

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE MEDICINA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Amanda Arantes Perez

**PERFIL MOLECULAR DOS CARCINOMAS DUCTAIS *IN*
SITU DE ALTO GRAU DA MAMA PUROS OU
ASSOCIADOS A CARCINOMA INVASOR: DETECÇÃO
POR IMUNOFENOTIPAGEM MOLECULAR**

BELO HORIZONTE

2010

AMANDA ARANTES PEREZ

PERFIL MOLECULAR DOS CARCINOMAS DUCTAIS *IN SITU* DE ALTO GRAU DA MAMA PUROS OU ASSOCIADOS A CARCINOMA INVASOR: DETECÇÃO POR IMUNOFENOTIPAGEM MOLECULAR

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

Área de concentração: Patologia Ginecológica e Reprodução Humana

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Helenice Gobbi

BELO HORIZONTE

FACULDADE DE MEDICINA DA UFMG

2010



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409-9640
cpg@medicina.ufmg.br



DECLARAÇÃO

A Comissão Examinadora abaixo assinada, composta pelos Professores Doutores: Helenice Gobbi/Orientadora, Márcio de Almeida Salles, Alfredo Ribeiro da Silva, aprovou a defesa da dissertação intitulada **“PERFIL MOLECULAR DOS CARCINOMAS DUCTAIS IN SITU DE ALTO GRAU DA MAMA PUROS OU ASSOCIADOS A CARCINOMA INVASOR: DETECÇÃO POR IMUNOFENOTIPAGEM MOLECULAR”** para obtenção do título de mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração em Patologia Ginecológica, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, realizada em 16 de dezembro de 2010.

Profa. Helenice Gobbi
Orientadora

Prof. Márcio de Almeida Salles

Prof. Alfredo Ribeiro da Silva



FACULDADE DE MEDICINA
CENTRO DE PÓS-GRADUAÇÃO

Av. Prof. Alfredo Balena 190 / sala 533
Belo Horizonte - MG - CEP 30.130-100
Fone: (031) 3409.9641 FAX: (31) 3409.9640
cpg@medicina.ufmg.br



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de **AMANDA ARANTES PEREZ**, nº de registro 2009655294. Às quatorze horas do dia dezesseis de dezembro de dois mil e dez, reuniu-se na Faculdade de Medicina da UFMG a Comissão Examinadora de dissertação indicada pelo Colegiado do Programa para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: **"PERFIL MOLECULAR DOS CARCINOMAS DUCTAIS IN SITU DE ALTO GRAU DA MAMA PUROS OU ASSOCIADOS A CARCINOMA INVASOR: DETECÇÃO POR IMUNOFENOTIPAGEM MOLECULAR"**, requisito final para a obtenção do grau de Mestre em Saúde da Mulher, pelo Programa de Pós-Graduação em Saúde da Mulher - Área de Concentração Patologia Ginecológica. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, Profa Helenice Gobbi, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho final, passou a palavra à candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu sem a presença da candidata e do público para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Profa. Helenice Gobbi/Orientadora	Instituição: UFMG	Indicação: <u>Aprovada</u>
Prof. Márcio de Almeida Salles	Instituição: HPM	Indicação: <u>Aprovado</u>
Prof. Alfredo Ribeiro da Silva	Instituição: FMRP/USP	Indicação: <u>APROVADA</u>

Pelas indicações a candidata foi considerada Aprovada.

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a sessão e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 16 de dezembro de 2010.

Profa. Helenice Gobbi Helenice Gobbi
 Prof. Márcio de Almeida Salles Márcio de Almeida Salles
 Prof. Alfredo Ribeiro da Silva Alfredo Ribeiro da Silva
 Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral/Coordenador Antônio Carlos Vieira Cabral

CONFERE COM O ORIGINAL

Obs.: Este documento não terá validade sem a assinatura e carimbo do Coordenador

Prof. Antônio Carlos Vieira Cabral
Coordenador do Programa de
Pós-Graduação em Saúde da Mulher
Faculdade de Medicina - UFMG

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Patologia Mamária da Faculdade de Medicina da UFMG e no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo, com apoio do CNPq, FAPEMIG e CAPES.

À minha mãe, Rosângela, por seu amor incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela vida e oportunidade de cuidar das pessoas.

À Professora Helenice, por me acolher nesta caminhada como sua filha. Obrigada pelos ensinamentos e momentos divididos!

À Iara e ao Iago, que mesmo distantes, ocupam um lugar importante no meu coração. Amo vocês!

À minha família: Francisco, Maria, Baninho e Dinda.

Às minhas amigas, em especial Alessandra e Fabiene, pessoas iluminadas que Deus colocou em meu caminho. Obrigada por fazerem parte da minha vida!

Ao Marcio, por acreditar em mim desde o começo. Minha eterna gratidão pelo carinho, cuidado e proteção!

Aos colegas do Laboratório de Patologia Mamária, especialmente à Débora, nossa “estatística oficial”, pela amizade e ajuda e ao Átila pela colaboração.

Ao Rafael e Ivan, que muito contribuíram no estudo imuno-histoquímico deste trabalho.

Ao Stanley, pela “assessoria fotográfica”.

Às pacientes, razão maior de nossa busca pelo conhecimento.

**“Porque sou do tamanho daquilo que vejo,
e não do tamanho da minha altura”.**

Carlos Drummond de Andrade

RESUMO

Introdução: Estudos recentes empregando microarranjos de DNA identificaram grupos distintos de tumores, com prognósticos diferentes, e desenvolveram uma nova classificação para os carcinomas mamários invasivos baseada no perfil molecular. Embora existam vários estudos sobre carcinomas mamários invasivos, poucos trabalhos avaliaram o perfil molecular por imuno-histoquímica dos carcinomas ductais *in situ* da mama. **Objetivos:** Avaliar as frequências dos diferentes fenótipos moleculares em uma série de casos de carcinomas ductais *in situ* de alto grau da mama puros ou associados a carcinoma invasor; comparar a frequência dos fenótipos moleculares nos componentes *in situ* e invasor; verificar a concordância dos fenótipos moleculares nos componentes *in situ* e invasor nos casos com os dois componentes tumorais associados. **Material e métodos:** Foram avaliados 121 casos de carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama, puros ou associados a componente invasor, diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG no período de 2003 a 2008. A avaliação imuno-histoquímica incluiu a pesquisa de receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP), superexpressão do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2), citoqueratinas 5 (CK5) e 14 (CK14) e expressão do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR/HER1). Os tumores foram classificados em cinco subgrupos de acordo com a classificação molecular: luminal A (RE+/HER2-/CK5-), luminal B (RE+/HER2+/CK5-), HER2 (RE-/HER2+/CK5-), basal (CK5+, independente de outros marcadores), “não classificável” (negatividade para todos os marcadores). **Resultados:** Entre os carcinomas ductais *in situ* puros, o fenótipo mais frequente foi o luminal A (24/42 casos; 57,1%), seguido pelo HER2 e tipo “não classificável” (6/42 casos; 14,3% para ambos), luminal B (5/42 casos; 11,9%) e fenótipo basal (1/42 casos; 2,4%). Entre os carcinomas ductais *in situ* associados a carcinoma invasor, o fenótipo luminal A também foi o mais frequente (44/79 casos; 55,7% e 50/77 casos; 64,9% respectivamente para os componentes *in situ* e invasor). O fenótipo HER2 correspondeu a 6/79 casos (7,6%) no componente *in situ* e 4/77 casos (5,2%) no componente invasor. O fenótipo basal foi observado em 10/79 casos (12,7%) no componente *in situ* e em 5/77 casos (6,5%) no

componente invasor. Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos diferentes fenótipos moleculares no carcinoma ductal *in situ* puro ou associado a componente invasor ($p > 0,05$). O fenótipo basal evidenciou tendência à maior positividade no grupo do carcinoma ductal *in situ* associado a componente invasor ($p = 0,095$). Excelente concordância entre os diferentes fenótipos moleculares nos componentes *in situ* e invasor foi observada ($kappa = 0,823$). **Conclusões:** A distribuição de frequência dos fenótipos moleculares observada em nosso estudo foi semelhante à descrita em trabalhos anteriores. Nossos resultados demonstram boa concordância entre carcinomas ductais *in situ* e carcinomas mamários invasivos sincrônicos em relação aos diferentes fenótipos moleculares.

