CK5 foram submetidos a dupla coloração com p63, notando-se forte correlação da expressão destes dois

marcadores, estando ambos também associados à negatividade para receptores hormonais, redução da expressão de BRCA1, alto grau histológico e elevada taxa proliferativa.

Através da análise de TMA representativos de 168 carcinomas invasores da mama, Matos *et al* (2005) verificaram nos tumores basais expressão de P-caderina, p63 e CK5. Neste estudo os autores definiram o fenótipo basal pela imunopositividade para pelo menos um destes três marcadores (CK5, p63 ou P-caderina) e negatividade para RE e HER2. Isto significa que um caso poderia ser incluído no grupo de tumores basais apenas pela expressão de p63, além da ausência de marcação para RE e HER2. Rakha *et al* (2006a), no entanto, relataram recentemente que os tumores com o denominado “fenótipo mioepitelial” (positividade para actina de músculo liso e/ou p63) são distintos, em termos de prognóstico, dos tumores de fenótipo basal (CK5/6- e/ou CK14-positivos).

Estas diferenças quanto à definição indubitavelmente afetam a proporção de carcinomas classificados como de tipo basal, com risco de não serem identificadas subclasses biologicamente relevantes. Há ainda implicações prognósticas no uso de diferentes definições, como já mencionado. Dentre os carcinomas ductais invasores de alto grau, se o fenótipo basal é definido apenas pela imunorreatividade para CK14, esta característica não se correlaciona significativamente com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença (FULFORD *et al* 2007). Entretanto, se a definição incluir imunopositividade para pelo menos uma das CK5/6, CK14 ou CK17, o fenótipo basal está associado com redução das sobrevidas global e livre de doença (BANERJEE *et al*, 2006).

Rakha *et al* (2007b) estudaram os padrões de expressão das CK basais (CK5/6 e CK14), RE, RP, receptores de androgênio, EGFR, HER2, BRCA1, P-caderina e marcadores mioepiteliais (actina de músculo liso e p63) em uma série bem caracterizada de carcinomas mamários invasores (1872 casos), com tempo de seguimento longo e utilizando TMA e imunohistoquímica. Embora a expressão de CK basais tenha sido associada a outros marcadores, estes não auxiliaram a identificar aqueles casos de pior evolução. Ao contrário, quando foram empregados para definir os casos de fenótipo basal, reduziram consideravelmente a proporção de casos alocados no grupo de pior prognóstico. Este trabalho então propôs que a definição do fenótipo basal seja baseada apenas na expressão de CK basais (CK5/6 e/ou CK14), a despeito da expressão de outros marcadores.

3.3- Frequência

Os tumores de fenótipo basal, identificados através de estudos de perfis de expressão gênica e imunohistoquímica em grandes séries de pacientes, representam 7% a 19% dos carcinomas mamários invasores (ABD EL-REHIM *et al*, 2005; MATOS *et al*, 2005; NIELSEN *et al*, 2004; PEROU *et al*, 2000; SORLIE *et al*, 2003; VAN DE RIJN *et al*, 2002).

No grupo dos TTN a frequência é significativamente maior, sendo que 56% a 84% dos carcinomas expressam marcadores de fenótipo basal, como CK basais e EGFR (TISCHKOWITZ *et al*, 2007; RAKHA *et al*, 2007a).

3.4- Características clínicas

Os carcinomas de fenótipo basal têm sido consistentemente associados a comportamento clínico agressivo, com sobrevida global (SG) e sobrevida livre de doença (SLD) baixas (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; NIELSEN *et al*, 2004; VAN DE RIJN *et al*, 2002). Alguns estudos demonstraram a expressão de CK basais como fator prognóstico independente da dimensão tumoral, grau histológico e *status* linfonodal (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; RAKHA *et al*, 2007b). Entretanto, até recentemente, quando comparados com tumores não basais RE-negativos (JUMPPANEM *et al*, 2007) ou de grau histológico semelhante (FULFORD *et al*, 2007), o fenótipo basal não seria, por si só, um indicador de pior prognóstico. Cheang *et al* (2008), empregando microarranjos de tecido representativos de 3.744 carcinomas mamários, compararam a significância prognóstica de um painel imunohistoquímico de três marcadores (RE, RP e HER2), indicador do fenótipo triplo-negativo, com um painel de cinco marcadores (RE, RP, HER2, CK5/6 e EGFR), indicador do fenótipo basal. A frequência de TTN foi de 17% (sobrevida de 67% em 10 anos) e a de tumores de tipo basal foi de 9% (sobrevida de 62% em 10 anos). A análise multivariada mostrou que o painel de cinco marcadores tem maior valor prognóstico que o de três marcadores, ressaltando que o pior prognóstico de pacientes com TTN é conferido quase inteiramente pela expressão de marcadores basais. Entre pacientes com TTN tratados com quimioterapia adjuvante, a positividade para CK5/6 e EGFR identificou uma coorte de pacientes com evolução clínica significativamente pior, indicando que o painel de cinco

anticorpos é melhor preditor de sobrevida que o painel de três marcadores utilizado na rotina de avaliação do câncer de mama.

Além de associados a pior prognóstico, os carcinomas de tipo basal tendem a ocorrer em pacientes com idade média inferior à observada para aquelas com outros carcinomas ductais invasores de alto grau, com médias de 49,9 anos *versus* 53,9 anos, respectivamente (FULFORD *et al*, 2007). Estes tumores também têm sido relatados com maior freqüência no grupo de mulheres jovens (idade menor que 35 anos ou na pré-menopausa), e de origem afro-americana ou hispânica (BAUER *et al*, 2007; CAREY *et al*, 2006; MORRIS *et al*, 2007). O primeiro trabalho a atentar para este fato foi o *Carolina Breast Cancer Study*, que correlacionou o fenótipo basal com raça e *status* menopausal, mostrando maior prevalência destes tumores entre mulheres afro-americanas na pré-menopausa (39%), quando comparadas às mulheres afro-americanas na pós-menopausa (14%) e às mulheres não afro-americanas de qualquer idade (16%), contribuindo para o pior prognóstico observado no primeiro grupo (CAREY *et al*, 2006). Outros estudos também mostraram que a expressão de marcadores preditivos em câncer de mama sofreria influência do fator racial. Pacientes negras com tumores triplo-negativos apresentam pior prognóstico que as caucasianas, independente do estadió no momento do diagnóstico (BAUER *et al*, 2007; MORRIS *et al*, 2007).

Em alguns trabalhos, ressalta-se ainda que os tumores basais apresentam comportamento biológico diferente dos demais carcinomas mamários pouco diferenciados, com padrão de disseminação distinto (FULFORD *et al*, 2007; RAKHA *et al*, 2007b). Comparados com outros tumores de alto grau, os carcinomas de tipo basal têm menor tendência a evoluir com metástases para

linfonodos axilares, ossos e fígado. Há, por outro lado, maior incidência de metástases cerebrais e pulmonares (CAREY *et al*, 2006; FULFORD *et al*, 2007; LUCK *et al*, 2008). Gaedcke *et al* (2007) demonstraram que a maioria dos carcinomas mamários metastatizantes para o cérebro pertencem aos subgrupos dos tumores basais ou com superexpressão de HER2.

Os tumores de tipo basal também parecem apresentar padrão distinto de resposta à quimioterapia, a única modalidade de terapia sistêmica atualmente disponível para pacientes com TTN (basais e não-basais). Apesar destes pacientes mostrarem elevadas taxas de resposta à quimioterapia neoadjuvante com antraciclinas (maior sensibilidade terapêutica), não apresentam resposta patológica completa, ainda evoluindo com pior prognóstico e baixa sobrevida (CAREY *et al*, 2007; TAN *et al*, 2007).

3.5- Características patológicas

Morfologicamente, embora não haja achados específicos dos carcinomas de fenótipo basal, algumas características são encontradas com maior frequência nestes tumores.

3.5.1- Dimensão tumoral e atividade proliferativa

A maioria dos trabalhos relata que não há diferenças significativas quanto ao tamanho do tumor, ao se compararem os carcinomas basais com os outros subtipos moleculares de tumores mamários, definidos através de perfis de

expressão gênica (CALZA *et al*, 2006; SOTIRIOU *et al*, 2003). Além disso, um estudo recente demonstrou que a dimensão tumoral não é um indicador prognóstico importante nos tumores de tipo basal, como é observado nos carcinomas invasores não basais (FOULKES *et al*, 2008).

Vários estudos têm consistentemente confirmado que os tumores basais apresentam taxas proliferativas altas, demonstradas através de índice mitótico elevado (média de 45 mitoses por 10 campos de grande aumento) e expressão aumentada de Ki-67 (FULFORD *et al*, 2005; LIVASY *et al*, 2006; PEROU *et al*, 2000; POTEMSKI *et al*, 2005; RAKHA *et al*, 2006b; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005). Esta taxa de crescimento elevada poderia explicar a grande representação dos carcinomas de fenótipo basal entre os chamados “carcinomas intervalares” (*interval breast cancers*), ou seja, tumores que surgem no intervalo de tempo entre mamografias de rastreamento (COLLETT *et al*, 2005; FADARE & TAVASSOLI, 2007).

3.5.2- Necrose e zona acelular central

A presença freqüente de zonas centrais acelulares ou necróticas já havia sido descrita por Tsuda *et al* (1999) em tumores que expressavam marcadores mioepiteliais, como SMA, S-100 e CK14. Tot *et al* (2000) também relataram a presença de necrose em carcinomas com expressão de CK basais. O único estudo morfológico detalhado de tumores basais, definidos através de seus perfis gênicos, não evidenciou zona acelular central em nenhum dos 23 casos,

observando-se, por outro lado, áreas extensas de necrose geográfica (LIVASY *et al*, 2006). Outros trabalhos correlacionaram o fenótipo basal e necrose tumoral (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; RAKHA *et al*, 2006b). Avaliando carcinomas ductais invasores de alto grau, Fulford *et al* (2006) observou que os tumores basais (definidos pela positividade para CK14) eram significativamente mais propensos a apresentar cicatriz central e necrose tumoral do que os tumores não basais. Entretanto, o significado deste achado permanece incerto, já que muitas pacientes são submetidas a biópsias por agulha antes da exérese completa do tumor e freqüentemente notam-se áreas centrais de fibrose reparativa, com formação de cicatriz secundária a procedimento prévio. Seria necessário, ainda, padronizar o tamanho e as características desta zona acelular central (FADARE & TAVASSOLI, 2007).

3.5.3- Padrões arquiteturais

Os carcinomas de fenótipo basal, em estudos empregando perfis de expressão gênica (LIVASY *et al*, 2006) e protéica (FULFORD *et al*, 2006; MATOS *et al* 2005), têm maior propensão a apresentar padrão de crescimento expansivo, com bordas não infiltrativas. Estes tumores exibem graus variáveis de infiltrado inflamatório linfoplasmocitário peritumoral, mas em proporções que excedem aquelas observadas nos tumores não basais (FULFORD *et al*, 2006; LIVASY *et al*, 2006). Estas características favorecem a associação com os chamados carcinomas medulares atípicos. A maioria dos tumores mostra ainda baixa formação tubular,

crescendo em padrão sincicial ou formando ninhos. Em alguns casos pode-se observar também padrão adenóide cístico (FADARE & TAVASSOLI, 2007).

3.5.4- Tipos histológicos

Muitos trabalhos já mostraram que o tipo histológico mais comumente 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*, 2006a; RAKHA *et al*, 2006b). Como os carcinomas ductais invasores sem outra especificação (CDI-SOE) representam o tipo histológico mais freqüente dos tumores de mama, é lógico esperar que seja também o mais prevalente entre os subgrupos moleculares. De fato, ao se examinar uma grande série de carcinomas mamários, dividindo-os em classes distintas através dos padrões de expressão de vários biomarcadores, foi demonstrado que os CDI-SOE se distribuem igualmente entre os subgrupos (ABD EL-REHIM *et al*, 2005).

Estudos relatam que 5,4% a 7,7% dos carcinomas lobulares invasores de padrão clássico exibem imunorreatividade para CK basais (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; PIEKARSKI *et al*, 2006). Fadare *et al* (2008), em uma série de 82 casos de carcinomas lobulares invasores, todos E-caderina-negativos, identificaram positividade para CK5/6 em 14 (17%) tumores. Outro trabalho demonstrou não haver associação estatisticamente significativa entre tipo histológico (ductal *versus* lobular) e a expressão de marcadores basais, como CK5/6 e P-caderina (COLLETT *et al*, 2005).

O carcinoma medular da mama é um tipo histológico raro, de alto grau e bom prognóstico, sendo mais freqüente em pacientes com câncer hereditário, portadoras de mutações do gene BRCA1 (RIDOLFI *et al*, 1977). Jacquemier *et al* (2005) demonstraram, através de análise multivariada com regressão logística, que os carcinomas medulares puros ou típicos poderiam ser mais facilmente diagnosticados pela associação da expressão de P-caderina, MIB1 maior que 50%, negatividade para HER2 e positividade para p53, ressaltando que 50% dos tumores rigorosamente classificados como medulares nesta série exibiram diferenciação basal/mioepitelial. Rakha *et al* (2006b) demonstraram que 5,8% dos tumores basais são carcinomas medulares. Outros trabalhos mostraram que proporções significativas dos carcinomas medulares típicos e atípicos (carcinoma medular variante) expressam CK basais (JACQUEMIER *et al*, 2005; KIM *et al*, 2006; RODRÍGUEZ-PINILLA *et al*, 2007a; TOT *et al*, 2000). Tot *et al* (2000) relataram que 12% dos carcinomas medulares são imunorreativos para CK14, enquanto que 25% dos carcinomas medulares típicos e 43% dos atípicos expressam CK5/6. Posteriormente, Bertucci *et al* (2006), empregando microarranjos de oligonucleotídeos e comparando os perfis de expressão gênica de carcinomas medulares e CDI-SOE de alto grau, demonstraram que os primeiros constituem um grupo menos heterogêneo que os últimos. Enquanto todas as subclasses moleculares foram representadas no grupo dos CDI-SOE, 95% dos carcinomas medulares exibiram perfil basal. Além disto, os carcinomas medulares de tipo basal apresentaram perfis gênicos diferentes dos CDI basais, com superexpressão de genes envolvidos na diferenciação para músculo liso,

sugerindo que estes tumores seriam um subgrupo distinto de tumores basais com diferenciação mioepitelial.

A maioria dos carcinomas tradicionalmente relacionados à diferenciação mioepitelial (carcinoma mioepitelial, carcinoma adenoescamoso de baixo grau e carcinoma adenóide cístico) expressam CK basais, além de geralmente serem triplo-negativos (FADARE & TAVASSOLI, 2007).

É relevante ainda destacar que cerca de 30% a 75% dos carcinomas metaplásicos da mama apresentam fenótipo basal (LEIBL *et al*, 2005; MCCARTHY *et al*, 2007; REIS-FILHO *et al*, 2005; REIS-FILHO *et al*, 2006), detectando-se a expressão de diversos marcadores, como p63, P-caderina, actina, EGFR, CK14 e CK5 (BOSSUYT *et al*, 2005; KIM *et al*, 2006; LEIBL *et al*, 2005; REIS-FILHO *et al*, 2005; REIS-FILHO *et al*, 2006). Reis-Filho *et al* (2006) aplicaram o painel imunoistoquímico proposto por Nielsen *et al* (2004) em 65 casos de carcinomas metaplásicos e demonstraram que 91% dos tumores apresentavam fenótipo basal, independente do tipo de seus elementos metaplásicos. Bossuyt *et al* (2005) detectaram imunopositividade para EGFR em 34 de 39 carcinomas com diferenciação escamosa (87%). Em uma série de CDI-SOE de alto grau, Fulford *et al* (2006) demonstraram que a presença de células fusiformes e metaplasia escamosa é um fator preditor independente para o fenótipo basal, definido pela expressão de CK14.