Palavras-chave: carcinoma ductal *in situ*, imuno-histoquímica, perfil molecular, fenótipo basal

ABSTRACT

Introduction: Recent studies using cDNA microarrays identified distinct groups of tumours, with different prognosis, and developed a new classification of breast carcinomas based on molecular profile. Many studies evaluated invasive breast carcinomas, but few studies evaluated the molecular profile of ductal carcinomas in situ of the breast based on immunohistochemistry. **Purpose:** To evaluate the frequency of different molecular profiles in a series of cases of high grade ductal carcinomas in situ of the breast, pure or associated to invasive carcinoma; to compare the frequency of molecular profiles in components in situ and invasive; to verify the agreement of molecular profiles between both components in cases containing in situ associated to invasive components.

Material and methods: One hundred and twenty-one cases of high grade ductal breast carcinomas in situ, pure or associated to invasive carcinoma assessed at the *Hospital das Clínicas* from Federal University of Minas Gerais from 2003 to 2008. The immunohistochemical assessment included estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR), HER2 overexpression (HER2), cytokeratins 5 (CK5) and 14 (CK14) and expression of the epidermal growth factor receptor (EGFR/ HER1). The tumours were classified in five subgroups according the molecular classification: luminal A (ER+/HER2-/CK5-), luminal B (ER+/HER2+/CK5-), HER2 (ER-/HER2+/CK5-), basal (CK5+, regardless of others markers); “not classified” (all markers negative). **Results:** Among pure ductal carcinomas in situ, the phenotype more frequent was luminal A (24/42 cases; 57.1%), afterwards the HER2 and “not classified” phenotypes (6/42 cases; 14.3% for both), luminal B (5/42 cases; 11.9%) and basal phenotype (1/42 cases; 2.4%). Among ductal carcinomas in situ associated to invasive carcinomas, the luminal A phenotype also was more frequent (44/79 cases; 55.7% and 50/77 cases; 64.9% respective to carcinoma in situ and invasive). The HER2 phenotype corresponded to 6/79 cases (7.6%) in ductal carcinoma in situ and 4/77 cases (5.2%) in invasive carcinoma. Basal phenotype was observed in 10/79 cases (12.7%) in carcinoma in situ and 5/77 cases (6.5%) in invasive component. There was no significant difference among the frequencies

of different molecular phenotypes in pure ductal carcinoma in situ or associated to invasive component ($p > 0.05$). Basal phenotype showed tendency to higher positivity in ductal carcinoma in situ associated to invasive component ($p = 0,095$). Excellent agreement among different molecular phenotypes in both components in situ and invasive was observed ($\kappa = 0,823$). **Conclusions:** Our results showed similar frequency distributions of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ of the breast were observed in previous studies. Our results showed good agreement between ductal carcinomas in situ and synchronic invasive carcinomas with relation to different molecular phenotypes.

Key words: ductal carcinoma in situ, molecular profile, basal phenotype

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BI-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
BLS	Biópsia de linfonodo sentinela
CC1	<i>Cell Conditioning 1</i>
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CI	Carcinoma invasor
CK	Citoqueratina
CMFB	Carcinoma mamário de fenótipo basal
COEP	Comitê de ética em pesquisa
DNA	Ácido desorribonucléico
EA	Esvaziamento axilar
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico 1
EUA	Estados Unidos da América
HC/UFMG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Minas Gerais
HE	Hematoxilina-eosina
HER1	Receptor do fator de crescimento epidérmico 1

HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico 2
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ki67	Proteína expressa na proliferação celular
MIB-1	Anticorpo contra a proteína Ki67
NA	Não se aplica
p	Nível de significância
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SOE	Sem outra especificação
TNM	Classificação de tumores malignos (T: extensão do tumor primário; N: metástase em linfonodos regionais; M: metástase à distância)

LISTA DE FIGURAS, QUADROS E TABELAS

FIGURAS

Figura 1 – Positividade dos receptores de estrógeno e progesterona nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x). Em A, receptor de estrógeno. Em B, receptor de progesterona..... 52

Figura 2 – Positividade do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x)..... 52

Figura 3 – Positividade das citoqueratinas 5 e 14 nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x). Em A, citoqueratina 5. Em B, citoqueratina 14..... 53

Figura 4 – Positividade do receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR) nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x). Em A, componente *in situ*. Em B, componente invasor..... 53

QUADROS

Quadro 1 – Critérios para graduação histológica do carcinoma ductal *in situ* – Classificação de SCOTT, 1997; modificada de Lagios, 1990..... 37

Quadro 2 – Sistema de graduação histológica dos tumores da mama segundo ELSTON & ELLIS, 1991; modificado da classificação de BLOOM & RICHARDSON, 1957..... 39

Quadro 3 – Guia de interpretação do HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologia..... 42

TABELAS

Tabela 1 – Anticorpos primários, diluições, fabricantes e tipo de recuperação antigênica utilizados nas reações imuno-histoquímicas.....	41
Tabela 2 – Características clínicas das pacientes com carcinoma ductal <i>in situ</i> de alto grau da mama puro ou associado a componente invasor.....	46
Tabela 3 - Alterações mamográficas, lateralidade do tumor e tipo de cirurgia realizada em pacientes com carcinoma ductal <i>in situ</i> de alto grau da mama puro ou associado a componente invasor.....	47
Tabela 4 – Características histopatológicas dos carcinomas ductais <i>in situ</i> de alto grau da mama puros ou associados a componente invasor.....	48
Tabela 5 – Características histopatológicas do componente invasor associado ao carcinoma ductal <i>in situ</i> de alto grau da mama.....	49
Tabela 6 – Positividade dos marcadores moleculares nos casos de carcinoma ductal <i>in situ</i> de alto grau da mama puro e associado a carcinoma invasor....	51
Tabela 7 – Classificação molecular do carcinoma ductal <i>in situ</i> de alto grau da mama puro e do componente invasor associado.....	55
Tabela 8 – Correlação entre o fenótipo basal e o fenótipo triplo-negativo no componente <i>in situ</i> de carcinomas ductais <i>in situ</i> associados a componente invasor.....	57
Tabela 9 – Correlação entre o fenótipo basal e o fenótipo triplo-negativo no componente invasor de carcinomas ductais <i>in situ</i> associados a componente invasor.....	57

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Câncer de mama: importância, heterogeneidade, fatores prognósticos e preditivos	19
1.2. Carcinoma ductal <i>in situ</i> da mama	20
1.3. Classificação molecular do câncer de mama	22
1.4. Carcinomas mamários de fenótipo basal	23
1.4.1. Histórico	23
1.4.2. Definição	24
1.4.3. Frequência	26
1.4.4 Características clínicas	27
1.4.5. Características patológicas	27
1.4.6. Implicações terapêuticas	28
1.5. Carcinoma ductal <i>in situ</i> de fenótipo basal	29
2. JUSTIFICATIVA	31
3. OBJETIVOS	33
4. MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1. Dados clínicos	34
4.2. Dados histopatológicos dos laudos originais	35
4.3. Revisão histopatológica	35

4.3.1. Classificação histológica dos tumores	36
4.3.2. Graduação histológica	37
4.4. Estudo imuno-histoquímico	40
4.4.1. Técnica imuno-histoquímica	40
4.4.2. Avaliação das reações imuno-histoquímicas	42
4.5. Análise estatística	44
5. RESULTADOS	45
6. DISCUSSÃO	58
7. CONCLUSÕES	62
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	64
9. APÊNDICES	70
Apêndice 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	70
Apêndice 2 – Protocolo de Pesquisa	71
Apêndice 3 – Protocolo para reação imuno-histoquímica	73

1. INTRODUÇÃO

1.1. Câncer de mama: importância, heterogeneidade, fatores prognósticos e preditivos

O câncer de mama representa o segundo tipo de neoplasia mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres, sendo responsável por elevadas taxas de mortalidade e grande morbidade. Sua incidência vem aumentando nas últimas décadas, com estimativa de 49.240 novos casos no Brasil em 2010 (INCA, 2010).

Sabe-se que o câncer de mama compreende um grupo heterogêneo de doenças, com diferentes formas de apresentação clínica, características morfológicas e imuno-histoquímicas variadas, resposta à terapêutica e prognósticos distintos (REIS-FILHO & TUTT, 2008; RAKHA & ELLIS, 2009a; RAKHA *et al.*, 2009b, RAKHA & REIS-FILHO, 2009c).

A maioria do conhecimento sobre evolução e prognóstico refere-se ao carcinoma invasor. No entanto, com os programas de rastreamento, evidencia-se aumento significativo dos casos de carcinoma ductal *in situ* da mama (INCA, 2010), tornando-se necessário melhor entendimento do significado clínico e prognóstico desta entidade.

Fatores prognósticos em câncer de mama compreendem características clínicas dos pacientes e aspectos patológicos e biológicos dos tumores que determinam a evolução clínica da doença, isto é, a probabilidade, à época do diagnóstico ou tratamento cirúrgico, de recorrência da neoplasia e a sobrevida

global do paciente sem tratamento adjuvante. Fatores preditivos, em contraste, são características clínicas, patológicas e biológicas utilizadas para estimar a probabilidade de resposta a um tipo específico de terapia adjuvante. Marcadores prognósticos e preditivos devem ser validados tecnicamente, ter significado estatístico comprovado por testes clínicos e influenciar na decisão clínica (ALLRED *et al.*, 1998; FITZGIBBONS *et al.*, 2000; SOERJOMATARAM *et al.*, 2008; GOLDBIRSCH *et al.*, 2009).

Atualmente, o *status* axilar constitui o principal fator isolado para avaliar o prognóstico de pacientes com câncer de mama. Outros fatores prognósticos estão bem estabelecidos na literatura, como o tipo histológico, tamanho tumoral, grau nuclear ou histológico, *status* dos receptores hormonais (estrógeno e progesterona), superexpressão do Her2/neu, MIB-1 (Ki-67) e mutações do gene p53 (SOERJOMATARAM *et al.*, 2008; GOLDBIRSCH *et al.*, 2009). Entretanto, esses marcadores prognósticos tradicionais apresentam limitações na individualização do risco evolutivo de pacientes com características clínico-patológicas semelhantes e que apresentam prognósticos distintos.

1.2. Carcinoma ductal *in situ* da mama

Carcinoma ductal *in situ* da mama (CDIS) é definido como proliferação epitelial atípica com crescimento limitado pela membrana basal do epitélio ductal, sem evidência de invasão do estroma (ELLIS *et al.*, 1998).

Representava, até a década de 1980, cerca de 3 a 5% dos carcinomas de mama, porém, após a introdução de programas de rastreamento mamográfico nos EUA e Europa, evidenciou-se aumento importante em sua incidência,

correspondendo a 15 a 30% de todos os tumores de mama diagnosticados (O'SULLIVAN & MORROW, 2007).

O CDIS apresenta-se biologicamente heterogêneo, com características clínicas, patológicas e moleculares distintas. Dados sugerem que o CDIS representa um estágio no desenvolvimento do câncer de mama, no qual a maioria das alterações moleculares que caracterizam o câncer de mama já estaria presente (BUERGER *et al.*, 1999a).

A classificação patológica do CDIS baseia-se no grau nuclear, no padrão arquitetural e na presença ou ausência de comedonecrose (LAGIOS *et al.*, 1989; SCOTT *et al.*, 1999; CONSENSUS CONFERENCE, 1997). O grau histológico, a dimensão da lesão e o tamanho das margens cirúrgicas são utilizados para avaliar o prognóstico e a probabilidade de recorrência do CDIS, auxiliando na definição do melhor tipo de tratamento cirúrgico e necessidade de radioterapia pós-operatória (SILVERSTEIN *et al.*, 1996).

Estudos de genética molecular têm demonstrado que carcinomas ductais invasivos de baixo e alto grau histológico têm origem em diferentes vias patogênicas: os de baixo grau tendo origem em carcinomas *in situ* de baixo grau e os de alto grau em carcinomas *in situ* de alto grau (BUERGER *et al.*, 1999b; ABDEL-FATAH *et al.*, 2008).

O perfil de expressão gênica de CDIS de alto grau histológico difere das lesões de baixo grau. Observa-se boa concordância, porém incompleta, entre CDIS e carcinomas mamários invasivos sincrônicos em relação ao grau histológico, *status* do receptor hormonal, HER2 e p53 (ALLRED, 2002).

1.3. Classificação molecular do câncer de mama

Até recentemente, a classificação dos carcinomas mamários baseava-se essencialmente em seus aspectos morfológicos (ELSTON & ELLIS, 1998; PAGE *et al.*, 1998). Tumores classificados sob um mesmo termo descritivo podem ter aspectos moleculares e evolução biológica variados. A heterogeneidade molecular do câncer de mama, não avaliável morfológicamente, representa grande desafio ao estudo e tratamento desta doença (GOLDHIRSCH *et al.*, 2009).

Estudos recentes empregando técnicas de hibridização genômica comparativa e microarranjos de DNA identificaram grupos distintos de tumores e desenvolveram uma nova classificação para os carcinomas mamários baseada no perfil molecular (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003). Conforme esta classificação, os carcinomas mamários são divididos em cinco subgrupos, com prognósticos diferentes:

- **Luminal A:** expressam genes e proteínas tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama (positividade para receptores de estrógeno e progesterona; negatividade para HER2);
- **Luminal B:** expressam genes e proteínas tipicamente expressos pelas células epiteliais luminais da mama e pelo grupo de tumores com superexpressão de HER2 (positividade para receptores de estrógeno, progesterona e HER2);
- **Tumores com superexpressão de HER2:** superexpressão de HER2 (negatividade para receptores de estrógeno e progesterona; positividade para HER2);
- **Tipo basal:** expressam genes e proteínas característicos das células basais / mioepiteliais da mama (negatividade para receptores de estrógeno, progesterona e HER2; expressão de citoqueratinas basais);

- **Não classificável:** expressam genes e proteínas semelhantes aos expressos nas amostras de parênquima mamário normal e fibroadenomas (negatividade para todos os marcadores referidos acima).