Outros tipos histológicos mais raros que podem expressar marcadores basais incluem os carcinomas papilífero invasor (43%), cribriforme invasor (7,7%), tubular (4,2%) e mucinoso (21%), entre outros (KIM *et al*, 2006; RAKHA *et al* 2006b).

3.5.5- Grau histológico

Vários trabalhos, tanto empregando perfis de expressão gênica quanto protéica, mostraram que os tumores de tipo basal apresentam predominantemente alto grau histológico e observaram que CDI-SOE positivos para marcadores basais são significativamente mais propensos a serem pouco diferenciados ou de grau III (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; FOULKES *et al*, 2004; LIVASY *et al* 2006; RAKHA *et al*, 2006; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005; KIM *et al*, 2006; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2007a; LAAKSO *et al*, 2005). Entretanto ainda não há estudos suficientes para determinar se o grau histológico se correlaciona com o fenótipo basal em outros tipos histológicos, e se o perfil gênico do subgrupo basal, por si só, provê informações prognósticas, independentemente do grau histológico (FADARE & TAVASSOLI, 2007).

3.6- Imunofenótipo

Os carcinomas de tipo basal, como descrito anteriormente, são freqüentemente, mas não invariavelmente, tumores triplo-negativos, ou seja, são negativos para receptores de estrógeno, receptores de progesterona e HER2 (LIVASY *et al*, 2006; RAKHA *et al*, 2007a). Observa-se ainda imunorreatividade para CK de alto peso molecular, as chamadas CK basais, tais como CK5, CK5/6, CK14 e CK17 (ABD EL-REHIM *et al*, 2005; ARNES *et al*, 2005; BANERJEE *et al*,

2006; FOULKES *et al*, 2004; KIM *et al*, 2006; LAAKSO *et al*, 2005; MATOS *et al*, 2005; NILSEN *et al*, 2004; RAKHA *et al*, 2006a; RAKHA *et al*, 2006b; RAKHA *et al*, 2007b; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006; SIZIOPIKOU *et al*, 2007; VAN DE RIJN *et al*, 2002). Além da expressão de CK basais, também foi descrita, em diferentes proporções, positividade para p63, P-caderina, EGFR (HER1) e c-kit (ARNES *et al*, 2005, KIM *et al*, 2006; MATOS *et al*, 2005; NILSEN *et al*, 2004; RAKHA *et al*, 2007b; REIS-FILHO *et al*, 2005; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006). A positividade para EGFR tem sido consistentemente demonstrada em diferentes trabalhos, com elevadas proporções, que variam de 40% a 70% dos casos (KIM *et al*, 2006; NILSEN *et al*, 2004; REIS-FILHO *et al*, 2005; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006). Estes tumores mostram ainda mutações do gene TP53 ou expressão imunohistoquímica de p53 em até 85% dos casos (CALZA *et al*, 2006; CAREY *et al*, 2006; KIM *et al*, 2006; SORLIE *et al*, 2001). Alguns autores relatam que carcinomas basais podem expressar CK luminiais, como CK7/8, CK8/18 e CK19, em 62% a 98% dos casos, sendo referidos como carcinomas basais mistos (ABD EL-REHIM *et al*, 2004; KIM *et al*, 2006; LIVASY *et al*, 2006). Há ainda autores que reportam a coexpressão de CK5/6 e HER2 (em até 24% dos casos), por vezes se referindo a estes tumores como carcinomas basoluminais (KORSCHING *et al*, 2008; KUSINSKA *et al*, 2005; MATOS *et al*, 2005). Outras proteínas encontradas em cerca de 20% a 35% dos casos de tumores basais incluem a laminina (RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2007b), vimentina (LIVASY *et al*, 2006; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2007b), SMA (LIVASY *et al*, 2006), E-caderina (RAKHA *et al*, 2006), ciclina E (FOULKES *et al*, 2004; POTEMSKI *et al*, 2005),

fascina (RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006), maspina (REIS-FILHO *et al*, 2005), nestina (LI *et al*, 2007), VEGF (RIBEIRO-SILVA *et al*, 2006), BRCA-1 (RAKHA *et al*, 2006b; RAKHA *et al*, 2007b; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005), caveolina 1 (PINILLA *et al*, 2006; SAVAGE *et al*, 2007) e caveolina 2 (SAVAGE *et al*, 2007).

O papel da caveolina, um componente estrutural, no câncer de mama é controverso, embora a maioria dos trabalhos sugira que funcione como um gene supressor tumoral. É expressa, na mama normal, pelas células mioepiteliais e endoteliais, fibroblastos e adipócitos. No câncer de mama, a caveolina 2 foi observada em 9,6% dos casos, e esteve relacionada com alto grau histológico, elevada taxa proliferativa, negatividade para receptores hormonais e imunorreatividade para EGFR, p53 e marcadores basais. A expressão de caveolina 2 foi significativamente associada ao imunofenótipo basal e a pior prognóstico (SAVAGE *et al*, 2007). De forma semelhante, identificou-se expressão de caveolina 1 em 9,4% de carcinomas mamários invasores, sendo demonstrada forte associação com o fenótipo basal, notando-se que 52% dos tumores positivos para tal marcador eram basais (PINILLA *et al*, 2006; SAVAGE *et al*, 2007).

BRCA1 é um gene supressor tumoral que, ao sofrer mutações, está associado ao desenvolvimento do câncer de mama hereditário e corresponde a cerca de 10% dos casos diagnosticados. Carcinomas relacionados a mutações de BRCA1 tendem a apresentar alto grau histológico, características medulares, negatividade para receptores hormonais e HER2, positividade para p53, ausência de metástases axilares e pior prognóstico (FOULKES *et al*, 2004). Recentemente, demonstrou-se que a maioria destes tumores exibem fenótipo basal, detectando-se expressão de CK5, CK5/6, CK14 e P-caderina (ARNES *et al*, 2005; FOULKES

et al, 2004; LAAKSO *et al*, 2005; PALACIOS *et al*, 2005; RIBEIRO-SILVA *et al*, 2005; TURNER *et al*, 2007). Em tumores esporádicos, embora mutações gênicas sejam raras, a perda da função protéica do BRCA1 parece ser importante, tanto pela redução de sua expressão como por localização subcelular incorreta, sugerindo o seu envolvimento na patogênese destes tumores, incluindo os carcinomas de tipo basal (RAKHA *et al*, 2008e). Turner *et al* (2007) mostraram elevada prevalência de disfunção de BRCA1 em carcinomas basais esporádicos, por redução significativa da expressão de seu RNA mensageiro e por aumento dos níveis de ID4, um inibidor de BRCA1. A localização subcelular do BRCA1 pode ser nuclear, em invaginações citoplasmáticas para o núcleo, ou localização citoplasmática anormal. Este padrão de expressão variável pode refletir em diferenças na especificidade dos anticorpos e nos métodos imunoistoquímicos empregados. Avaliando a expressão imunoistoquímica de BRCA1 em 1940 casos de carcinomas mamários invasores, Rakha *et al* (2008e) identificou que a redução ou ausência da expressão nuclear de BRCA1 foi mais frequente em CDI-SOE e em carcinomas medulares, estando também associada a alto grau histológico, *status* linfonodal avançado, invasão vascular, receptores hormonais negativos, positividade para p53 e para marcadores basais (CK5/6, CK14, EGFR e p-caderina), e menor sobrevida. A expressão citoplasmática de BRCA1 se correlacionou com maior taxa de recorrências e com positividade para EGFR.

Enfim, além dos marcadores definidores, grande variedade de proteínas têm sido demonstradas nos tumores basais através de estudos imunoistoquímicos, alguns deles indicando graus variáveis de diferenciação mesenquimal, mioepitelial e/ou basal. Embora sejam inespecíficas, estas proteínas podem contribuir para

elucidar a patogênese dos carcinomas de tipo basal, estabelecer seu diagnóstico e classificação, e funcionar como alvos terapêuticos potenciais.

3.7- Implicações terapêuticas

Carcinomas de tipo basal são geralmente tumores de alto grau, linfonodo-negativos e que não expressam RE, RP e HER2. Tal fenótipo traz dilemas terapêuticos importantes, especialmente tendo conhecimento que parte dos pacientes evoluirão com recidiva precoce e morte em decorrência de doença metastática. Agentes anti-estrogênicos e transtuzumab (Herceptin) não são opção para estes pacientes e, atualmente, quimioterapia e radioterapia para controles sistêmico e local representam as únicas alternativas disponíveis. Entretanto, a escolha do melhor esquema quimioterápico permanece indefinida para pacientes portadoras de TTN.

Diferentes estudos mostram que várias características dos tumores basais estão classicamente relacionadas a boa resposta clínica e patológica à quimioterapia neoadjuvante, como negatividade para RE e elevada taxa proliferativa (CLEATOR *et al*, 2002; GUARNERI *et al*, 2006). No entanto há poucos trabalhos avaliando a eficácia da quimioterapia em pacientes com tumores basais. Em um estudo prospectivo, Rouzier *et al* (2005) demonstraram resposta completa de 45% ao tratamento com paclitaxel e doxorrubicina nos carcinomas de tipo basal. Banerjee *et al* (2006), por outro lado, observaram que quimioterapia adjuvante com derivados da antraciclina não foi tão eficaz nos tumores basais quanto naqueles não basais. Um estudo recente relatou baixa taxa de resposta

dos carcinomas basais à terapia adjuvante com docetaxel, adriamicina e ciclofosfamida (CAREY *et al*, 2007).

Foram identificados vários alvos terapêuticos potenciais nos tumores basais, como o EGFR, HER3, HER4, c-kit, entre outros (RAKHA *et al*, 2008f). Entre os fármacos aprovados para a inibição do EGFR estão o anticorpo monoclonal contra o seu domínio extracelular, como o cetuximab, e os inibidores da atividade tirosina-quinase do receptor, como o gefitinib, erlotinib, e mais recentemente o lapatinib, que atua sobre o EGFR e o HER2 (KATZ *et al*, 2007). Entretanto estas drogas apenas foram testadas e bem sucedidas para outros tumores, sendo que seu uso ainda não foi validado para o tratamento do câncer de mama (MENDELSON *et al*, 2006). Ensaios clínicos já estão em andamento para avaliar a eficácia dos agentes anti-EGFR (cetuximab isolado ou combinado com quimioterapia) no tratamento dos carcinomas de tipo basal. Apesar de haver expressão de c-KIT em grande proporção de tumores basais, mutações ativadas do gene KIT não são encontradas nestes tumores. Uma vez que estas mutações são o principal preditor de resposta aos inibidores do receptor tirosina-quinase tipo III, como o imatinib, ainda não se sabe se estas drogas podem trazer benefícios ao tratamento do câncer de mama (RAKHA *et al*, 2008f).

Devido à sobreposição entre o câncer associado ao BRCA1 e os carcinomas basais, é lógico pensar que as opções terapêuticas para o primeiro poderiam ser úteis para os tumores de tipo basal. Os defeitos de reparo do DNA observados nos carcinomas hereditários contribuem para maior sensibilidade a esquemas quimioterápicos com derivados de antraciclinas, sais de platina ou inibidores da PARP (polimerase de poli-ADP-ribose), levantando a possibilidade de que os

tumores basais possam ser mais sensíveis a certos agentes quimioterápicos (CHAPPUIS *et al*, 2002; DA SILVA *et al*, 2007; JAMES *et al*, 2007; KORSCHING *et al*, 2008; RAKHA *et al*, 2008f; TURNER *et al*, 2007).

Embora haja relatos de que os tumores de tipo basal possam apresentar melhor resposta à quimioterapia convencional (CAREY *et al*, 2007; DIALLO-DANEBOCK *et al*, 2007), o fenótipo basal parece não ser um fator preditivo independente de resposta terapêutica, após se levar em conta a contribuição de outros aspectos, como alto grau histológico, elevada taxa proliferativa e negatividade para RE e RP (ROUZIER *et al*, 2005). Investigações futuras são necessárias para determinar se estratégias terapêuticas mais agressivas poderiam melhorar a evolução destes pacientes, assim como definir quais dos esquemas terapêuticos disponíveis na atualidade seria o mais benéfico.

4- MICROARRANJOS DE TECIDO (*TISSUE MICROARRAYS*)

A técnica de *tissue microarrays* (TMA) permite a análise retrospectiva em larga escala da expressão protéica dos tumores através da imunistoquímica, sendo possível conhecer a expressão de uma determinada proteína em até 1000 casos diferentes em apenas uma lâmina histológica. Esta técnica apresenta acurácia comprovada que justifica seu emprego com amplas vantagens de custo e tempo para os estudos retrospectivos de grandes centros ou estudos cooperativos com grandes bancos de dados (BUBENDORF, *et al*, 2001; MILANES – YEARSLEY, *et al*, 2002; SAPINO *et al*, 2006).

Em 1986, Battifora *et al* desenvolveram a técnica do *sausage ou multi-tissue tumor block* (MTTB), onde tecidos diferentes eram processados juntos em um mesmo bloco de parafina de modo aleatório e não ordenado. Esses blocos eram utilizados para teste de novos anticorpos e como controle de qualidade das reações imunoistoquímicas. Kononen *et al* (1998) aprimoraram a técnica de Battifora: cilindros de amostras eram retiradas de tecidos de blocos de parafina pré-existentes e reembebidos em um novo bloco de forma ordenada, com coordenadas pré-estabelecidas, tamanhos e formas regulares. Essa técnica apresentou a vantagem de todas as amostras serem processadas em um mesmo momento e em condições idênticas. E ainda preserva o material remanescente para outras pesquisas ou necessidades diagnósticas.

4.1- Construção dos TMA

Para a construção dos TMA o patologista estuda as lâminas originais e seleciona as áreas de interesse que melhor representem o tumor. A seguir as áreas selecionadas são identificadas nos blocos de parafina arquivados (bloco doador) e um ou mais cilindros de tecido (que podem variar de 0,6mm a 2,0mm de diâmetro e 3 a 4 mm de comprimento) são retirados da(s) área(s) escolhida(s) com uma agulha acoplada a um equipamento de precisão. Este cilindro é então introduzido em um novo bloco (bloco receptor), previamente preparado com orifícios cilíndricos vazios. Os cilindros dos vários casos são sucessivamente adicionados ao bloco receptor, manualmente ou com a ajuda de aparelhos específicos, e a posição de cada caso é identificada em uma planilha com

referências de coluna e linha (eixos X e Y). Ao fim, obtém-se um bloco receptor que pode conter até 1000 amostras diferentes. Deste bloco são obtidos cortes histológicos seqüenciais numerados em lâminas tratadas com adesivo que permitem a realização de reações imunoistoquímicas. A leitura das lâminas dos TMA pode ser feita em microscopia óptica convencional pelo patologista, seguindo a planilha previamente preparada com as coordenadas X e Y, anotando os resultados encontrados em papel ou diretamente na base de dados do computador. Vários grupos desenvolveram métodos de arquivo digital de imagens com softwares de captura de imagens, interpretação e armazenamento automatizado dos dados, permitindo rápida correlação entre os dados armazenados previamente e os resultados obtidos, revisão das imagens, quando necessário, estudos comparativos de reprodutibilidade, etc. (LIU *et al*, 2002; MANLEY *et al*, 2001).

4.2- TMA e câncer de mama

Os estudos para validação do método de TMA no câncer de mama demonstraram ser possível atingir 98% de concordância com as reações nos cortes histológicos usuais para marcadores imunoistoquímicos como o receptor de estrógeno e HER2, utilizando-se três amostras de 0,6mm de diâmetro de cada caso. Quando se utilizaram apenas duas amostras a concordância obtida foi de 94% (CAMP *et al*, 2000; FEDOR & DE MARZO, 2005). Apesar da amostragem de mais de uma área nos carcinomas de mama ser importante para que nos TMA estejam representadas toda a heterogeneidade destes tumores, estudos recentes

mostraram alta concordância entre uma amostra de 0,6mm ou 2,0mm e os cortes habituais do bloco doador (SELVARAJAN *et al*, 2006). Assim, trabalhos de outros autores e de nosso laboratório mostram que amostras de TMA são adequadas e equivalentes às amostras de cortes histológicos convencionais para avaliação de marcadores em câncer de mama (ROCHA *et al*, 2006; SELVARAJAN *et al*, 2006).

5- JUSTIFICATIVA DO TRABALHO

Há raros estudos com casuísticas brasileiras avaliando a frequência de carcinomas mamários de tipo basal em mulheres brasileiras, assim como a expressão de diferentes marcadores nestes tumores e a evolução clínica das pacientes. No entanto, estes trabalhos não analisaram diferenças raciais ou determinaram a frequência do fenótipo basal dentre os tumores triplo-negativos. A população brasileira é muito heterogênea devido ao tipo de colonização. O Brasil acolheu imigrantes oriundos de três continentes principais: europeus, africanos e ameríndios. Diferente dos EUA, no Brasil, após cinco séculos de mistura étnica destes três grupos, torna-se inviável correlacionar a cor da pele à ancestralidade. É possível que variações significativas de comportamento biológico dos tumores basais, como a verificada em diferentes grupos étnicos menos miscigenados, não sejam tão nítidas em mulheres brasileiras devido à nossa heterogênea ancestralidade genômica.

A partir desta revisão da literatura abordando os diferentes aspectos dos carcinomas mamários de fenótipo basal formulamos as seguintes perguntas:

1- Qual é a frequência de tumores triplo-negativos em carcinomas mamários invasores de mulheres brasileiras?

2- Qual é a frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal dentre os tumores triplo-negativos?

3- Quais os marcadores imunoistoquímicos associados ao fenótipo basal seriam observados em uma série de tumores triplo-negativos? E qual seria o marcador mais frequente?

4- Quais as principais características morfológicas dos tumores basais?

5- Considerando a maior prevalência e pior prognóstico dos carcinomas de fenótipo basal em mulheres jovens e afro-americanas, em uma população miscigenada como a do Brasil estes tumores apresentariam comportamento biológico adverso como descrito na literatura?

6- Estes tumores seriam mais frequentes em mulheres na pré-menopausa?

7- Analisando a cor da pele, haveria diferenças significativas na sobrevida das pacientes de diferentes grupos, como a que foi observada na população norte-americana?

OBJETIVOS

Os objetivos deste trabalho são:

- 1- Identificar a frequência de carcinomas mamários invasores triplo-negativos em uma série de casos de mulheres brasileiras cujos tumores foram submetidos a imunoistoquímica;
- 2- Avaliar a frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal dentre tumores triplo-negativos;
- 3- Estudar as características imunofenóticas dos tumores triplo-negativos, avaliando a expressão dos marcadores do fenótipo basal e de outros marcadores associados a estes tumores;
- 4- Analisar as características clínicas dos pacientes e estadio da doença no momento do diagnóstico inicial;
- 5- Avaliar os aspectos anátomo-patológicos dos carcinomas de fenótipo basal;
- 6- Relacionar o prognóstico de pacientes com tumores basais com o seu *status* menopausal e seu grupo étnico.

MATERIAIS E MÉTODOS

Selecionamos para este estudo todos os casos de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico (mastectomia; quadrantectomia; setorectomia ou tumorectomia) no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) no período de 2001 a 2006 para tratamento de carcinoma mamário e cujos tumores foram submetidos a IIQ para avaliação de fatores preditivos no Laboratório de Patologia Mamária do Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da UFMG. Incluímos ainda casos de tumores mamários examinados no Departamento de Patologia do Hospital do Câncer/A.C. Camargo de São Paulo. Selecionamos todos os casos cujos laudos imunoistoquímicos revelaram negatividade para receptores hormonais (RE e RP) e HER2 (tumores triplo-negativos), no exame original dos dois serviços. Assim, para a inclusão neste estudo, os casos preencheram os seguintes requisitos:

- 1- Ter diagnóstico histológico original de carcinoma mamário invasor;
- 2- Ter testes imunoistoquímicos prévios revelando negatividade para RE, RP e HER2;
- 3- Ter disponibilidade de lâminas e blocos de parafina do tumor para reavaliação histológica e novo estudo imunoistoquímico.

1- DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos analisados neste estudo foram obtidos a partir das requisições de exames histopatológicos arquivados no Laboratório de Patologia Mamária e de pesquisa nos prontuários médicos dos pacientes, arquivados no Serviço de Arquivo Médico do Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG). Também foram coletados dados dos arquivos médicos do Departamento de Patologia do Hospital do Câncer/A.C.Camargo, para os casos provenientes deste serviço. Foram obtidos os seguintes dados: nome da paciente; registro geral; ano da biópsia; data do diagnóstico inicial e da última consulta e/ou óbito; idade ao diagnóstico inicial; cor da pele (branca, negra, parda ou amarela); período reprodutivo (pré ou pós-menopausa); história familiar para câncer de mama; tratamentos complementares (hormonioterapia, quimioterapia, radioterapia); recidivas (data e local); tempo de seguimento clínico.

2- ESTUDO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

2.1- Dados anátomo-patológicos dos laudos originais

Os dados foram obtidos dos laudos anátomo-patológicos e/ou relatórios prévios arquivados nos referidos serviços de Patologia, sendo coletados: tamanho do tumor, tipo histológico, formação tubular, grau nuclear, índice mitótico, grau histológico, *status* linfonodal e estadiamento anátomo-patológico.

A classificação do tumor com relação ao tamanho foi efetuada tendo como base o sistema TNM, considerando-se a dimensão descrita no laudo original, onde:

- Tx – dado não disponível;
- T0 – sem evidência de tumor;
- T1 – tumor menor ou igual a 2 cm;
- T2 – tumor de 2 a 5 cm;
- T3 – tumor maior que 5 cm.

2.2- Revisão histopatológica

Todas as lâminas originais coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE), referentes aos casos selecionados, foram reavaliadas pela mesma patologista (MDBA). A revisão histopatológica incluiu reavaliação do tipo e grau histológicos dos tumores. Os casos cujas amostras exibiram artefatos de autólise ou sinais de processamento inadequado foram excluídos do estudo, uma vez que a má qualidade do tecido fixado indica a possibilidade de má conservação dos antígenos tumorais e, conseqüentemente, afeta a fidedignidade das reações imunoistoquímicas.

2.2.1- Classificação histológica

Para a classificação dos tumores quanto ao tipo histológico, foram empregadas as recomendações de PAGE *et al* (1998), adotadas pelo Colégio Americano de

Patologia (FITZGIBBONS *et al*, 2000), onde os carcinomas são divididos em ductal sem outra especificação (SOE), tipo “especial puro” e tipo “especial variante”. Se o tumor não apresenta nenhuma característica histológica especial, ele é considerado carcinoma ductal invasor SOE. Para ser referido como tipo “especial puro”, o carcinoma deve exibir características específicas em mais de 90% do tumor. Caso contenha tais características em 75% a 90% do carcinoma, este é classificado como tipo “especial variante”. Foram adotados critérios rígidos para a classificação dos tipos especiais de câncer de mama, com definições próprias para cada subtipo (FIG.1), como preconizado por ELSTON & ELLIS (1998).

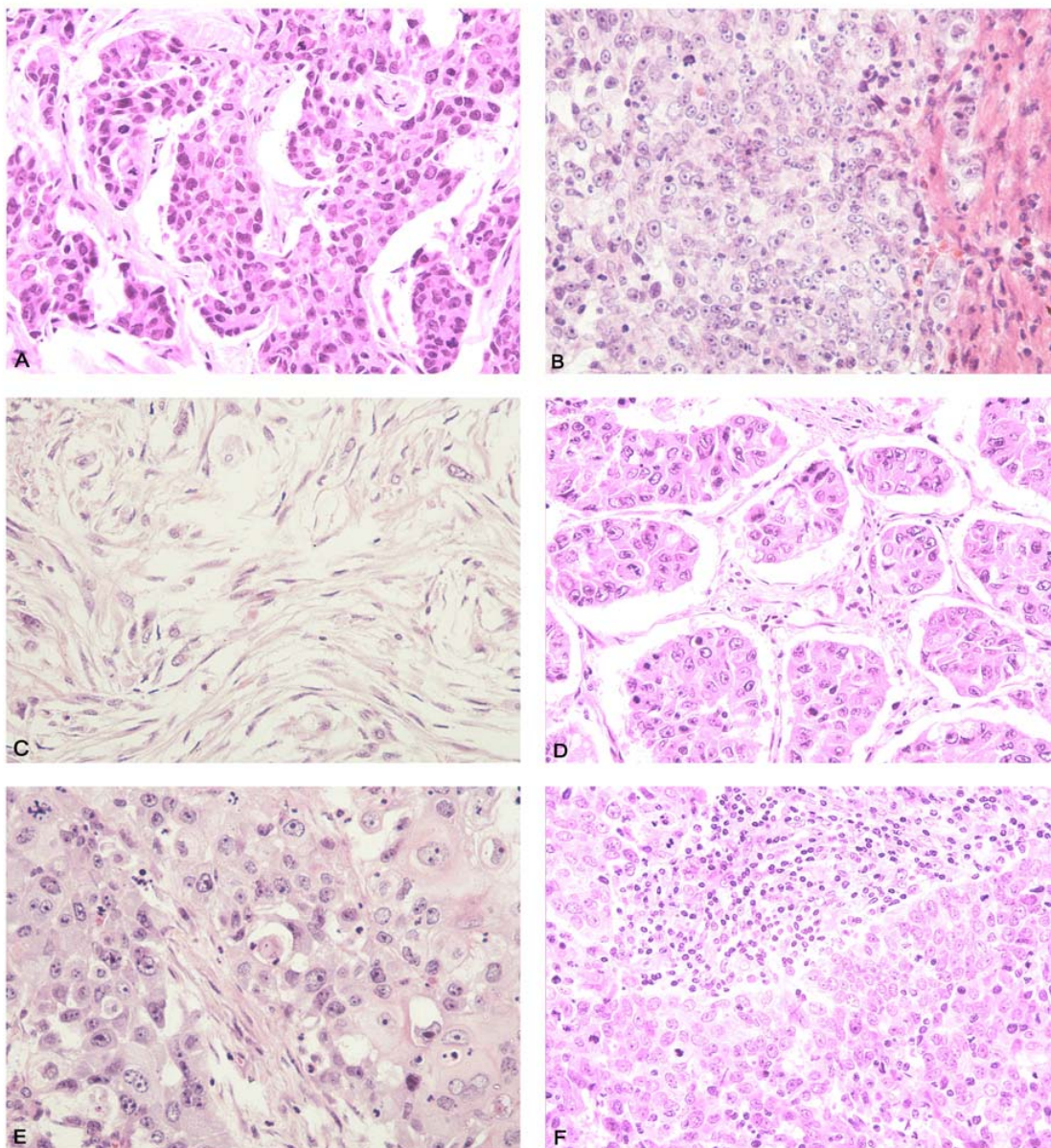


FIGURA 1 – Diferentes tipos histológicos de tumores mamários invasores, em cortes corados pelo método de HE (400X). Carcinoma ductal invasor SOE pouco diferenciado (A); Carcinoma medular (B); Carcinoma metaplásico (C); Carcinoma micropapilar (D); Carcinoma apócrino (E); Carcinoma medular atípico (F).

2.2.2- Graduação histológica

Para a avaliação do grau histológico, utilizamos o Sistema de Nottingham (ELSTON e ELLIS, 1998), onde o tumor é classificado como bem diferenciado (baixo grau ou grau I), moderadamente diferenciado (grau intermediário ou grau II) ou pouco diferenciado (alto grau ou grau III). Estas categorias são avaliadas através de notas atribuídos a três fatores (formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica), os quais geram valores de 1 a 3 que somados, resultam em um *score* final de 3 a 9.

A formação tubular é examinada segundo critérios objetivos, sendo considerados túbulos somente as estruturas com lúmen central bem definido. Quando mais de 75% do tumor examinado é composto por túbulos, considera-se o *score* 1; *score* 2 é atribuído a tumores com formação de 10% a 75% de túbulos; e *score* 3 quando há menos de 10% de formação tubular.

Em relação ao pleomorfismo nuclear, os valores também variam de 1 a 3. Com o intuito de reduzir a subjetividade, as células neoplásicas são comparadas com as células epiteliais normais do parênquima adjacente ao tumor. Na ausência de epitélio normal, a comparação é feita com linfócitos.

Para a avaliação do índice mitótico, a dimensão do campo microscópico é fundamental e neste estudo o campo microscópico utilizado foi de 0,45mm. A contagem de figuras de mitose é efetuada na periferia do tumor, escolhendo-se a área de maior atividade proliferativa da neoplasia (“área quente” ou *hot spot*), sendo examinados 10 campos microscópicos consecutivos de grande aumento (objetiva de 40x). Atribui-se o valor 1 quando até 5 mitoses são encontradas em

10 campos de grande aumento (*high power fields* ou HPF), valor 2 entre 6 e 10 mitoses por 10 HPF, e valor 3 se há mais de 11 mitoses por 10 HPF.

Após avaliação individual de cada fator, os valores atribuídos a cada item são somados, obtendo-se números de 3 a 9. O tumor é classificado como grau I quando a soma dos valores é de 3, 4 e 5; grau II, com os valores 6 e 7; e grau III, se os valores são 8 e 9 (Quadro 1).

QUADRO 1 - Sistema de graduação histológica dos tumores da mama segundo ELSTON & ELLIS, 1991*

Parâmetro	Graduação
Formação tubular	Pontuação 1: > 75% da área tumoral Pontuação 2: entre 10-75% da área tumoral Pontuação 3: < 10% da área tumoral
Atipia nuclear	Pontuação 1: tamanho nuclear semelhante à célula ductal normal (2-3 vezes o tamanho de uma hemácia) Pontuação 2: núcleos de tamanho intermediário Pontuação 3: núcleos grandes e pleomórficos, geralmente com nucléolos proeminentes
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)

3- ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.1- Construção do TMA

A partir das lâminas originais coradas pelo método da hematoxilina-eosina, duas áreas mais representativas e mais preservadas do tumor foram marcadas. Os blocos de parafina referentes aos casos selecionados foram utilizados como “blocos doadores”, a partir dos quais foram retirados dois cilindros de tecido das áreas previamente marcadas. Os cilindros obtidos foram colocados em um bloco receptor, organizados em coordenadas definidas em uma planilha, permitindo a identificação precisa de cada amostra. O diâmetro de cada disco de tecido foi de 1mm, de modo que o microarranjo de tecido confeccionado contém cilindros com amostras representativas de todos os tumores selecionados.

A montagem do TMA foi realizada utilizando-se um equipamento manual, da marca *Beecher Instruments*®. Foi utilizada fita adesiva (*Instrumedics*®, Hackensack, New Jersey) para auxiliar a transferência dos cortes de tecido para as lâminas, evitando que os discos de tecido se soltassem.

3.2- Reações imunoistoquímicas

Lâminas contendo cortes seqüenciais do TMA foram coradas para RE, RP e HER2 para confirmação do diagnóstico de triplo-negativo. Em lâminas seqüenciais, foram aplicados anticorpos dirigidos aos marcadores de diferenciação basal (CK5 e CK14), e também outros marcadores, como EGFR,

p63, caveolina, BRCA1 e p53 (TAB.1). O sistema de detecção da reação utilizado foi o *Novolink Max Polymer*® (Novocastra- Biosystems, UK), sistema de amplificação do polímero não biotilado (Anexo 3).