Sabe-se que o perfil gênico é considerado “padrão ouro” na avaliação molecular dos subtipos de carcinomas mamários. Entretanto, apresenta limitações, dificuldades técnicas e alto custo, impossibilitando sua utilização na prática clínica até o momento atual. Vários estudos foram realizados na tentativa de caracterizar os diferentes subtipos empregando a imunohistoquímica, revelando boa correlação entre o perfil gênico e a expressão protéica pela imunohistoquímica (NIELSEN *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2005; LIVASY *et al.*, 2006; RAKHA *et al.*, 2006a; RAKHA *et al.*, 2007b). O método imunohistoquímico permite que a classificação molecular seja realizada em amostras de tecido conservado em parafina e apresenta custo acessível para utilização na prática clínica e em pesquisa.

1.4. Carcinomas mamários de fenótipo basal

1.4.1. Histórico

A classificação molecular proposta por Perou *et al.* (2000) despertou o interesse de pesquisadores no estudo dos carcinomas mamários de fenótipo basal, embora tais tumores tivessem sido descritos anteriormente por outros autores. Na década de 60, Murad e Scharpelli demonstraram que uma proporção de carcinomas mamários apresentava diferenciação mioepitelial (MURAD & SCHARPELLI, 1967). Moll e colaboradores descreveram perfis específicos de citoqueratinas para a mama normal e para lesões mamárias

benignas e malignas, demonstrando que 2 a 18% de todos os carcinomas de mama e mais de 25% dos tumores grau III expressavam citoqueratinas de alto peso molecular e apresentavam o fenótipo basal ou mioepitelial (MOLL *et al.*, 1983). Posteriormente, evidenciou-se que estes tumores apresentavam negatividade para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2 (MALZAHN *et al.*, 1998).

1.4.2. Definição

Os carcinomas mamários de fenótipo basal (CMFB), também chamados carcinomas basais, tumores basais ou basalóides, são definidos através de perfis de expressão gênica e/ou imuno-histoquímica. Segundo Perou *et al.*, estes tumores apresentam perfis gênico e protéico semelhantes aos das células mioepiteliais/basais da mama normal e caracterizam-se pela negatividade para receptores de estrógeno, progesterona e HER2 e expressão de citoqueratinas (CK) de alto peso molecular (CK5 e 17) e laminina (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003).

A maioria dos estudos define o fenótipo basal através da avaliação imuno-histoquímica, já que técnicas que utilizam microarranjos de DNA propostas por Perou *et al.* apresentam ainda alto custo. Vários autores demonstraram boa correlação entre o perfil gênico e a avaliação imuno-histoquímica (NIELSEN *et al.*, 2004; MATOS *et al.*, 2005; LIVASY *et al.*, 2006; RAKHA *et al.*, 2006a, RAKHA *et al.*, 2006b; RAKHA *et al.*, 2007a; RAKHA *et al.*, 2007b). Entretanto, ainda não há consenso na literatura internacional em relação aos marcadores que melhor definem e identificam os tumores basais (FADARE & TAVASSOLI, 2007).

A imunopositividade para citoqueratinas de alto peso molecular (CK5 ou CK5/6) tem sido utilizada pela maioria dos autores para a definição do fenótipo basal (ABD EL-REHIM *et al.*, 2005; RAKHA *et al.*, 2006a; RAKHA *et al.*, 2006b; RAKHA *et al.*, 2007a; RAKHA *et al.*, 2007b; MATOS *et al.*, 2005). Outros marcadores têm sido utilizados como requisitos para definir os tumores basais: CK14 (ABD EL-REHIM *et al.*, 2005; RAKHA *et al.*, 2006a; RAKHA *et al.*, 2006b; RAKHA *et al.*, 2007a), CK17 (van de Rijn *et al.*, 2002), receptor do fator de crescimento epidérmico - EGFR (NIELSEN *et al.*, 2004), c-kit (KIM *et al.*, 2006), p63 (MATOS *et al.*, 2005), p-caderina (MATOS *et al.*, 2005) e actina de músculo liso (ABD EL-REHIM *et al.*, 2004).

Alguns autores consideram necessária a perda de imunorreatividade para os receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e HER2, além da expressão de marcadores mioepiteliais, para caracterizar os carcinomas basais (MATOS *et al.*, 2005), embora outros não apresentem esta exigência (RAKHA *et al.*, 2007b).

Rakha e colaboradores avaliaram a expressão de citoqueratinas basais (CK5/6 e CK14), receptores de estrógeno, progesterona e androgênio, EGFR, HER2, BRCA1, p-caderina, e marcadores mioepiteliais (actina de músculo liso e p63) em uma série de carcinomas invasivos da mama (1872 casos) com longo tempo de seguimento e utilizando microarranjos de tecidos e imunohistoquímica. Embora os marcadores adicionais estivessem associados às citoqueratinas basais, estes não auxiliaram na identificação do fenótipo basal quando comparados às citoqueratinas isoladas. Quando os marcadores adicionais foram utilizados para definir o fenótipo basal, houve redução da proporção de casos alocados no grupo de pior prognóstico. Estes autores propuseram que as citoqueratinas basais poderiam definir o fenótipo basal, independente de outros marcadores (RAKHA *et al.*, 2007b).

Nielsen *et al.* realizaram estudo imuno-histoquímico utilizando blocos de parafina provenientes dos tumores de fenótipo basal previamente identificados por Sorlie *et al.* (2001) em seus trabalhos com microarranjos de DNA. Foram avaliados CK5/6, EGFR, c-kit, receptores de estrógeno e HER2. Estes autores propuseram um painel de quatro anticorpos (receptor de estrógeno, HER2, CK5/6 e EGFR) para identificar o fenótipo basal, com sensibilidade de 76% e especificidade de 100%. A expressão de citoqueratinas 5/6 e EGFR associou-se à menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global (NIELSEN *et al.*, 2004).

Tumores basais são freqüentemente triplo-negativos, isto é, apresentam negatividade para receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e HER2 (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003). Entretanto, os termos fenótipo basal e triplo-negativo não são sinônimos. Alguns CMFB podem apresentar superexpressão do oncogene Her2/neu, assim como alguns tumores triplo-negativos não apresentam características basais (REIS-FILHO & TUTT, 2008; RAKHA & ELLIS, 2009a; DIAZ *et al.*, 2007).

1.4.3. Frequência

Os tumores do tipo basal representam cerca de 15% dos carcinomas invasivos da mama, variando de 2 a 18%, conforme os diferentes critérios imuno-histoquímicos empregados (REIS-FILHO & TUTT, 2008; SILVA *et al.*, 2008). Entre os carcinomas triplo-negativos (negativos para receptores de estrógeno, progesterona e HER2), sua freqüência ultrapassa 50% (RAKHA *et al.*, 2007a; DE BROT *et al.*, 2009).

1.4.4. Características clínicas

Carcinomas basais são mais frequentes em mulheres mais jovens quando comparados a outros carcinomas de grau III, com média de idade de 49,9 anos versus 53,9 anos (FULFORD *et al.*, 2006). Em estudo populacional na Carolina do Norte, Carey *et al.* identificaram maior prevalência do fenótipo basal em mulheres afro-americanas na pré-menopausa (39%), quando comparadas às mesmas mulheres na pós-menopausa (14%) e às mulheres brancas de qualquer idade (16%), com significância estatística ($p < 0,001$) (CAREY *et al.*, 2006). Entretanto, no Brasil, com população geneticamente miscigenada, estudos de nosso grupo não confirmaram esta diferença de frequência quanto à etnia (DE BROT *et al.*, 2009) e quanto à faixa etária (DUTRA *et al.*, 2009).

Tumores basais desenvolvem mais frequentemente metástases hematogênicas, principalmente para cérebro e pulmões e, menos frequentemente, para ossos e fígado (SILVA *et al.*, 2007; FADARE & TAVASSOLI, 2007; MONFAIR, 2008).

O fenótipo basal associa-se a comportamento clínico mais agressivo e a pior prognóstico, apresentando menor sobrevida livre de doença e menor sobrevida global (PEROU *et al.*, 2000; SORLIE *et al.*, 2001; SORLIE *et al.*, 2003; CAREY *et al.*, 2006; NIELSEN *et al.*, 2004; VAN DE RIJN *et al.*, 2002; RAKHA *et al.*, 2006b; RAKHA *et al.*, 2007b).

1.4.5. Características patológicas

Morfologicamente, os CMFB caracterizam-se por apresentarem alto grau histológico, alto índice mitótico, áreas de necrose central, bordas expansivas e

infiltrado inflamatório peri-tumoral. As duas últimas características são encontradas em carcinomas medulares. Também podem ser visualizados elementos metaplásicos, incluindo diferenciação escamosa e de células fusiformes, frequentemente encontrados em carcinomas metaplásicos (REIS-FILHO & TUTT, 2008; RAKHA & ELLIS, 2009a; RAKHA *et al.*, 2009b; SILVA *et al.*, 2007; FADARE & TAVASSOLI, 2007).

1.4.6. Implicações terapêuticas

Carcinomas basais são, em sua maioria, tumores triplo-negativos (negativos para receptores de estrógeno, progesterona e HER2), de alto grau histológico e linfonodo-negativos. Terapias endócrinas e anti-HER2 não constituem opções para o tratamento destas lesões, sendo a quimioterapia a única terapia sistêmica disponível atualmente. Embora apresentem pior prognóstico, os tumores basais apresentam elevados índices de resposta objetiva a esquemas de quimioterapia neoadjuvante com antraciclinas e taxanes (ROUZIER *et al.*, 2005; CAREY *et al.*, 2007).

Mais de 66% dos carcinomas de fenótipo basal expressam positividade para EGFR (NIELSEN *et al.*, 2004; RAKHA *et al.*, 2007a). Portanto, terapias alvo específicas como anticorpos monoclonais anti-EGFR e inibidores da tirosina quinase do receptor poderiam constituir opções promissoras para o tratamento sistêmico destes tumores (MENDELSON & BASELGA, 2006).

1.5. Carcinoma ductal *in situ* de fenótipo basal

Embora existam vários estudos sobre carcinomas mamários invasivos de fenótipo basal, poucos trabalhos avaliaram carcinomas ductais *in situ* de fenótipo basal. Bryan *et al.* avaliaram 66 casos de carcinomas ductais *in situ* (CDIS) de alto grau e encontraram uma frequência de 6% de fenótipo triplo-negativo. Todos os casos triplo-negativos foram positivos para citoqueratinas basais (CK5/6, CK14, CK17), EGFR ou ambos (BRYAN *et al.*, 2006).

Dabbs *et al.* avaliaram um grupo de mulheres abaixo de 37 anos apresentando carcinomas mamários invasores triplo-negativos (n=16) e encontraram CDIS associado em 13 casos. Todos os casos de CDIS demonstravam características morfológicas e imunofenóticas semelhantes aos carcinomas invasores (receptores para estrógeno e progesterona e HER-2 negativos e positividade para CK5/6, CK14, CK17, vimentina e EGFR) (DABBS *et al.*, 2006).

Livasy *et al.* observaram uma prevalência de 8% de CDIS de fenótipo basal (receptor de estrógeno e HER2 negativos, positividade para EGFR e/ou CK5/6) em um total de 245 casos de CDIS puros. O CDIS de fenótipo basal estava associado com variáveis de pior prognóstico, incluindo alto grau nuclear, expressão de p53 e alta marcação pelo Ki67 (LIVASY *et al.*, 2007).

Paredes *et al.* demonstraram que aproximadamente 10% dos carcinomas ductais *in situ* são negativos para receptores de estrógeno, HER2 e expressam pelo menos um marcador basal: CK5, CK14, P-caderina, p63, EGFR ou vimentina (PAREDES *et al.*, 2007).

Tamimi *et al.* avaliaram uma população de 2897 mulheres participantes do *Nurses' Health Study* e encontraram maior prevalência do fenótipo basal (negativos para receptores de estrógeno, progesterona e HER2 e positivos para CK5/6 e/ou EGFR) em carcinomas invasores (10,9%) em relação ao CDIS (7,7%), embora sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,15$) (TAMIMI *et al.*, 2008).

Os dados desta revisão demonstram que a caracterização molecular do carcinoma ductal *in situ* da mama ainda é pouco estudada. O uso da imunohistoquímica para classificar estes tumores também mostra variações de critérios, que implicam em resultados diferentes nos poucos trabalhos realizados. Novos estudos são importantes para melhor caracterizar os carcinomas ductais *in situ* do ponto de vista molecular.

2. JUSTIFICATIVA

O fenótipo basal constitui um subgrupo de tumores de mama de grande interesse, tendo em vista seu comportamento agressivo, prognóstico ruim e ausência de terapias alvo específicas para sua abordagem. Embora seja tema de vários estudos, a maioria dos trabalhos avaliou carcinomas basais invasivos, existindo poucos estudos na literatura sobre carcinomas *in situ* da mama de fenótipo basal.

Com base no modelo em que CMFB, tumores agressivos e de pior prognóstico, possam ter como precursores os carcinomas ductais *in situ* de fenótipo basal, acreditamos que melhor caracterização destes últimos seja necessária, ressaltando a necessidade de investigações e tratamentos mais agressivos direcionados a novos alvos terapêuticos.

Decidimos estudar uma série de carcinomas ductais *in situ* de alto grau da mama puros ou associados a carcinomas invasores, a fim de responder às seguintes questões:

- Qual o perfil molecular dos carcinomas ductais *in situ* de alto grau da mama?
- Qual a frequência do fenótipo basal entre carcinomas ductais *in situ* de alto grau da mama?
- Qual a concordância entre os marcadores de fenótipo basal nos carcinomas ductais *in situ* puros e naqueles com componente invasor associado?
- A expressão dos marcadores moleculares nos componentes *in situ* e invasor é semelhante?

- As características clínicas das pacientes e morfológicas dos carcinomas ductais *in situ* e invasores de fenótipo basal da mama são semelhantes?

3. OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

1. Avaliar as frequências dos diferentes fenótipos moleculares (luminal A, luminal B, HER2, basal e “não classificável”) em uma série de casos de carcinomas ductais *in situ* de alto grau da mama puros ou associados a carcinomas invasores, com ênfase no fenótipo basal;
2. Comparar a frequência dos fenótipos moleculares dos componentes *in situ* e invasor dos casos de carcinomas ductais *in situ* associados a carcinoma invasor, com ênfase no fenótipo basal;
3. Verificar a concordância da expressão dos marcadores moleculares nos componentes *in situ* e invasor nos casos associados;
4. Determinar possíveis associações entre a ocorrência do fenótipo basal e características clínicas das pacientes (idade, estado menopausal e presença de alteração ao exame clínico), tipo de cirurgia realizada, características do carcinoma *in situ* (extensão do tumor e da necrose, presença de microinvasão e lateralidade) e do carcinoma invasor associado (tamanho, tipo e grau histológico), acometimento axilar e estadiamento TNM.

4. MATERIAL E MÉTODOS

Trata-se de estudo de série de casos de pacientes com diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama, puro ou associado a componente invasor, diagnosticados no Hospital das Clínicas da UFMG no período de 2003 a 2008.