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

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante/País	Recuperação antigênica
RE	6F11	1: 1.000	Novocastra, RU	Steamer/Citrato pH 6,0
RP	PGr312	1: 1.000	Novocastra, RU	Steamer/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	4A4	1: 2.000	DAKO,EUA	Banho maria /EDTA/TRIS pH9,0
Caveolina	E-249	1:500	Epitomics,EUA	Pascal/Citrato pH6,0
BRCA1	GLK-2	1:300	DAKO,EUA	Pascal/Citrato pH6,0
p53	D0-7	1:2.000	DAKO,EUA	Panela de pressão/Citrato pH6,0

3.3- Leitura das lâminas do TMA

Todas as informações referentes a cada um dos cilindros que compuserem o TMA foram anotadas em planilhas construídas através do programa *Excel*, com a determinação prévia das coordenadas X e Y no bloco receptor correspondente. Esta documentação é de fundamental importância para a análise e interpretação dos resultados.

3.4- Avaliação e graduação das reações imunoistoquímicas

Na avaliação dos receptores de estrógeno e progesterona, foram considerados positivos os casos em que mais de 1% das células neoplásicas mostraram coloração nuclear moderada ou forte, sendo estes excluídos. Quando não se observou nenhuma coloração nuclear ou esta esteve presente em menos de 1 % das células, a pesquisa foi considerada negativa e o caso foi incluído no estudo. (GOLDHIRSCH *et al*, 2005; HARVEY *et al*, 1999).

Para a análise da superexpressão da proteína do HER2, a avaliação foi efetuada de acordo com o Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Sociedade Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF *et al*, 2007), como descrito a seguir (Quadro 2):

Pesquisa negativa: *score* 0 (ausência de marcação de membrana nas células neoplásicas) ou 1+ (coloração de membrana fraca e incompleta em qualquer proporção de células neoplásicas);

Pesquisa indeterminada: *score* 2+ (Coloração fraca, mas bem definida, envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática, em mais de 10% e menos de 30% das células neoplásicas);

Pesquisa positiva: *score* 3+ (presença de coloração de membrana completa em mais de 30% das células neoplásicas).

Apenas os casos negativos (*score* 0 e 1+) foram incluídos neste trabalho.

QUADRO 2 - Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Sociedade Americana de Oncologia e o CAP (WOLFF *et al*, 2007): coloração de membrana

Grau de interpretação	Achado microscópico
0 Negativo	Não identificada nenhuma coloração na membrana citoplasmática
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	Coloração forte envolvendo toda a circunferência da membrana citoplasmática em pelo menos 30% das células neoplásicas

Para os anticorpos CK5, CK14, EGFR e p63 (FIG.2), a imunorreatividade foi medida estimando-se a porcentagem de células neoplásicas que exibem coloração característica (coloração citoplasmática para CK5 e CK14, coloração de membrana para EGFR, e coloração nuclear para p63), sendo considerados

positivos os tumores que exibiram mais de 10% de células neoplásicas coradas (RAKHA *et al*, 2007b).

Na avaliação da caveolina empregamos o sistema de *scores* adotado por Savage *et al* (2007), que leva em consideração a distribuição e a intensidade da coloração, atribuindo-se notas de 0 a 4. Tumores com *score* final (soma dos *scores* da distribuição e da intensidade) maior ou igual a 4 são considerados positivos (FIG.2). A análise da distribuição e intensidade de células neoplásicas coradas (coloração de membrana, com ou sem coloração citoplasmática) é feita como descrito abaixo:

Distribuição:

0- <1% de células neoplásicas coradas;

1- 1% a <10% de células neoplásicas coradas;

2- ≥10 a <25% de células neoplásicas coradas;

3- ≥25% a <50% de células neoplásicas coradas;

4- ≥50% de células neoplásicas coradas.

Intensidade:

0- ausência de coloração nas células neoplásicas;

1- coloração de intensidade fraca;

2- coloração de intensidade moderada;

3- coloração de intensidade forte.

A intensidade da coloração das células neoplásicas é determinada por comparação com a expressão de caveolina nas células endoteliais normais.

Para a graduação do BRCA1, empregamos valor de corte semelhante ao adotado por Rakha *et al* (2008e), segundo os quais há positividade quando mais

de 5% das células neoplásicas apresentam coloração citoplasmática ou nuclear. Entretanto, as lâminas coradas para BRCA1 não foram consideradas adequadas para avaliação neste estudo. Após várias tentativas de padronizar a reação imunoistoquímica, verificamos marcação, tanto citoplasmática quanto nuclear, em todos os tumores e na amostra de fígado do TMA, com elevado *background*. Consequentemente, os resultados obtidos não foram contabilizados.

Considerou-se positiva a pesquisa de p53 (FIG.2) quando mais de 5 % das células neoplásicas exibiram coloração nuclear característica (RAKHA *et al*, 2007b).

Para classificar os tumores como basais, adotamos os critérios propostos por Rakha *et al* (2007b), que propuseram que a definição do fenótipo basal seja baseada apenas na expressão de CK basais (CK5 e/ou CK14), a despeito da expressão de outros marcadores.

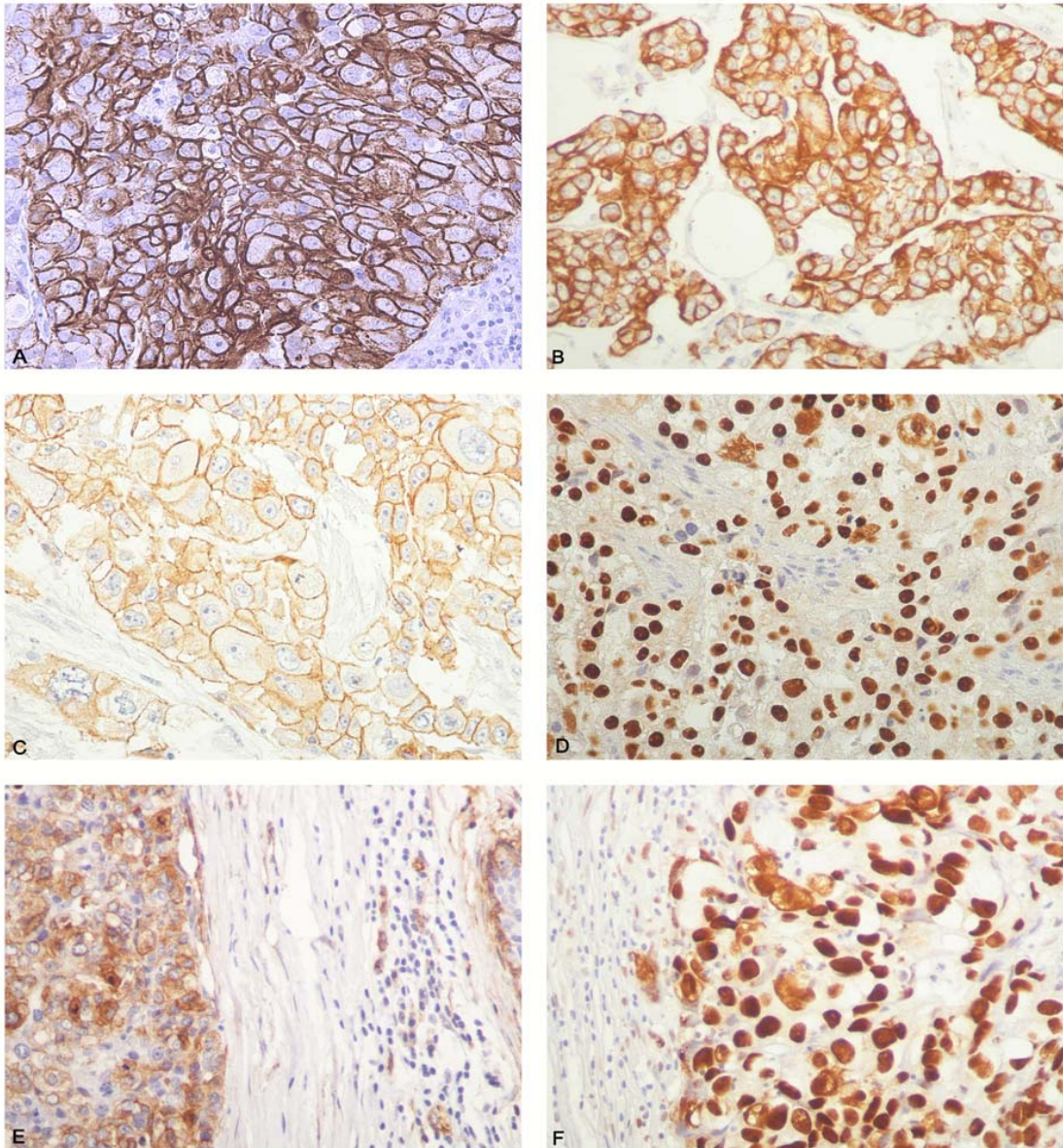


Figura 2 - Estudo imunoistoquímico de carcinomas mamários triplo-negativos com diferentes marcadores associados ao fenótipo basal (400X). Positividade para CK5 (A); CK14 (B); EGFR (C); p63 (D); Caveolina (E); e p53 (F).

4- ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para analisar a frequência do fenótipo basal e as variáveis clínicas e moleculares foram utilizados os programas Epi-Info[®] (versão 6.0) e MINITAB 14, aplicando-se os testes exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado.

Para verificar a associação das diferentes variáveis com a sobrevida das pacientes foi empregado o método de Kaplan-Meier. As curvas de sobrevida foram construídas e comparadas através dos testes de Log-rank e Wilcoxon, sendo posteriormente efetuada a análise por regressão linear multivariada pelo modelo semi-paramétrico de Cox (*software* R). Todas as variáveis estatisticamente significativas ($p < 0,05$) na análise univariada entraram na regressão.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os maior parte dos resultados obtidos e discussão serão apresentados de forma alternativa, como artigo científico submetido a periódico. O artigo está estruturado com base nas normas do periódico a que foi submetido, e acompanhado da carta de submissão.

Após o artigo, apresentamos resultados adicionais (não incluídos no manuscrito devido ao número de páginas limitado, determinado pela RAMB), considerações finais, conclusões gerais que atendem aos objetivos propostos, lista de Referências Bibliográficas e Anexos.

1- ARTIGO

**Freqüência de Carciomas Mamários de Fenótipo Basal em Mulheres
Brasileiras**

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

Artigo Submetido SGP/ RAMB

sgp@ramb.org.br to me

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

São Paulo, terça-feira, 22 de abril de 2008

Ilmo(a) Sr.(a)

Prof(a), Dr(a) Marina De Brot

Referente ao código de fluxo: 429

Classificação: Artigos Originais

Informamos que recebemos o manuscrito Carcinomas mamários de fenótipo basal em mulheres brasileiras 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 »»»

Código de Fluxo: **429 (Revista da Associação Médica Brasileira)**

Carcinomas mamários de fenótipo basal em mulheres brasileiras

Basal-like breast cancers in Brazilian women

Autores

Marina De Brot : Médica especialista em Patologia e Mestranda em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG - Patologista do Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia Pittella & Andrade, Belo Horizonte, MG, Brasil

Fernando Augusto Soares: Doutor em Patologia Humana pela Universidade de São Paulo, USP - Professor titular da FMUSP, São Paulo, e Diretor do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, SP, Brasil

Mônica Maria Ágata Stiepcich: Doutora em Oncologia pelo curso de pós-graduação da Fundação Antônio Prudente do Hospital do Câncer A.C. Camargo - Patologista do Instituto Fleury, São Paulo, SP, Brasil

Vinícius S. Cúrcio: Aluno bolsista do Programa de Iniciação Científica do CNPq - Aluno do curso de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil

Helenice Gobbi: Doutora em Patologia pela Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG - Professora Associada da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, UFMG, Brasil

Descritores (Palavras-chave)

Câncer de mama, Tumores triplo-negativos, Fenótipo basal, Imunoistoquímica, Sobrevida

Keywords

Breast cancer, Triple-negative tumors, Basal-like breast cancers, Immunohistochemistry, Survival

Resumo

Objetivo: Investigar a frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal em uma série de tumores triplo-negativos (TTN), definidos pela negatividade para receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP), e HER2. **Métodos:** Selecionamos 140 TTN, obtendo-se características clínico-patológicas e sobrevida. Microarranjo de tecido (2 cilindros de cada tumor) foi construído e submetido à imunoistoquímica para RE, RP, HER2, citoqueratinas (CK) 5 e 14, EGFR, p63 e

Abstract

Background: The aim of our study was to investigate basal phenotype in a series of triple-negative (estrogen and progesterone receptors-negative and HER2-negative) invasive mammary carcinomas. **Methods:** We selected 140 previously tested triple-negative tumors. Clinical, histopathological and survival data were obtained. A tissue microarray containing 2 cylinders from each tumor was constructed and immunohistochemistry for estrogen receptor (ER), progesterone receptor

p53. Consideramos carcinomas de fenótipo basal os tumores negativos para RE, RP e HER2, e positivos para CK5. Resultados: Encontramos 105 carcinomas de fenótipo basal entre 140 TTN (frequência=75,0%). A idade média das pacientes foi de 54,8 anos, sendo que 34,3% estavam na pré-menopausa. A maioria dos tumores foi classificada como carcinoma ductal invasor de alto grau. Os TTN exibiram positividade para CK5 (75,0%), CK14 (29,0%), EGFR (36,4%), p63 (28,6%) e p53 (67,1%). Estadiamento avançado da doença foi observado em 52 pacientes (50,0%), com diâmetro tumoral maior que 5 cm em 41 casos (39,0%) e metástases axilares em 61 casos (59,2%). Seguimento clínico foi obtido em 89 pacientes (média=51 meses). Destas, 45 pacientes (50,5%) evoluíram sem doença; 6 (6,7%) estavam vivas com doença; e 38 (42,6%) morreram pelo câncer. Recidiva sistêmica ocorreu em 42 pacientes (47,1%), sendo pulmões, cérebro e ossos os principais sítios de metástases. As médias das sobrevividas global e livre de doença foram de 36 e 28 meses, respectivamente. Conclusões: Nosso estudo confirma comportamento clínico agressivo e elevada frequência dos carcinomas de fenótipo basal entre os TTN, semelhante ao descrito em casuísticas norte-americanas e européias.

(PR), HER2, cytokeratins (CK) 5 and 14, EGFR, p63, and p53 was performed. We considered basal like-cancers (BLC) those tumors that were ER/PR/HER2-negative and CK5-positive. Results: We found 105 cases of BLC from 140 triple-negative tumors (frequency=75.0%). The mean age at diagnosis was 54.8 years-old and 34.3% were premenopausal women. The majority of tumors were high grade (83.7%) and of ductal/no-special-type (80.8%). Triple-negative tumors showed immunoreactivity for CK5 (75.0%), CK14 (29.0%), EGFR (28.6%), p63 (28.6%), and p53 (67.1%). Tumor size larger than 5cm was observed in 41 cases (39.0%) and axillary metastasis were detected in 61 patients (59.2%). Follow-up was recorded for 89 patients (mean=51 months): 45 patients (50.5%) with no evidence of disease; 6 patients (6.7%) were alive with disease; and 38 patients (42.6%) died of the disease. Relapse was detected in 42 women (47.1%), being lungs, brain, and bones the most common sites of metastasis. The mean overall survival was 36 months and the mean disease-free interval was 28 months. Conclusions: Our findings confirmed that BLC are poor prognosis and high-frequent carcinomas among triple-negative tumors, similar to the behavior previously reported in North American and European patients.

Trabalho submetido em 22/4/2008 14:59:12

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

Suporte Financeiro: CNPq, CAPES, FAPEMIG

Carta ao editor:

Belo Horizonte, 22 de abril de 2008

Prezado Sr. Editor da Revista da Associação Médica Brasileira,

Submetemos o manuscrito intitulado: "Carcinomas mamários de fenótipo basal em mulheres brasileiras", em anexo, para ser avaliado pelo Conselho Editorial da Revista da Associação Médica Brasileira 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 21 de março de 2007 (parecer no 466/06).

Estamos à disposição para qualquer dúvida ou outros esclarecimentos necessários.