Os critérios de inclusão no estudo foram:

- Pacientes do sexo feminino submetidas à biópsia mamária no Hospital das Clínicas da UFMG (HC/UFMG) no período de 2003 a 2008 e com diagnóstico de CDIS da mama de alto grau, puro ou associado a componente invasor;
- Não ter sido submetida à quimioterapia neoadjuvante;
- Disponibilidade de lâminas e blocos de parafina para reavaliação dos casos e realização de estudo imuno-histoquímico.

4.1. Dados clínicos

Os dados clínicos analisados neste estudo foram obtidos a partir das requisições de exames histopatológicos arquivados no Laboratório de Patologia Mamária do HC/UFMG. Foram coletados em protocolo específico (Apêndice 2) os seguintes dados: idade ao diagnóstico inicial, cor (branca, negra, parda ou amarela), estado menopausal (pré ou pós-menopausa), alterações clínicas e mamográficas ao diagnóstico, lateralidade e tipo de cirurgia realizada.

4.2. Dados histopatológicos dos laudos originais

Os dados histopatológicos foram coletados dos laudos anátomo-patológicos e/ou relatórios prévios arquivados no Laboratório de Patologia Mamária do HC/UFMG. Foram coletados os seguintes dados: classificação morfológica do carcinoma ductal *in situ* (sólido, papilar, micropapilar, cribriforme, misto), tamanho e extensão tumoral, presença e extensão de necrose tipo comedo, graduação histológica, margens cirúrgicas (tamanho da menor margem), presença de microinvasão, presença de carcinoma ductal invasor associado, classificação e graduação histológica do componente invasor.

Os tumores foram estadiados em relação ao tamanho, comprometimento axilar e presença de metástases segundo o sistema de estadiamento TNM (AJCC, 2002).

4.3. Revisão histopatológica

As lâminas originais coradas pelo método de hematoxilina-eosina (HE) foram revistas por dois observadores (AAP e HG), confirmando-se o diagnóstico inicial e analisando as características morfológicas das lesões. Durante a revisão, foram definidos os blocos que apresentavam melhor representatividade dos tumores para realização de novos cortes e técnica imuno-histoquímica. Os casos cujas amostras exibiram artefatos de autólise ou sinais de processamento inadequado foram excluídos do estudo, pois tecidos fixados de forma inadequada podem alterar as reações imuno-histoquímicas.

4.3.1. Classificação histológica dos tumores

Os critérios propostos por Page foram utilizados para o diagnóstico histopatológico de CDIS. Lesões maiores que 2 a 3mm e que preenchem totalmente dois ductos são diagnosticadas como CDIS (PAGE & ANDERSON, 1987).

A classificação morfológica do CDIS foi realizada utilizando os critérios da Organização Mundial de Saúde, dividindo-se o CDIS em sólido, papilar, micropapilar, cribriforme e misto (OMS, 2003).

Para o diagnóstico de microinvasão, foram considerados os critérios de Elston & Ellis, que definem microinvasão como um CDIS predominante, com um a três focos de invasão de dimensão menor que 1mm além da membrana basal epitelial, no tecido conjuntivo não especializado ou extra-lobular (ELSTON & ELLIS, 1998).

Os carcinomas invasores foram classificados quanto ao tipo histológico considerando-se as recomendações de Page (PAGE *et al.*, 1998) e critérios adotados pelo Colégio Americano de Patologia (FITZGIBBONS *et al.*, 2000). 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, é considerado carcinoma ductal invasor SOE.

4.3.2. Graduação histológica

Para a graduação histológica do CDIS utilizamos a classificação de Scott (SCOTT *et al.*, 1997), modificada de Lagios (1990) (Quadro 1):

- O grau nuclear é determinado de acordo com o pleomorfismo nuclear, o tamanho do núcleo e a presença de nucléolo.
- O tamanho do núcleo é avaliado pela comparação com os núcleos de ductos mamários adjacentes: pequeno (1 a 2 vezes), intermediário (3 a 4 vezes) e grande (5 vezes ou mais).
- Núcleos grau 1 mostram monomorfismo, tamanho pequeno ou intermediário e nucléolo pouco evidente; núcleos grau 2 exibem pleomorfismo discreto, tamanho pequeno ou intermediário e, quase sempre, um nucléolo evidente; núcleos grau 3 apresentam pleomorfismo acentuado, tamanho intermediário ou grande, e múltiplos e grandes nucléolos.
- Necrose só é considerada quando se visualizam pequenas ou grandes áreas de necrose do tipo comedo; necrose de células isoladas não é considerada para a classificação.

QUADRO 1: Critérios para graduação histológica do carcinoma ductal *in situ* - Classificação de SCOTT, 1997 *

Histologia	Grau Nuclear	Necrose	Grau histológico
Comedo	Alto	Extensa	Alto
Intermediário	Intermediário	Focal ou ausente	Intermediário
Não-comedo	Baixo	Ausente	Baixo

*Modificada de Lagios (1990)

Para a avaliação do grau histológico do componente invasor, utilizamos o Sistema de Nottingham (ELSTON & ELLIS, 1998), classificando o tumor como bem diferenciado (baixo grau ou grau I), moderadamente diferenciado (grau intermediário ou grau II) ou pouco diferenciado (alto grau ou grau III). Nesta classificação avaliam-se três fatores (formação tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica) através de 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; *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. 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 cinco mitoses são encontradas em 10 campos de grande aumento (*high power fields* ou HPF); valor 2 entre 6 e 10 mitoses por 10 HPF; valor 3 se há mais de 11 mitoses por 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 ou 5; grau II, com valores 6 ou 7; grau III se os valores são 8 ou 9 (Quadro 2).

QUADRO 2: 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 e 75% da área tumoral
	Pontuação 3: < 10% da área tumoral
Atipia nuclear	Pontuação 1: núcleos de tamanho normal
	Pontuação 2: núcleos de tamanho intermediário
	Pontuação 3: núcleos grandes e pleomórficos
Índice mitótico	Pontuação 1: 1 mitose por campo de grande aumento
	Pontuação 2: 2 mitoses por campos de grande aumento
	Pontuação 3: 3 ou mais mitoses por campo de grande aumento

*Modificado da classificação de BLOOM & RICHARDSON (1957)

4.4. Estudo imuno-histoquímico

4.4.1. Técnica imuno-histoquímica

Foram selecionados para estudo imuno-histoquímico apenas casos cujas amostras não exibiam artefatos de processamento ou fixação (autólise), com o objetivo de não interferir na qualidade das reações imuno-histoquímicas.

O estudo imuno-histoquímico incluiu a pesquisa de receptores hormonais (estrógeno e progesterona), HER2, CK5, CK14 e EGFR (HER-1) nos componentes *in situ* e invasor.

A partir dos blocos de parafina com a melhor amostra do tumor, foram confeccionados novos cortes histológicos de 4µm. Os cortes histológicos foram colocados em lâminas com carga elétrica para que não se soltassem durante a execução da técnica de imuno-histoquímica. As reações foram realizadas em equipamento automatizado (BenchMark XT/LT – Ventana), utilizando-se o kit UltraView Universal DAB REF 760-500 – Ventana, conforme protocolo do fabricante. As colorações imuno-histoquímicas para o EGFR foram realizadas manualmente, utilizando o protocolo *Envision FLEX* (DAKO) (Apêndice 3). Os anticorpos primários, clones, diluições, fabricantes e recuperação antigênica utilizados nas reações imuno-histoquímicas estão descritos na Tabela 1. As reações imuno-histoquímicas foram realizadas em colaboração, no Hospital do Câncer A.C. Camargo de São Paulo.

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

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Recuperação antigênica
RE	SP1	Ready to use	DAKO	CC1 pH alto (Ventana)
RP	PgR 636	Ready to use	DAKO	CC1 pH alto (Ventana)
HER2	CB11	1/1000	NovoCastra	CC1 pH alto (Ventana)
CK5	XM26	1/50	NeomarKers	CC1 pH alto (Ventana)
CK14	LL002	1/1000	Thermo Scientific	CC1 pH alto (Ventana)
EGFR	31G7	1/25	Zymed	FLEX pH alto (DAKO)

CC1: *Cell Conditioning* 1 – recuperação antigênica por calor úmido

4.4.2. Avaliação das reações imuno-histoquímicas

Na avaliação dos receptores de estrógeno e progesterona foi empregado o sistema de escore de Allred. Foram considerados positivos os casos em que mais de 1% das células neoplásicas evidenciaram coloração nuclear moderada ou forte, conforme recomendação do consenso do Colégio Americano de Patologistas e Associação Americana de Oncologia Clínica (GOLDHIRSCH *et al.*, 2009; HAMMOND *et al.*, 2010).

A análise da superexpressão da proteína do HER2 foi efetuada de acordo com o Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (WOLFF *et al.*, 2007), como descrito a seguir (Quadro 3).

QUADRO 3 - Guia de Interpretação do HER2 proposto pela Associação Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas

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 e EGFR, a imunorreatividade foi medida estimando-se a porcentagem de células neoplásicas que exibiam coloração característica (coloração citoplasmática para CK5 e CK14 e coloração de membrana para EGFR), sendo considerados positivos os tumores que apresentavam mais de 10% de células neoplásicas coradas (RAKHA *et al.*, 2007b).

Para classificar os tumores como basais, adotamos o critério proposto por RAKHA *et al.*, sendo o fenótipo basal definido apenas pela expressão de citoqueratinas basais (CK5), independente da expressão de outros marcadores (RAKHA *et al.*, 2007b).

Os componentes *in situ* e invasor dos tumores foram divididos em cinco subgrupos de acordo com a classificação molecular:

- **Luminal A** - positividade para receptores de estrógeno (RE) e negatividade para HER2 e citoqueratina basal 5 (CK5): RE+/HER2-/CK5-
- **Luminal B** - positividade para receptores de estrógeno (RE), positividade para HER2 e negatividade para citoqueratina basal 5 (CK5): RE+/HER2+/CK5-
- **HER2** - negatividade para receptores de estrógeno (RE) e citoqueratina basal 5 (CK5) e positividade para HER2: RE-/HER2+/CK5-
- **Basal** - positividade para citoqueratina basal 5 (CK5), independente de outros marcadores moleculares: CK5+
- **Não classificável** – negatividade para receptores de estrógeno (RE), HER2 e citoqueratina basal 5 (CK5): RE-/HER2-/CK5-.

O fenótipo triplo-negativo foi definido pela negatividade para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2 (RE-/RP-/HER2-).

4.5. Análise estatística

Os dados coletados foram inseridos em um banco de dados no programa *EpilInfo*, versão 3.5.1 / agosto de 2008. Para análise estatística, utilizamos o programa *SPSS Statistics* 17.0.

Análise descritiva das variáveis foi realizada, assim como comparações entre os grupos de pacientes em relação aos fatores associados à presença ou não de componente invasor, e entre os tumores de fenótipo basal e demais tumores.

Os testes utilizados foram o T de *Student* para comparação de médias, o qui-quadrado para comparação de proporções e, quando o valor esperado em mais de 20% das caselas foi menor que 5, o teste exato de Fisher foi utilizado. No caso das variáveis contínuas, o teste de Levene foi utilizado para identificar se havia violação do pressuposto de homocedasticidade. Nos casos aqui avaliados, não houve violação deste pressuposto.

O teste *kappa* foi utilizado para avaliar a concordância entre os fenótipos e interpretado conforme os índices sugeridos por Jekel *et al.*: (< 0,20 = concordância desprezível; 0,21-0,40 = concordância mínima; 0,41-0,60 = concordância ruim; 0,61-0,80 = concordância boa; 0,81-1,0 = concordância excelente) (JEKEL, 1999).

5. RESULTADOS

Foram obtidos nos arquivos do Laboratório de Patologia Mamária 416 casos de carcinomas ductais *in situ* da mama puros ou associados a componente invasor diagnosticados no HC/UFMG no período de 2003 a 2008. Destes, 266 casos apresentavam componente *in situ* de alto grau histológico e 148 casos apresentavam grau histológico intermediário ou baixo. Entre os carcinomas ductais *in situ* de alto grau, foram excluídos do estudo 135 casos devido à ausência de lâminas para confirmação do diagnóstico e avaliação das características morfológicas dos tumores (64 casos), autólise (14 casos), recidiva local após tratamento conservador anterior (11 casos), quimioterapia prévia (32 casos) e pequena quantidade de tumor avaliável nos cortes (14 casos). Dos 131 casos, não foi possível obter os blocos para realização de imuno-histoquímica em 10 casos (blocos não estavam disponíveis para novos cortes histológicos). Portanto, nossa amostra final foi constituída por 121 casos.

Em relação ao diagnóstico histopatológico, 46 casos (35%) apresentaram carcinoma ductal *in situ* puro e em 85 casos (65%) evidenciou-se carcinoma ductal *in situ* associado a componente invasor.

A média de idade para os casos de carcinoma ductal *in situ* puro da mama e para os casos de carcinoma ductal *in situ* associado a componente invasor foi semelhante (53,9 anos x 53,8 anos respectivamente; $p= 0,956$).

As características clínicas das pacientes, alterações mamográficas, lateralidade do tumor, tipo de cirurgia realizada, características morfológicas do carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama e do componente invasor estão descritas respectivamente nas tabelas 2, 3, 4 e 5.

TABELA 2: Características clínicas das pacientes com carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama puro ou associado a componente invasor

Característica	N	Percentual (%)
Cor		
Branca	21	16
Não branca	21	16
Sem informação	89	68
TOTAL	131	100
Status menopausal		
Pré-menopausa	50	38,2
Pós-menopausa	80	61
Sem informação	01	0,8
TOTAL	131	100
Alteração clínica		
Nódulo	43	32,8
Outras alterações	06	4,6
Sem alteração clínica	44	33,6
Sem informação	38	29
TOTAL	131	100
Tamanho do tumor no exame clínico		
≤ 2 cm	08	6,1
2,1 – 5 cm	18	13,7
>5 cm	06	4,6
Sem alteração clínica	44	33,6
Sem informação	55	42
TOTAL	131	100

Status menopausal: estimado pela idade (≤ 50 anos = pré-menopausa; > 50 anos = pós-menopausa)

TABELA 3: Alterações mamográficas, lateralidade do tumor e tipo de cirurgia realizada em pacientes com carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama puro ou associado a componente invasor

Característica	N	Percentual (%)
Alteração mamográfica		
Microcalcificações	59	45
Nódulo	13	9,9
Outras	03	2,3
Sem informação	56	42,7
TOTAL	131	100
BIRADS		
Categoria 4	41	31,3
Categoria 5	29	22,1
Outras categorias	03	2,4
Sem informação	58	44,2
TOTAL	131	100
Lateralidade		
Esquerda	68	51,9
Direita	58	44,3
Bilateral	04	3,0
Sem informação	01	0,8
TOTAL	131	100
Cirurgia		
Setorectomia com ou sem abordagem axilar	63	48
Mastectomia simples ou radical	53	40,5
Sem informação	15	11,5
TOTAL	131	100

TABELA 4: Características histopatológicas dos carcinomas ductais *in situ* de alto grau da mama puros ou associados a componente invasor