Atenciosamente,

Marina De Brot

Fernando A. Soares

Vinícius S. Cúrcio

Mônica M. A. Stiepcich

Helenice Gobbi

Conteúdo do trabalho:

Introdução

Os carcinomas mamários representam um grupo heterogêneo de tumores que diferem no comportamento, evolução e resposta ao tratamento¹. Tumores com a mesma classificação histológica podem ter aspectos moleculares e evolução biológica variados. A heterogeneidade molecular dos tumores mamários, não avaliável morfológicamente, é um importante desafio ao estudo e tratamento do câncer de mama². Pesquisas recentes utilizando perfis de expressão gênica, com o emprego de microarranjos de DNA e, posteriormente, perfis imunoistoquímicos empregando microarranjos de tecido, permitiram identificar novas categorias de tumores e desenvolver novo esquema de classificação molecular dos carcinomas mamários associados a diferentes cursos clínicos^{3,5}: **luminal A** (positivos para receptores de estrógeno, RE, e para receptores de progesterona, RP; e negativos para HER2); **luminal B** (RE+ ; PR+ ; HER2+); **tumores com superexpressão de HER2** (RE- ; RP- ; HER2+); **tipo basal** (triplo-negativos; RE-, RP-, HER2- ; e positivos para citoqueratinas basais); **não classificável** (tumores com negatividade para todos estes marcadores).

Os carcinomas de tipo ou fenótipo basal, como descrito acima, são neoplasias que não expressam receptores hormonais e a proteína do oncogene HER2 (receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2), sendo por isto referidos como tumores triplo-negativos^{6,7}. Por outro lado, expressam citoqueratinas (CKs) basais (CK5/6, CK14 e CK17), de forma semelhante ao que se observa nas células mioepiteliais da mama normal. Outros marcadores mioepiteliais, como p63 e P-caderina, também foram demonstrados nos tumores de fenótipo basal, permitindo a sua identificação através de um perfil imunoistoquímico definido^{8,9,10,11}. Além da expressão de CKs basais, também foi descrita nos tumores de tipo basal positividade para o receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 1 (HER1 ou EGFR)⁹, BRCA1¹¹ e caveolina¹². A expressão de HER1

foi identificada em 54% dos casos CK5/6-positivos (e em 11% dos casos CK5/6-negativos)⁹, representando um potencial alvo para o tratamento destes carcinomas de mama, através de fármacos antagonistas, como o cetuximab, gefitinib, erlotinib, e mais recentemente o lapatinib¹³. Por outro lado, a positividade para BRCA1 em carcinomas de tipo basal, além de estar associada a pior prognóstico pela sua função no reparo de alterações no DNA, é fator preditivo de resposta à quimioterapia^{11,14}.

Morfologicamente, carcinomas de fenótipo basal apresentam predominantemente alto grau histológico, elevada atividade proliferativa e mais frequentemente exibem elementos medulares e metaplásicos^{15,16,17}. Além disso, afetam preferencialmente mulheres jovens afro-americanas¹⁸ e estão associados a pior prognóstico, com maior incidência de metástases hematogênicas para pulmões e cérebro^{4,7,19,20,21}. A frequência de carcinomas de tipo basal, identificados através de estudos de perfis de expressão gênica e imunoistoquímica em grandes séries de pacientes, varia de 7 a 19% dos tumores de mama^{3,5,9}.

Há raros estudos com casuísticas brasileiras avaliando a frequência de carcinomas mamários de tipo basal em mulheres brasileiras, assim como a expressão de diferentes marcadores nestes tumores e a evolução clínica das pacientes⁸.

Este trabalho objetiva analisar a frequência de carcinomas de fenótipo basal em uma série de casos de tumores triplo-negativos, estudando as características clínicas, anátomopatológicas, imunofenóticas e evolutivas.

Métodos

Selecionamos para este estudo 140 casos de pacientes submetidas a tratamento cirúrgico (mastectomia; quadrantectomia; setorectomia ou tumorectomia) no período de 1985 a 2006, e cujos laudos imunoistoquímicos revelaram negatividade para receptores hormonais (RE e RP) e HER2 (tumores triplo-negativos). Para a inclusão neste trabalho, os casos preencheram os seguintes requisitos: ter diagnóstico histológico original de carcinoma mamário invasor; ter testes imunoistoquímicos prévios revelando negatividade para RE, RP e HER2; ter disponibilidade de lâminas e blocos do tumor para reavaliação histológica e novo estudo imunoistoquímico.

Estudos clínico e anatomopatológico

Os dados clínicos e histopatológicos dos laudos originais foram obtidos a partir de arquivos médicos. A avaliação incluiu: idade ao diagnóstico inicial; raça informada; período reprodutivo (pré ou pós-menopausa); história familiar para câncer de mama; tratamentos complementares; tempo de seguimento clínico; ocorrência de recidivas; tipo e grau histológicos do tumor primário; tamanho do tumor; *status* linfonodal; e estadiamento anatomopatológico.

As lâminas originais coradas pelos métodos da hematoxilina-eosina (HE) foram revistas pelo

mesmo patologista (MDBA), reavaliando-se tipo e grau histológicos dos tumores. Para a classificação histológica dos tumores, foram empregadas as recomendações de PAGE *et al* (1998) e do Colégio Americano de Patologistas (2000)²². Para a avaliação do grau tumoral, utilizamos o Sistema de Nottingham²³.

Estudo imunoistoquímico

Microarranjo de tecido ("tissue microarray" - TMA) foi construído retirando-se cilindros (1mm de diâmetro) a partir de blocos de parafina dos casos selecionados, após marcação, nas lâminas originais, de uma ou duas áreas mais representativas e mais preservadas de cada tumor, de forma que o TMA obtido contivesse duas amostras de cada neoplasia. Para a montagem do TMA utilizou-se um equipamento manual da marca *Beecher Instruments*®.

Lâminas contendo cortes histológicos seqüenciais do TMA foram coradas para RE, RP e HER2 para confirmação do diagnóstico de triplo-negativo (duas lâminas para cada anticorpo, contendo cilindros em *duplicata*). Em lâminas seqüenciais, foram ainda aplicados anticorpos dirigidos aos marcadores de diferenciação basal (CK5 e CK14), além de outros marcadores, como EGFR, p63 e p53 (Tabela 1). O sistema de visualização da reação foi o sistema de amplificação de polímero não biotilado (*Novolink*®, Biosystems, UK). A análise dos marcadores moleculares seguiu critérios referidos na literatura^{7,24,25} e os valores de corte empregados encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos primários, diluições, fabricantes, recuperação antigênica e valores de corte dos anticorpos utilizados no estudo imunoistoquímico^{7,24,25}

Antígeno	Clone	Diluição	Fabricante	Método de recuperação antigênica	Valores de corte
RE	6F11	1: 1.000	Novocastra	PEV/Citrato pH 6,0	< 1% (negativa)
RP	PgR 312	1: 1.000	Novocastra	PEV/Citrato pH 6,0	< 1% (negativa)
HER2	CB11	1: 800	Novocastra	Sem pré-tratamento	0 ou 1+ (negativa)
CK5	XM26	1: 100	Neomarkers	PP/Citrato pH 6,0	≥ 10% (positiva)
CK14	LL002	1: 400	Biogenex	PP/Citrato pH 6,0	≥ 10% (positiva)
EGFR	31G7	1:200	Zymed	Digestão enzimática	≥ 10% (positiva)
p63	4A4	1: 2.000	Dako	BM/EDTA/TRIS pH 9,0	≥ 10% (positiva)

p53	D0-7	1: 2.000	Dako	PP/Citrato pH 6,0	> 5% (positiva)
-----	------	----------	------	-------------------	--------------------

PEV=panela elétrica a vapor; PP=panela de pressão; BM=banho-maria

Os carcinomas foram considerados de fenótipo basal quando expressaram pelo menos um tipo de CK basal (CK5 e/ou CK14), como proposto por Rakha *et al*¹⁰.

Análise estatística

Para analisar a frequência do fenótipo basal e as variáveis clínicas e moleculares foram utilizados os programas Epi-Info[®] (versão 6.0) e MINITAB 14, aplicando-se os testes exato de Fisher ou o teste do qui-quadrado.

Para verificar a associação das diferentes variáveis com a sobrevida das pacientes foi utilizado o método de Kaplan-Meier. As curvas de sobrevida foram construídas e comparadas através dos testes de Log-rank e Wilcoxon. Procedeu-se então à análise multivariada pelo modelo semi-paramétrico de Cox (*software R*).

Resultados

Foram identificados 140 casos de carcinomas mamários invasores triplo-negativos (negativos para RE, RP e HER2) dentre 2.235 tumores submetidos a imunoistoquímica no período analisado (6,3%). A frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal foi de 105/140 tumores triplo-negativos (75,0%). A idade média das pacientes com carcinomas de fenótipo basal, ao diagnóstico inicial, foi de 54,8 anos (variação: 32-86 anos). Detectou-se história familiar positiva para câncer de mama em 27 de 103 pacientes (26,2%), com relato de doença em uma (20,4%) ou mais de uma (5,8%) parente de primeiro grau. A porcentagem de mulheres na pré-menopausa foi de 34,3% (35/102 pacientes), sendo que 7,8% (8/102) delas tinham idade abaixo de 35 anos. Quanto à cor da pele informada, 70/104 pacientes (67,3%) eram referidas como brancas, 5/104 pacientes (4,8%) como negras, 25/104 pacientes (24,0%) como pardas e 3/104 (2,9%) como de origem asiática.

Características clínico-patológicas e imunoistoquímicas dos casos de carcinomas de fenótipo basal

A maioria dos tumores foi classificada como carcinoma ductal invasor sem outra especificação (SOE), representando 80,8% dos casos (84/104 casos). Identificou-se extenso componente de carcinoma ductal in situ (mais de 25% do tumor) em 4/84 casos. Foram considerados carcinomas de tipo especial puro 7,7% (8/104) dos tumores, e tipo especial variante, 11,5%

(12/104) dos casos. O tipo especial puro mais frequente foi o carcinoma metaplásico (5/104; 4,8%), seguido pelos carcinomas apócrino (2/104; 1,9%) e papilífero (2/104; 1,9%). Dentre os carcinomas de tipo especial variante, o mais comumente observado foi o carcinoma medular atípico (medular variante), representando 3,8% (4/104) dos tumores. Em relação ao grau histológico, foram considerados de alto grau (grau III) 87 de 104 tumores (83,7%) e de grau moderado (grau II), 14 de 104 tumores (13,5%). A maioria deles apresentou baixa formação tubular (97/104; 93,3%), alto grau nuclear (89/104; 85,6%) e índice mitótico moderado (52/104; 50,0%). Elevada taxa mitótica foi detectada em 42,3% (44/104) das neoplasias.

Os resultados do perfil imunohistoquímico dos tumores triplo-negativos estão resumidos na Tabela 2.

Tabela 2 - Expressão de citoqueratinas basais (CK5 e CK14) e outros marcadores associados ao fenótipo basal em 140 casos de carcinomas mamários triplo-negativos

Marcador	Positivos n (%)	Negativos n (%)	Total n (%)
CK5	105 (75,0)	35 (25,0)	140 (100)
CK14	41 (29,3)	99 (70,7)	140 (100)
EGFR	51 (36,4)	89 (63,6)	140 (100)
p63	40 (28,6)	100 (71,4)	140 (100)
p53	94 (67,1)	46 (32,9)	140 (100)

Os carcinomas de fenótipo basal exibiram positividade para CK14 em 41/105 (39,0%) e para EGFR em 43/105 (41,0%) tumores. Em todos os casos positivos para CK14 coexistiu positividade para CK5. Observou-se ainda imunomarcagem para p63 em 34,3% (36/105 casos) e para p53 em 71,4% (75/105 casos) dos tumores positivos para CK5.

Estadiamento anatomopatológico avançado da doença (3A, 3B, 3C e 4) foi observado em 50,0% das pacientes (52/104). A dimensão tumoral era maior que 5 cm em 39,0% (41/104) dos casos. Identificou-se *status* linfonodal positivo em 59,2% (61/103) das mulheres. Os principais tipos de tratamento adjuvante administrados foram: quimioterapia (8,0%), radioterapia (7,0%), ou ambos (52,0%).

Seguimento, evolução clínica e sítios de metástases

Seguimento clínico foi obtido em 89 de 105 pacientes (84,8%), com média de tempo de seguimento de 51 meses (variação de 12 a 148 meses). No grupo de pacientes com seguimento, 50,5% (45/89 casos) evoluíram sem evidência de doença até o término do acompanhamento, enquanto 6/89 pacientes (6,7%) estavam vivas, porém com manifestações do câncer. Dentre as 89 mulheres com seguimento clínico, 38 morreram em decorrência da

doença (42,6%). Recidiva sistêmica foi documentada em 47,1% (42/89) das pacientes, sendo pulmões, cérebro e ossos os principais sítios de metástases hematogênicas, com taxas de 53,4%, 19,3% e 19,4%, respectivamente. Outros locais de metástases foram fígado (3 casos; 7,2%), pleura (3 casos; 7,2%) e mediastino (2 casos; 4,7%). Observou-se recidiva local em oito casos (19,4%).

Sobrevida global e sobrevida livre de doença

A sobrevida global (SG) das pacientes variou de 3 a 145 meses, com média de 36 meses e mediana de 28 meses. Identificou-se pior sobrevida global nas pacientes com tumores basais, em comparação àquelas com tumores não basais (Gráfico 1), com risco de morte 2,4 vezes maior nas primeiras. Esta diferença, entretanto, não foi estatisticamente significativa ($p=0,06$).

Quanto à sobrevida livre de doença (SLD), foi observada média de 28 meses e mediana de 20 meses, sendo que em nove casos (15,0%) identificou-se doença disseminada no momento do diagnóstico inicial. O tempo máximo de SLD foi de 119 meses.

Características clínico-patológicas dos tumores de fenótipo basal nas pacientes pré-menopausa

No grupo das mulheres na pré-menopausa, notou-se maior frequência dos carcinomas com diferenciação basal entre os tumores triplo-negativos (79,5%; 35/44 casos). Houve relato de história familiar positiva em 32,4% (11/34) das pacientes. Carcinoma ductal invasor SOE também foi o tipo histológico predominante, representando 94,3% dos casos e exibindo alto grau histológico em 91,4% dos tumores. Identificou-se doença avançada (estadio maior que 3) em 52,9% (18/34) das pacientes, com *status* linfonodal positivo em 73,5% (25/34) dos casos. Seguimento clínico foi obtido para todas as pacientes do referido período reprodutivo, sendo que 45,7% (16/35) permaneciam vivas e sem evidência de doença até o término do seguimento; 8,6% (3/35 casos) estavam vivas com manifestações da doença; e 45,7% (16/35 casos) morreram em decorrência do câncer. Documentou-se recidiva em 18/35 casos (51,4%), com média de SLD de 26 meses e mediana de 20 meses. A SG variou de 3 a 123 meses (média=32 meses; mediana=23 meses).

Discussão

Em nosso trabalho, observou-se frequência inferior dos tumores triplo-negativos (6,3%), em comparação com o relatado em casuísticas estrangeiras (26% ;16,3%)^{7,18}. É possível que a menor frequência que encontramos seja devida ao critério de negatividade que adotamos para os tumores triplo-negativos²⁴.

A terminologia e definição (morfológica e imunofenotípica) dos carcinomas de tipo basal permanece controversa, tendo evoluído a partir dos trabalhos iniciais de Sorlie *et al*^{4,5}. Painei

imunoistoquímico de quatro anticorpos (RE, HER2, HER1 e CK5/6) foi inicialmente proposto por Nielsen *et al*⁸, porém ainda não há correlação exata com os perfis genéticos determinados através de microarranjos de DNA. Estudos europeus mais recentes propõem utilizar a expressão de citoqueratinas basais (CK5/6 e/ou CK14) como o elemento definidor do fenótipo basal^{10,19,26}. Devido à atual ausência de consenso internacional²⁷, optamos por empregar o critério recentemente proposto por Rakha *et al*¹⁰, que definiu a identificação dos carcinomas com diferenciação basal a partir da expressão de CK5/6 e/ou CK14. Encontramos alta frequência de carcinomas de fenótipo basal dentre os tumores triplo-negativos (105/140 tumores;75,0%), superior à encontrada por Rakha *et al*⁷, que identificaram fenótipo basal em 157/282 tumores triplo-negativos (55,7%).

Em nossa série, a maioria dos tumores basais foi positiva para CK5, expressa em 75,0% (105/140) dos tumores triplo-negativos. A CK14, além de estar expressa em apenas 29,3% (41/140) dos casos, não identificou nenhum tumor que tenha sido negativo para CK5. Foi elevada a frequência de expressão de p53, identificada em 67,1% (94/140 casos) dos carcinomas triplo-negativos e em 71,4% (75/105 casos) dos tumores com diferenciação basal, semelhante ao já descrito na literatura^{7,9}. A imunorreatividade para EGFR e p63 obtida em nossa casuística também foi semelhante à descrita em outros trabalhos, tendo sido observada em 36,4% (51/140 casos) e 28,6% (40/140) dos tumores triplo-negativos, respectivamente. Em apenas cinco casos houve positividade para p63 e negatividade para as citoqueratinas basais.

Nossos resultados confirmam que os carcinomas de fenótipo basal em mulheres brasileiras têm características morfológicas, clínicas e evolutivas semelhantes ao descrito em casuísticas européias e norte-americanas. Estes tumores são predominantemente carcinomas ductais invasores de alto grau histológico e atividade proliferativa moderada a elevada, com doença avançada no momento do diagnóstico em grande proporção das pacientes (50,0%)⁹. Dentre os tipos especiais puros e variante, nossos achados também estão de acordo com a literatura internacional, que relata associação dos carcinomas metaplásicos e medulares com o fenótipo basal^{15,16,17}.

Observamos alto índice de metástases sistêmicas (47,1%), com maior frequência para pulmões, cérebro e ossos, do que para fígado. Em contraposição ao achado de outras casuísticas^{18,19}, detectamos também alta taxa de metástases axilares, identificada em 59,2% dos nossos casos.

Embora tenhamos detectado maior frequência dos carcinomas de fenótipo basal no grupo de mulheres na pré-menopausa (79,5%), esta diferença não foi estatisticamente significativa (p=0,49), assim como os demais parâmetros analisados.

Outro achado relevante de nosso estudo foi a pior sobrevida global nas pacientes com tumores basais, em relação aos tumores triplo-negativos não basais. Embora a diferença não tenha sido

estatisticamente significativa, houve significância marginal ($p=0,06$) e o risco de morte para as pacientes com tumores basais foi 2,4 vezes maior que o daquelas com tumores não basais ($RR=2,43$; $IC=95\%$). Como adotamos a positividade para CK5 como elemento definidor do fenótipo basal, este resultado aponta este marcador como um possível indicador de pior prognóstico nas pacientes com tumores triplo-negativos, um grupo que ainda não dispõe de terapêutica específica e que apresenta pior resposta às alternativas convencionais de tratamento. Nossos resultados portanto corroboram estudos prévios, que ressaltam a importância de se identificar a diferenciação basal nos tumores triplo-negativos^{20,21}.

Conclusão

Nosso estudo em mulheres brasileiras confirma que os carcinomas de fenótipo basal são muito freqüentes entre os tumores triplo-negativos, têm alto grau histológico e comportamento clínico agressivo, semelhante ao descrito em séries de pacientes norte-americanas e européias.

Referências Bibliográficas

1. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer - the present. *Histopathology*. 2008;52:82-90.
2. 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.
3. 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-characterized series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*. 2005;116:340-50.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*. 2000;406:747-752.
5. 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 U S A*. 2001;98:10869-74.
6. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008;52:108-118.
7. 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.
8. 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*. 2005;447: 668-94.

9. 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. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5367-74.
10. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AHS, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology.* 2007;50:434-8.
11. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene.* 2007;26:2126-32.
12. Savage K, Lambros MB, Robertson D, Jones RB, Jones C, Mackay A, et al. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res.* 2007;13:90-101.
13. Katz M, Amit I, Citri A, et al. A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol.* 2007;9:961-9.
14. James CR, Quinn JE, Mullan PB, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *Oncologist.* 2007;12:142-50.
15. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology.* 2006;49:10-21.
16. Rodríguez-Pinilla SM, Rodríguez-Gil Y, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Martín-Guijarro MC, Hernandez L, et al. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol.* 2007;314:501-8.
17. Vincent-Salomon A, Gruel N, Lucchesi C, MacGrogan G, Dendale R, Sigal-Zafrani G, et al. Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res* 2007;9:R24.
18. 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.
19. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res.* 2007;9:R4.
20. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer.* 2006;42:3149-53.
21. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononem J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* 2002;161:1991-6.
22. 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;124:966-78.

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

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

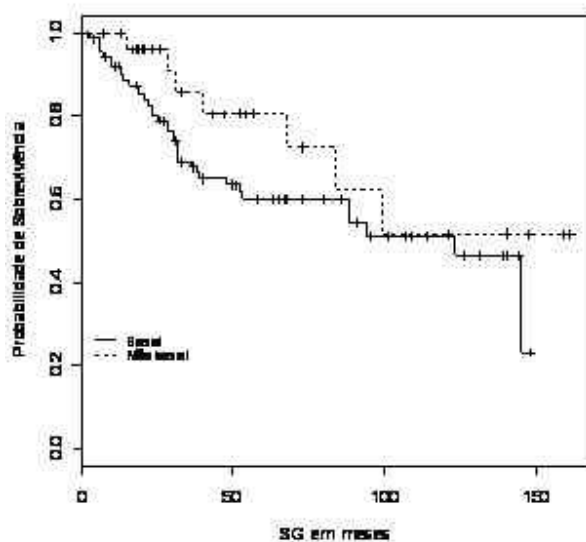
25. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. J Clin Oncol. 2007;25:118-45.

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

27. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. Adv Anat Pathol. 2007;14:358-73.

Imagens enviadas pelo autor.

Gráfico 1



Sobrevida global das pacientes com tumores basais *versus* tumores não basais (probabilidade de sobrevivência estimada pelo método de Kaplan-Meier para pacientes com tumores basais *versus* pacientes com tumores não basais)

SG = sobrevida global

2- RESULTADOS ADICIONAIS

2.1- Características clínico-patológicas

As principais características clínico-patológicas de nossa casuística estão sumarizadas na tabela 2 (TAB.2).

TABELA 2- Principais características clínico-patológicas da série de pacientes com carcinomas com fenótipo basal

Parâmetro	Número n (%)
Idade em anos	
Intervalo	32-86 anos (média de 54,8)
<35	8 (7,8)
35-50	34 (33,0)
51-60	27 (26,2)
>60	34 (33,0)
Cor	
Branca	70 (67,3)
Negra	5 (4,8)
Parda	25 (24,0)
Amarela	3 (2,9)
Não informada	1 (1,0)
Status menopausal	
Pré-menopausal	35 (34,3)
Pós-menopausal	67 (65,7)
Tamanho do tumor	
Intervalo	1,2-14,0cm
<2cm	11 (10,6)
2-5cm	38 (36,5)
>5cm	45 (43,2)
Linfonodos axilares	
Positivo	61 (59,2)
Negativo	34 (33,0)
Tipo histológico	
Carcinoma ductal invasor SOE	84(80,8)
Tipo especial puro	8 (7,7)
Tipo especial variante	12(11,5)

2.2- Cor da pele *versus* carcinomas de fenótipo basal

Comparando-se o grupo das mulheres referidas como brancas (70/104; 67,3% da amostra), com o das negras e pardas (30/104; 28,8% da amostra), notou-se pior sobrevida global no primeiro grupo ($p=0,019$), com maiores taxas de recidiva e mortalidade em decorrência do câncer nestas pacientes (GRAF.2). Enquanto 33/70 (47,1%) pacientes brancas morreram devido ao câncer, no grupo das negras/pardas, 7/30 (23,3%) morreram em decorrência da doença ($p=0,049$). Entretanto observou-se maior perda de seguimento no segundo grupo (18,75% negras/pardas x 5,9% brancas). Relapso da doença foi identificado em 51,5% (35/68) das brancas e em 17,2% (5/29) das negras/pardas ($p=0,024$).

Nossos achados são diferentes de relatos prévios de casuísticas norte-americanas que mostraram maior frequência e pior prognóstico dos carcinomas de fenótipo basal em mulheres negras/afro-americanas (CAREY *et al*, 2006; MORRIS *et al*, 2007). Em nosso estudo, não observamos diferenças significativas quanto à frequência de tumores basais nos dois grupos, identificando-se frequência de 78,6% (70/89 pacientes) nas brancas, e de 73,1% (30/41 pacientes) nas negras/pardas. Por outro lado, demonstramos pior sobrevida global, maior taxa de recidivas e de morte em decorrência do câncer nas pacientes referidas como brancas, do que nas negras/pardas, sendo que o risco de morte nas primeiras foi cerca de 3 vezes o risco de morte nas segundas ($p=0,019$; RR=2,6; IC=95%). Deve-se ressaltar, entretanto, que em nosso trabalho as pacientes brancas corresponderam a 67,3% da casuística, com menor representação de negras e pardas. Além disso, consideramos que devido à miscigenação característica da

população brasileira, há dificuldade em se determinar com precisão a raça das pacientes apenas pela cor da pele. Pesquisas anteriores utilizando ferramentas moleculares com o objetivo de estratificar os indivíduos de acordo com sua ancestralidade genômica, e não através da cor da pele, mostraram que em pacientes brasileiras a cor da pele não reflete a ancestralidade européia, africana ou ameríndia (PARRA *et al*, 2003).

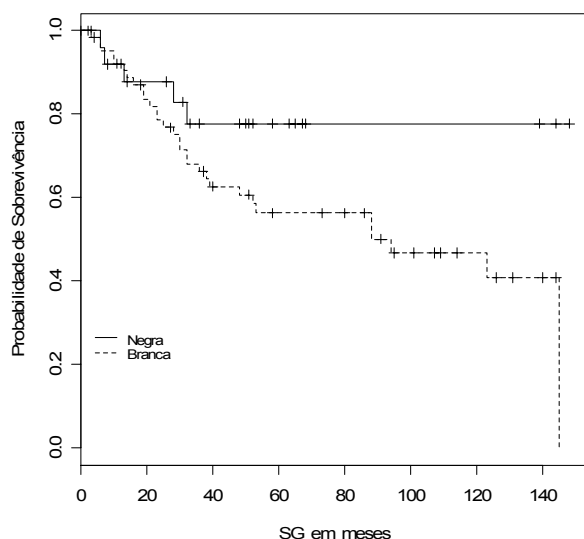


GRÁFICO 2- Sobrevida nas pacientes de cor branca *versus* pacientes de cor negra/parda com tumores de fenótipo basal. Probabilidade de sobrevivência estimada por Kaplan-Meier para pacientes de cor branca *versus* pacientes de cor negra/parda com tumores de fenótipo basal.

2.3- Expressão de marcadores associados ao fenótipo basal

Além da expressão de diferentes biomarcadores já discutida no artigo, mostramos ainda positividade para caveolina em 20/140 TTN (14,3% dos casos),

sendo que todos estes 20 tumores eram carcinomas de fenótipo basal (20/105 casos; 16,2%). Apesar de termos adotado critérios semelhantes aos descritos na literatura para definir a positividade para este marcador, através de sistema de *scores* (SAVAGE *et al*, 2007), detectamos frequência inferior à descrita em trabalhos prévios (PINILLA *et al*, 2006; RODRIGUEZ-PINILLA *et al*, 2006; SAVAGE *et al*, 2007). Como houve coexpressão de caveolina e CK5 em todos os 20 tumores positivos para o primeiro anticorpo, este marcador não auxiliaria, em nossa amostra, a identificar maior número de casos de tumores basais (FIG.3).

Quanto à expressão de EGFR, é importante relatar que em somente oito casos imunorreativos para tal marcador não observamos coexpressão de CK5, ressaltando novamente a elevada frequência de expressão desta citoqueratina em nossa casuística. Portanto, se tivéssemos adotado os critérios propostos por Nielsen *et al* (2004) para a definição do fenótipo basal (negatividade para RE, RP, HER2, e positividade para CK5/6 e/ou EGFR), não haveria diferença significativa de frequência de tumores basais dentre os TTN (75,0% dos casos, segundo os critérios de Rakha *et al*, 2007b, *versus* 80,7% dos casos, segundo os critérios de Nielsen *et al*, 2004). Não houve diferença quanto à sobrevida entre os grupos de pacientes com TTN EGFR-positivos e EGFR-negativos, ao contrário do demonstrado em relação à expressão de CK5. Assim, além de ser mais frequente, a expressão de CK5 mostrou uma tendência (valor de p com significância estatística marginal) de pior evolução clínica, indicada pela menor sobrevida global em relação às pacientes com TTN CK5-negativos (tumores não basais). De forma semelhante, apenas em quatro casos a expressão de p63 não coexistiu com a positividade para CK5 (FIG.3).

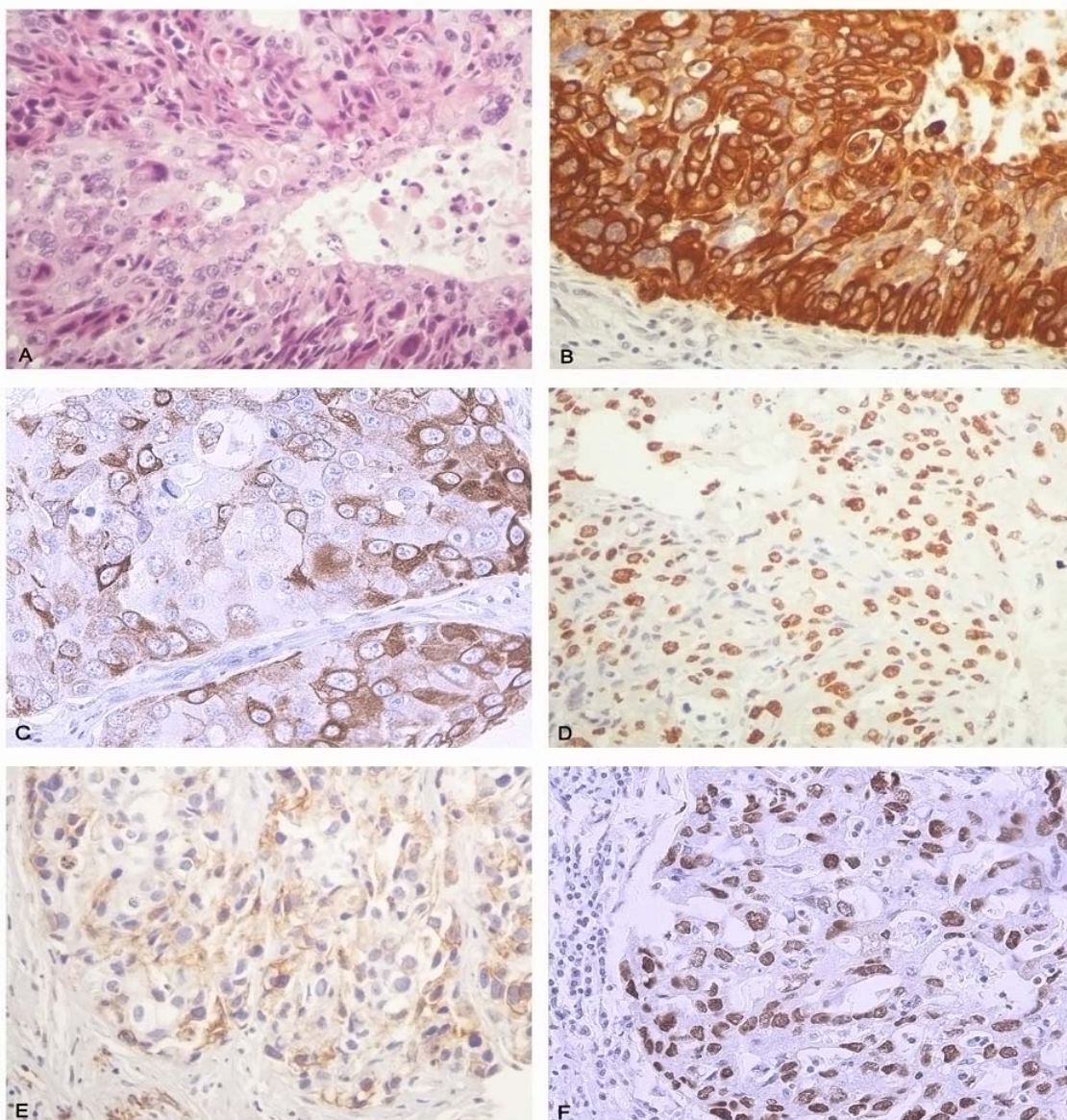


FIGURA 3 – Estudo histológico e imunoistoquímico de um caso de carcinoma mamário de fenótipo basal (caso 3) mostrando coexpressão de diferentes marcadores (400X). Em A, coloração de HE; em B e C, imunomarcacão de membrana e citoplasma positiva para CK5 e CK14; em D, imunomarcacão nuclear positiva para p63; em E, imunomarcacão de membrana positiva para caveolina; e em F, imunomarcacão nuclear positiva para p53.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer de mama compreende um grupo de doenças notavelmente diverso em termos de apresentação, morfologia, perfil molecular e resposta terapêutica. Embora as pesquisas com perfis de expressão gênica tenham atraído atenção considerável e a esperança de que poderiam resultar em melhoria dramática na conduta dos pacientes, até o momento as conquistas, na prática, têm sido limitadas. De fato, alguns questionamentos críticos têm sido levantados em relação à taxonomia molecular do câncer de mama, em seu atual formato: quão novos seriam estes subgrupos? Qual o significado clínico destas classes? Quanto de informação adicional esta classificação realmente oferece, além do que já é provido pelos métodos tradicionais? Os dados adicionais são relevantes no manejo clínico dos pacientes? E esta taxonomia poderia superar os sistemas de classificação atuais? Estas e outras questões, de interesse clínico e acadêmico, ainda não foram satisfatoriamente respondidas. Em verdade, informes extras fornecidos pelos estudos de descoberta de classes/taxonomia molecular até então foram de interesse principalmente acadêmico, ainda sem se transpor para a prática clínica. Alguns autores têm discutido que os trabalhos de taxonomia molecular existentes não incluíram dados histopatológicos detalhados nas análises multivariadas e, portanto, o referido valor de significância prognóstica independente é pelo menos questionável (RAKHA *et al*, 2008b). Além disso, a classificação molecular baseada no agrupamento hierárquico não pode ser

aplicada prospectivamente, já que os múltiplos estudos realizados utilizaram seqüências de genes diferentes e alguns subgrupos não são estáveis. Feitas estas considerações, a contribuição destes estudos é inquestionável quanto ao fato de que representaram o primeiro passo em direção a uma classificação molecular refinada e funcional dos carcinomas mamários, e que pode verdadeiramente ter relevância prognostica e preditiva, complementando os sistemas de classificação empregados atualmente.

No que concerne os carcinomas de fenótipo basal, particularmente, apesar de terem fascinado os cientistas devido a seus parâmetros clínicos e patológicos característicos, ainda não há consenso quanto à sua definição e método de identificação na rotina prática. Além disso, o significado prognóstico dos tumores basais e a resposta a regimes quimioterápicos específicos permanecem em debate (RAKHA *et al*, 2008c).

Apesar de diferenças relacionadas à definição e prevalência dos carcinomas de tipo basal, a pior evolução dos pacientes com estes tumores tem sido relatada em diversas populações (RAKHA *et al*, 2008d), como em nosso estudo. Também observamos história clínica mais agressiva, desenvolvimento de recorrências, metástases à distância, menor sobrevida e taxa de mortalidade relativamente alta dentre as pacientes com tumores basais. Nossos resultados mostram, como em relatos prévios, que os carcinomas basais representam um espectro de tumores, com características morfológicas e imunofenotípicas em comum, ainda que heterogêneas. No contexto do câncer de mama “triplo-negativo”, seria importante identificar estes tumores na rotina, uma vez que podem implicar em comportamento biológico mais agressivo, padrão peculiar de metástases e

resposta diferenciada à quimioterapia. O patologista, frente a uma combinação de aspectos morfológicos (alto grau, índice mitótico elevado, cicatriz/necrose central, elementos medulares e metaplásicos) e imunoistoquímicos (negatividade para RE, RP e HER2), pode avaliar a presença do fenótipo basal através do emprego de um ou mais biomarcadores, como CK5, CK14 ou EGFR. Não obstante opções terapêuticas específicas ainda não estejam disponíveis, os colegas oncologistas podem ser alertados sobre as particularidades destas neoplasias. Ao mesmo tempo, apenas identificando, registrando, catalogando e documentando os casos deste grupo heterogêneo de tumores é que poderemos estar em posição de definirmos quais as opções terapêuticas mais apropriadas no futuro.

Nosso estudo confirmou que os carcinomas de fenótipo basal conferem pior prognóstico e menor sobrevida às pacientes, independente da miscigenação racial das mulheres brasileiras de nossa amostra.

CONCLUSÕES

- 1- Identificou-se baixa frequência de carcinomas mamários invasores triplo-negativos (140 casos dentre 2.235 tumores submetidos a imunoistoquímica no período analisado), correspondendo a 6,3% dos tumores.
- 2- Os carcinomas de fenótipo basal apresentaram frequência elevada (75,0%) dentre os tumores triplo-negativos.
- 3- O marcador mais constante foi a CK5 (75,0% dos casos), sendo que a expressão de CK14 (29,3% dos casos) sempre coexistiu com a expressão de CK5 (39,0% dos casos). Nos tumores definidos como basais, verificou-se ainda expressão de outros marcadores associados ao fenótipo basal, como EGFR (41,0%), p63 (34,3%), caveolina (16,2%) e p53 (71,4%).
- 4- A maioria das pacientes foi diagnosticada em estadió avançado da doença, com elevado índice de metástases linfáticas e hematogênicas no momento do diagnóstico inicial.
- 5- Os tumores basais foram predominantemente carcinomas ductais invasores de alto grau (83,7% dos casos), com elevado índice proliferativo e dimensões maiores (tamanho maior que 5cm em 43,2% dos tumores) .
- 6- O prognóstico foi adverso (SG média=36 meses; SLD média=28 meses), independente do *status* menopausal. Observou-se pior sobrevida no grupo de pacientes referidas como brancas (p=0,019), que apresentaram maior taxa de recidiva e maior mortalidade.

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. *Int 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.

ALLRED DC, HARVEY JM, BERARDO M, CLARK GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. v.11, n.2, p.155-68, Feb.1998.

ARNES JB, BRUNET JS, STEFANSSON I, BÉGIN LR, WONG N, CHAPPUIS PO, *et al.* Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clin Cancer Res*. v.11, n.11, p.4003-11, Jun. 2005.

BANERJEE S, REIS-FILHO JS, ASHLEY S, STEELE D, ASHWORTH A, LAKHANI SR, *et al.* Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. v.59, n.7, p.729-35, Jul. 2006.

BATTIFORA H. The multitumor (sausage) tissue block: novel method for immunohistochemical antibody testing. *Lab Invest*. v.55, n.2, p.244-8, Aug. 1986.

BAUER KR, BROWN M, CRESS RD, PARISE CA, CAGGIANO V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. v.109, n.9, p.1721-8, May. 2007.

BHARGAVA R, DABBS DJ. Use of immunohistochemistry in diagnosis of breast epithelial lesions. *Adv Anat Pathol*. v.14, n.2, p.93-107, Mar. 2007.

BERTUCCI F, FINETTI P, CERVERA N, CHARAFE-JAUFFRET E, MAMESSIER E, ADELAIDE J, *et al.* Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res*. v.66, n.9, p.4636-44, May 2006.

BOSSUYT V, FADARE O, MARTEL M, OCAL IT, BURTNES B, MOINFAR F, *et al.* Remarkably high frequency of EGFR expression in breast carcinomas with squamous differentiation. *Int J Surg Pathol.* v.13, n.4, p.319-27, Oct. 2005.

BUBENDORF L, NOCITO A, MOCH H, SAUTER G. Tissue microarray (TMA) technology: miniaturized pathology archives for high-throughput in situ studies. *J Pathol.* v.195, n.1, p.72-9, Sep. 2001.

CALZA S, HALL P, AUER G, BJÖHLE J, KLAAR S, KRONENWETT U, *et al.* Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res.* v.8, n.4, R34. 2006.

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

CAREY LA, DEES EC, SAWYER L, GATTI L, MOORE DT, COLLICHIO F, *et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* v.13, n.8, p.2329-34. April 2007.

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.* v.295, n.21, p.2492-502, Jun. 2006.

CHAPPUIS PO, GOFFIN J, WONG N, PERRET C, TONIN PN, *et al.* A significant response to neoadjuvant chemotherapy in BRCA1/2 related breast cancer. *J Med Genet.* v.39, n.8, p.608-10, Aug. 2002.

CHEANG MC, VODUC D, BAJDIK 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.

CLEATOR S, PARTON M, DOWSETT M. The biology of neoadjuvant chemotherapy for breast cancer. *Endocr Relat Cancer.* v.9, n.3, p.183-95, Sep. 2002.

COLLETT 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.

DA SILVA L, CLARKE C, LAKHANI SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol.* v.60, n.12, n.1328-32, Dec. 2007.

DIALLO-DANE BROCK R, TING E, GLUZ O, HERR A, MOHRMANN S, GEDDERT H, *et al.* Protein expression profiling in high-risk breast cancer patients treated with high-

dose or conventional dose-dense chemotherapy. *Clin Cancer Res.* v.13, n.2, p.488-97, Jan. 2007.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. 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.* v.19, n.5, p.403-10, Nov. 1991.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. Assessment of histologic grade. In: ELSTON CW & ELLIS IO eds. *Systemic Pathology 3rd Ed.* Vol. 13, 365-84, Churchill-Livinstone. Edinburgh, Scotland, UK. 1998.

FADARE O, TAVASSOLI FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol.* v.14, n.5, p.358-73, Sep. 2007.

FADARE O, WANG SA, HILEETO D. The expression of cytokeratin 5/6 in invasive lobular carcinoma of the breast: evidence of a basal-like subset? *Hum Pathol.* v.39, n.3, p.331-6, Mar. 2008.

FEDOR HL, DE MARZO AM. Practical methods for tissue microarray construction. *Methods Mol Med.* v.103, p.89-101, 2005.

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.* v.124, n.7, p.966-78, Jul. 2000.

FOULKES WD, BRUNET JS, STEFANSSON IM, STRAUME O, CHAPPUIS PO, BÉGIN LR, *et al.* The prognostic implication of the basal-like (cyclin E high/p27 low/p53+/glomeruloid-microvascular-proliferation+) phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Cancer Res.* v.64, n.3, p.830-5, Feb. 2004.

FOULKES WD, GRAINGE MJ, RAKHA EA, GREEN AR, ELLIS IO. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. *Breast Cancer Res Treat.* Jul. 2008.

FULFORD LG, EASTON DF, REIS-FILHO JS, SOFRONIS A, GILLETT CE, LAKHANI SR, *et al.* Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology.* v.49, n.1, p.22-34, Jul. 2006.

FULFORD LG, REIS-FILHO JS, RYDER K, JONES C, GILLETT CE, HANBY A, *et al.* Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res.* v.9, n.1, R4, Jan. 2007.

GAEDCKE J, TRAUB F, MILDE S, WILKENS L, STAN A, OSTERTAG H, *et al.* Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. *Mod Pathol.* v.20, n.8, p.864-70, Aug. 2007.

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. *Ann Oncol.* v.16, n.10, p.1569-83, Oct. 2005.

GOBBI H, ROCHA RM, NUNES CB. Predictive factors of breast cancer evaluated by immunohistochemistry. *J Bras Patol Med Lab.* v.44, n.2, p.131-40, April 2008.

GUARNERI V, BROGLIO K, KAU SW, CRISTOFANILLI M, BUZDAR AU, VALERO V, *et al.* Prognostic value of pathologic complete response after primary chemotherapy in relation to hormone receptor status and other factors. *J Clin Oncol.* v.24, n.7, p.1037-44, Mar. 2006.

HARVEY JM, CLARK GM, OSBORNE CK, ALLRED DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol.* v.17, n.5, p.1474-81, May 1999.

INCA BRASIL. www.inca.gov.br

JACQUEMIER J, PADOVANI L, RABAYROL L, LAKHANI SR, PENAULT-LLORCA F, DENOUX Y, *et al.* Typical medullary breast carcinomas have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol.* v.207, n.3, p.260-8, Nov. 2005.

JAMES CR, QUINN JE, MULLAN PB, JOHNSTON PG, HARKIN DP. BRCA1, a potential predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *Oncologist.* v.12, n.2, p.142-50, Feb. 2007.

JUMPPANEN M, GRUVBERGER-SAAL S, KAURANIEMI P, TANNER M, BENDAHL PO, LUNDIN M, *et al.* Basal-like phenotype is not associated with patient survival in estrogen-receptor-negative breast cancers. *Breast Cancer Res.* v.9, n.1, R16, Jan. 2007.

KATZ M, AMIT I, CITRI A, CITRI A, SHAY T, CARVALHO S, LAVI S, *et al.* A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol.* v.9, n.8, p.961-9, Aug. 2007.

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, BÄRLUND M, SCHRAML P, LEIGHTON S, *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med.* v.4, n.7, p.844-7, Jul. 1998.

- KORSCHING E, 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, n.5, p.553-60, April 2008.
- KUSIŃSKA R, POTEMSKI P, JESIONEK-KUPNICKA D, KORDEK R. Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma--relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2. *Pol J Pathol.* v.56, n.3, p.107-10, 2005.
- LAAKSO M, LOMAN N, BORG A, ISOLA J. Cytokeratin 5/14-positive breast cancer: true basal phenotype confined to BRCA1 tumors. *Mod Pathol.* v.18, n.10, p.1321-8, Oct. 2005.
- LEIBL S, MOINFAR F. Metaplastic breast carcinomas are negative for Her-2 but frequently express EGFR (Her-1): potential relevance to adjuvant treatment with EGFR tyrosine kinase inhibitors? *J Clin Pathol.* v.58, n.7, p.700-4, Jul. 2005.
- LEIBL S, GOGG-KAMMERER M, SOMMERSACHER A, DENK H, MOINFAR F. Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation?: immunohistochemical profile of the sarcomatoid subtype using novel myoepithelial markers. *Am J Surg Pathol.* v.29, n.3, p.347-53, Mar. 2005.
- LI H, CHERUKURI P, LI N, COWLING V, SPINELLA M, COLE M, *et al.* Nestin is expressed in the basal/myoepithelial layer of the mammary gland and is a selective marker of basal epithelial breast tumors. *Cancer Res.* v.67, n.2, p.501-10, Jan. 2007.
- LIU CL, PRAPONG W, NATKUNAM Y, ALIZADEH A, MONTGOMERY K, GILKS CB, *et al.* Software tools for high-throughput analysis and archiving of immunohistochemistry staining data obtained with tissue microarrays. *Am J Pathol.* v.161, n.5, p.1557-65, Nov. 2002.
- LIVASY CA, KARACA G, NANDA R, TRETIAKOVA MS, OLOPADE OI, MOORE DT, *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern Pathol.* v.19, n.2, p.264-71, Feb. 2006.
- LUCK AA, EVANS AJ, GREEN AR, RAKHA EA, PAISH C, ELLIS IO. The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol).* v.20, n.1, p.40-5, Feb. 2008.
- 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.
- MANLEY S, MUCCI NR, DE MARZO AM, RUBIN MA. *et al.* Relational database structure to manage high-density tissue microarray data and images for pathology studies focusing on clinical outcome: the prostate specialized program of research excellence model. *Am J Pathol.* v.159, n.3, p.837-43, Sep. 2001.

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.

MCCARTHY A, SAVAGE K, GABRIEL A, NACEUR C, REIS-FILHO JS, ASHWORTH A. A mouse model of basal-like breast carcinoma with metaplastic elements. *J Pathol.* v.211, n.4, p.389-398, Mar. 2007.

MENDELSON J, BASELGA J. Epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *Semin Oncol.* v.33, n.4, p.369-85, Aug. 2006.

MILANES-YEARSLEY M, HAMMOND ME, PAJAK TF, COOPER JS, CHANG C, GRIFFIN T, *et al.* Tissue micro-array: a cost and time-effective method for correlative studies by regional and national cancer study groups. *Mod Pathol*, v.15, n.12, p.1366-73, Dec. 2002.

MOLL R, FRANKE WW, SCHILLER DL, GEIGER B, KREPLER R. The catalog of human cytokeratins: patterns of expression in normal epithelia, tumors and cultured cells. *Cell.* v.31, n.1, p.11-24, Nov. 1982.

MORRIS GJ, NAIDU S, TOPHAM AK, GUILLES F, XU Y, MCCUE P, *et al.* Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer.* v.110, n.4, p.876-84, Aug. 2007.

MURAD TM. A proposed histochemical and electron microscopic classification of human breast cancer according to cell origin. *Cancer.* v.27, n.2, p.288-99, Feb. 1971.

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, n.3, p.195-208, 1998.

PALACIOS J, HONRADO E, OSORIO A, CAZORLA A, SARRIÓ D, BARROSO A, *et al.* Phenotypic characterization of BRCA1 and BRCA2 tumors based in a tissue microarray study with 37 immunohistochemical markers. *Breast Cancer Res Treat.* v.90, n.1, p.5-14, Mar. 2005.

PARRA FC, AMADO RC, LAMBERTUCCI JR, ROCHA J, ANTUNES CM, PENA SD. Color and genomic ancestry in Brazilians. *Proc Natl Acad Sci U S A.* v.100, n.1, p.177-82, Jan. 2003.

PAYNE SJL, BOWEN RL, JONES JL, WELLS CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology*. v.52, n.1, p.82-90, Jan. 2008.

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

PIEKARSKI JH, BIERNAT W. Clinical significance of CK5/6 and PTEN protein expression in patients with bilateral breast carcinoma. *Histopathology*. v.49, n.3, p.248-55, Sep. 2006.

PINILLA SM, HONRADO E, HARDISSON D, BENÍTEZ J, PALACIOS J. Caveolin-1 expression is associated with a basal-like phenotype in sporadic and hereditary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. v.99, n.1, p.85-90, Sep. 2006.

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, n.6, p.478-85, 2005.

RAKHA EA, PUTTI TC, 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.208, n.4, p.495-506, Mar. 2006a.

RAKHA EA, EL-REHIM DA, PAISH C, GREEN AR, LEE AHS, ROBERTSON JF, *et al*. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. v.42, n.18, p.3149-53, Dec. 2006b.

RAKHA EA, EL-SAYED ME, GREEN AR, LEE AHS, ROBERTSON JF, ELLIS IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. v.109, n.1, p.25-32, Jan. 2007a.

RAKHA EA, EL-SAYED ME, GREEN AR, PAISH EC, LEE AHS, ELLIS IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. v.50, n.4, p.434-8, Mar. 2007b.

RAKHA E, ELLIS I, REIS-FILHO J. Are triple-negative and basal-like breast cancer synonymous? *Clin Cancer Res*. v.14, n.2, p.618, Jan. 2008a.

RAKHA EA, EL-SAYED ME, REIS-FILHO JS, ELLIS IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology*. v.52, n.1, p.67-81, Jan. 2008b.

RAKHA EA, EL-SAYED ME, REIS-FILHO J, ELLIS IO. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Mar. 2008c.

RAKHA EA, REIS-FILHO JS, ELLIS IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. v.26, n.15, p.2568-81. May 2008d.

RAKHA EA, EL-SHEIKH SE, KANDIL MA, EL-SAYED ME, GREEN AR, ELLIS IO. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol.* v.39, n.6, p.857-65, Jun. 2008e.

RAKHA EA, REIS-FILHO JS, ELLIS IO. Impact of Basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology.* v.75, n.2, p.95-103, Jun. 2008f.

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

REIS-FILHO JS, MILANEZI F, CARVALHO S, SIMPSON PT, STEELE D, SAVAGE K, *et al.* Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. *Breast Cancer Res.* v.7, n.6, R1028-35. Oct 2005.

REIS-FILHO JS, MILANEZI F, STEELE D, SAVAGE K, SIMPSON PT, NESLAND JM, *et al.* Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology.* v.49, n.1, p.10-21, Jul. 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, RAMALHO LNZ, GARCIA SB, BRANDÃO DF, CHAHUD F, ZUCOLOTO S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology.* v.47, n.5, p.458-66, Nov. 2005.

RIBEIRO-SILVA A, RIBEIRO DO VALE F, ZUCOLOTO S. Vascular endothelial growth factor expression in the basal subtype of breast carcinoma. *Am J Clin Pathol.* v.125, n.4, p.512-8, April 2006.

RIDOLFI RL, ROSEN PP, PORT A, KINNE D, MIKÉ V. Medullary carcinoma of the breast: a clinicopathologic study with 10 year follow-up. *Cancer.* v.40, n.4, p.1365-85, Oct. 1977.

ROCHA RM, ANDRADE VP, NUNES CB, ROCHA GFS, SANCHES FSF, OLIVEIRA FN, *et al.* Construction of low cost tissue microarrays using alternative equipment for immunohistochemical study of breast tumors. *J Bras Patol Med Lab.* v.42, n.6, p.477-82, Dez. 2006.

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 estrogen receptor in breast tumors. *J Bras Patol Med Lab.* v.43, n.6, p.435-40, Dez. 2007.

ROCHA R, 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. *Pathol Res Pract*. Jun. 2008.

RODRÍGUEZ-PINILLA SM, SARRIÓ D, HONRADO E, HARDISSON D, CALERO F, BENITEZ J, *et al*. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. v.12, n.5, p.1533-9, Mar. 2006.

RODRÍGUEZ-PINILLA SM, RODRÍGUEZ-GIL Y, MORENO-BUENO G, SARRIÓ D, MARTÍN-GUIJARRO MC, HERNANDEZ L, *et al*. Sporadic invasive breast carcinomas with medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol*.v.31, n.4, p.501-8, April 2007a.

RODRÍGUEZ-PINILLA SM, SARRIÓ D, HONRADO E, MORENO-BUENO G, HARDISSON D, CALERO F, *et al*. Vimentin and laminin expression is associated with basal-like phenotype in both sporadic and BRCA1-associated breast carcinomas. *J Clin Pathol*. v.60, n.9, p.1006-12, Sep. 2007b.

RODY A, KARN T, SOLBACH C, GAETJE R, MUNNES M, KISSLER S, *et al*. The erbB2+ cluster of the intrinsic gene set predicts tumor response of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial. *Breast*. v.16, n.3, p.235-40, Jun. 2007.

ROUZIER R, PEROU CM, SYMMANS WF, IBRAHIM N, CRISTOFANILLI M, ANDERSON K, *et al*. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. v.11, n.16, p.5678-85, Aug. 2005.

SAPINO A, MARCHIÒ C, SENETTA R, CASTELLANO I, MACRÌ L, CASSONI P, *et al*. Routine assessment of prognostic factors in breast cancer using a multicore tissue microarray procedure. *Virchows Arch*, v.449, n.3, p.288-96, Sep. 2006.

SAVAGE K, LAMBROS MB, ROBERTSON D, JONES RL, JONES C, MACKAY A, *et al*. Caveolin 1 is overexpressed and amplified in a subset of basal-like and metaplastic breast carcinomas: a morphologic, ultrastructural, immunohistochemical, and in situ hybridization analysis. *Clin Cancer Res*, v.13, n.1, p.90-101, Jan. 2007.

SAVAGE K, LEUNG S, TODD SK, BROWN LA, JONES RL, ROBERTSON D, *et al*. Distribution and significance of caveolin 2 expression in normal breast and invasive breast cancer: an immunofluorescence and immunohistochemical analysis. *Breast Cancer Res Treat*, v.110, n.2, p.245-56, Jul. 2008.

SCHOPPMANN SF, BAYER G, AUMAYR K, TAUCHER S, GELEFF S, RUDAS M, *et al*. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg*. v.240, n.2, p.306-12, Aug. 2004.

SELVARAJAN S, TAN SY, SII LH, TAN PH. c-erbB-2 (HER-2/neu) immunohistochemistry in invasive breast cancer: is there concordance between standard sections and tissue microarrays? *Pathology*. v.38, n.4, p.316-20, Aug. 2006.

SIZIOPIKOU KP, COBLEIGH M. The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies. *Breast*. v.16, n.1, p.104-7, Feb. 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*. v.98, n.19, p.10869-74, Sep. 2001.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.100, n.14, p.8418-23, Jul. 2003.

SOTIRIOU C, NEO SY, MCSHANE LM, KORN EL, LONG PM, JAZAERI A, *et al*. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. v.100, n.18, p.10393-8, Sep. 2003.

TAN DS, MARCHIÓ C, JONES RL, SAVAGE K, SMITH IE, DOWSETT M, REIS-FILHO JS. Triple negative breast cancer: molecular profiling and prognostic impact in adjuvant anthracycline-treated patients. *Breast Cancer Res Treat*. Oct. 2007.

TISCHKOWITZ M, BRUNET JS, BÉGIN LR, HUNTSMAN DG, CHEANG MC, AKSLEN LA, *et al*. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. v.24, n.7, p.134, Jul. 2007.

TOT T. The cytokeratin profile of medullary carcinoma of the breast. *Histopathology*. v.37, n.2, p.175-81, Aug. 2000.

TSUDA H, TAKARABE T, HASEGAWA T, MURATA T, HIROHASHI S. Myoepithelial differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas with large central acellular zones. *Hum Pathol*. v.30, n.10, p.1134-9, Oct. 1999.

TROTTER MJ, DEMETRICK DJ, CIEZAR SD. Mapping tissue microarrays: a simplified method for microarray navigation and a data management. Abstract #1440. United States and Canadian Academy of Pathology, 91st Annual Meeting, Chicago IL, 2002.

TURNER NC, REIS-FILHO JS, RUSSELL AM, SPRINGALL RJ, RYDER K, STEELE D, *et al*. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*. v.26, n.14, p.2126-32, Mar. 2007.

VAN DE RIJN M, PEROU CM, TIBSHIRANI R, HAAS P, KALLIONIEMI O, KONONEM J, *et al.* Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* v.161, n.6, p.1991-6, Dec. 2002.

VINCENT-SALOMON A, GRUEL N, LUCCHESI C, MACGROGAN G, DENDALE R, SIGAL-ZAFRANI G, *et al.* Identification of typical medullary breast carcinoma as a genomic sub-group of basal-like carcinomas, a heterogeneous new molecular entity. *Breast Cancer Res.* v.9, n.2, R24, 2007.

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

WOLFF AC, HAMMOND ME, SCHWARTZ JN, HAGERTY KL, ALLRED DC, COTE RJ, *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* v.25, n.1, p.118-45, Jan. 2007.



ANEXO 1 - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA



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


Parecer nº. ETIC 466/06

Interessado(a): **Profa. Helenice Gobbi**
Depto de Anatomia Patológica e Medicina Legal
Faculdade de Medicina-UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 21 de março de 2007, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado “ **Frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal em mulheres brasileiras**” bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

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 2 - REGISTRO DE PACIENTES, AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA (HE) E IMUNOISTOQUÍMICA

PROTOCOLO DE PESQUISA - REGISTRO DE PACIENTES

NOME: _____

REGISTRO: _____

NÚMERO DA BIÓPSIA : _____

ANO: _____

EXAME IMUNOISTOQUÍMICO (IIQ): _____ ANO: _____

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

I - CLÍNICA

Sexo: 1- feminino 2- masculino 3- não consta

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

Cor: 1- branca; 2- negra; 3- parda; 4- amarela; 5- não consta

História familiar (Hfam):

- 1- Ca de mama em parente de 1º grau (1a= 1parente; 1b=2parentes)
- 2- Ca de mama em parente de 2º grau
- 3- Negativa
- 4- Não consta

II - TRATAMENTO

- 1- Quimioterapia (QT)
- 2- Radioterapia (RT)
- 3- Hormonioterapia (HT)
- 4- QT + RT
- 5- QT + HT
- 6- RT + HT
- 7- Todos acima

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- Imunoistoquímica 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 (≤ 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

Linfonodo sentinela:

- 1- Positivo
- 2- Negativo
- 3- Não se aplica

Linfonodos axilares (LN):

- 1- Positivo
- 2- Negativo
- 3- Não se aplica

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: 60 a 75% 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 (até 5 figuras de mitose por 10 HPF)
- 2- 2 (6 a 10 figuras de mitose por 10 HPF)
- 3- 3 (mais de 10 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 imunoistoquímica:

- 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

p53 inicial (i) e após repetição:

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

CK 5:

- 1- Positivo
- 2- Negativo

CK 14:

- 1- Positivo
- 2- Negativo

EGFR:

- 1- Positivo
- 2- Negativo

p63:

- 1- Positivo
- 2- Negativo

Caveolina: Especificar o *score*

- 1- Positivo
- 2- Negativo

V-SEGUIMENTO CLÍNICO

Follow-up (FUP):

- 1- *Alive with no evidence of disease (NED)*
- 2- *Died of disease (DOD)*
- 3- *Alive with disease (AWD)*
- 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

PROTOCOLO DE PESQUISA

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:

Caveolina:

Tipos de TTO:

OBS:

ANEXO 3 - PROTOCOLO PARA REAÇÃO IMUNOISTOQUÍMICA

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 e pressão entre
- 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- PRODUÇÃO CIENTÍFICA RELACIONADA À TESE

1- APRESENTAÇÕES EM CONGRESSOS E ENCONTROS

Tema livre selecionado para apresentação oral e entre os 24 melhores trabalhos concorrentes a para premiação no XXVI Congresso Brasileiro de Patologia, Bento Gonçalves/RS, Brasil, 2007

DE BROT MA, CÚRCIO VS, SOARES FA, GOBBI H. Breast carcinomas with basal differentiation: a clinical, histopathological, and immunohistochemical study in Brazilian women. In: XXVI Congresso Brasileiro de Patologia, 2007, Bento Gonçalves. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*. São Paulo.2007;43.59.

Tema livre apresentado como pôster em Encontro de Pós –graduação

DE BROT MA, SOARES FA, CÚRCIO VS, GOBBI H. Frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal em mulheres brasileiras. I Encontro de Pós-Graduação em Patologia da UFMG, Belo Horizonte, 17 e 18 de abril de 2008.

2- ARTIGO COMPLETO ENVIADO PARA PUBLICAÇÃO EM PERIÓDICO

INDEXADO

DE BROT MA, SOARES FA, CÚRCIO VS, GOBBI H. Frequência de carcinomas mamários de fenótipo basal em mulheres brasileiras. Submetido em 22/4/2008 (artigo original, número de fluxo 429). *Revista da Associação Médica Brasileira* (RAMB).