Característica	N	Percentual
Morfologia do CDIS		
Sólido	65	49,6
Cribriforme	06	4,5
Micropapilar	05	3,8
Papilífero	04	3,0
Misto	51	39,1
TOTAL	131	100
Extensão do CDIS		
Foco único	09	6,9
Multifocal	70	53,4
Multicêntrico	06	4,6
Sem informação	46	35,1
TOTAL	131	100
Presença de necrose		
Ausente	03	2,3
Focal	21	16
Extensa	106	80,9
Sem informação	01	0,8
TOTAL	131	100

CDIS = carcinoma ductal *in situ*

TABELA 5: Características histopatológicas do componente invasor associado ao carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama

Característica	N	Percentual
Grau histológico do componente invasor		
Alto	38	44,7
Intermediário	33	38,8
Baixo	11	12,9
Sem informação	03	3,5
TOTAL	85	100
Tipo histológico do componente invasor		
Ductal SOE	75	88,2
Medular atípico ou variante	02	2,4
Papilífero	03	3,4
Micropapilar	02	2,4
Lobular	02	2,4
Sem informação	01	1,2
TOTAL	85	100

SOE: sem outra especificação

A positividade dos marcadores moleculares para o carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama puro e associado a carcinoma invasor é demonstrada na tabela 6.

Nos casos de carcinoma ductal *in situ* puro da mama, a frequência de positividade dos marcadores moleculares foi 69% para o receptor de estrógeno (29/42 casos), 40,5% para o receptor de progesterona (17/42 casos), 28,6% para o HER2 (12/42 casos), 2,4% para as citoqueratinas basais 5 e 14 (1/42 casos). Nenhum caso de carcinoma ductal *in situ* puro foi corado pelo EGFR.

Nos casos de carcinoma ductal *in situ* associado a componente invasor, a frequência de positividade dos marcadores moleculares foi, respectivamente, para os componentes *in situ* e invasor, 70,9% (56/79 casos) e 72,2% (57/79 casos) para o receptor de estrógeno; 51,9% (41/79 casos) e 48,1% (38/79 casos) para o receptor de progesterona; 20,3% (16/79 casos) e 13,9% (11/79 casos) para o HER2; 12,7% (10/79 casos) e 6,4% (5/78 casos) para a citoqueratina basal 5; 3,8% (3/79 casos) e 5,1% (4/79 casos) para a citoqueratina basal 14; 2,5% (2/79 casos) e 2,5% (2/79 casos) para o EGFR (Figuras 1, 2, 3 e 4).

Não houve diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos marcadores moleculares no carcinoma ductal *in situ* puro ou associado a componente invasor ($p > 0,05$). A citoqueratina basal 5 evidenciou tendência à maior positividade no grupo do carcinoma ductal *in situ* associado a carcinoma invasor ($p = 0,095$).

Observamos excelente concordância entre o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasor em relação ao receptor de estrógeno ($kappa = 0,969$), CK14 ($kappa = 0,851$) e EGFR ($kappa = 1$) e boa concordância em relação ao

receptor de progesterona, HER2 e CK5 ($kappa = 0,722, 0,778$ e $0,698$ respectivamente) (Tabela 6).

TABELA 6: Positividade dos marcadores moleculares nos casos de carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama puro e associado a carcinoma invasor

	CDIS puro	CDIS + CI			
	CDIS	CDIS	CI		
Marcador molecular	+ / N (%)	+ / N (%)	+ / N (%)	p*	Kappa**
RE	29/42 (69%)	56/79 (70,9%)	57/79 (72,2%)	0,837	0,969
RP	17/42 (40,5%)	41/79 (51,9%)	38/79 (48,1%)	0,256	0,722
HER2	12/42 (28,6%)	16/79 (20,3%)	11/79 (13,9%)	0,366	0,778
CK5	1/42 (2,4%)	10/79 (12,7%)	5/78 (6,4%)	0,095	0,698
CK14	1/42 (2,4%)	3/79 (3,8%)	4/79 (5,1%)	1,000	0,851
EGFR	0	2/79 (2,5%)	2/79 (2,5%)	0,546	1,000

CDIS = carcinoma ductal *in situ*; CI = carcinoma invasor

RE = receptor de estrógeno; RP = receptor de progesterona; HER2 = receptor do fator de crescimento epidérmico 2; CK5= citoqueratina basal 5; CK14 = citoqueratina basal 14; EGFR = receptor do fator de crescimento epidérmico 1

p = nível de significância

* = refere-se apenas ao componente *in situ* (puro ou associado a componente invasor)

** = comparação entre os componentes *in situ* e invasor nos casos de CDIS associado a carcinoma invasor

Kappa = índice de concordância (< 0,20 = desprezível; 0,21-0,40 = mínima; 0,41-0,6 = ruim; 0,61-0,80 = boa; 0,81-1,0 = excelente)

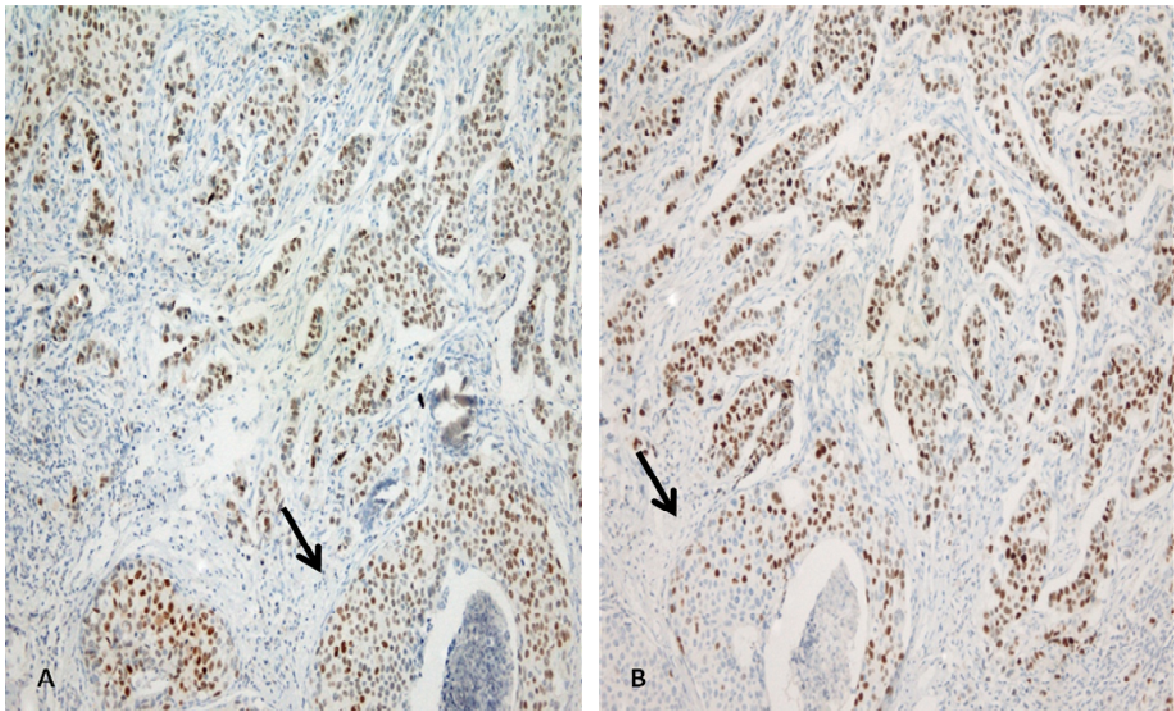


Figura 1: Positividade dos receptores de estrógeno e progesterona nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x). Em A, receptor de estrógeno. Em B, receptor de progesterona. Setas indicam componente *in situ*.

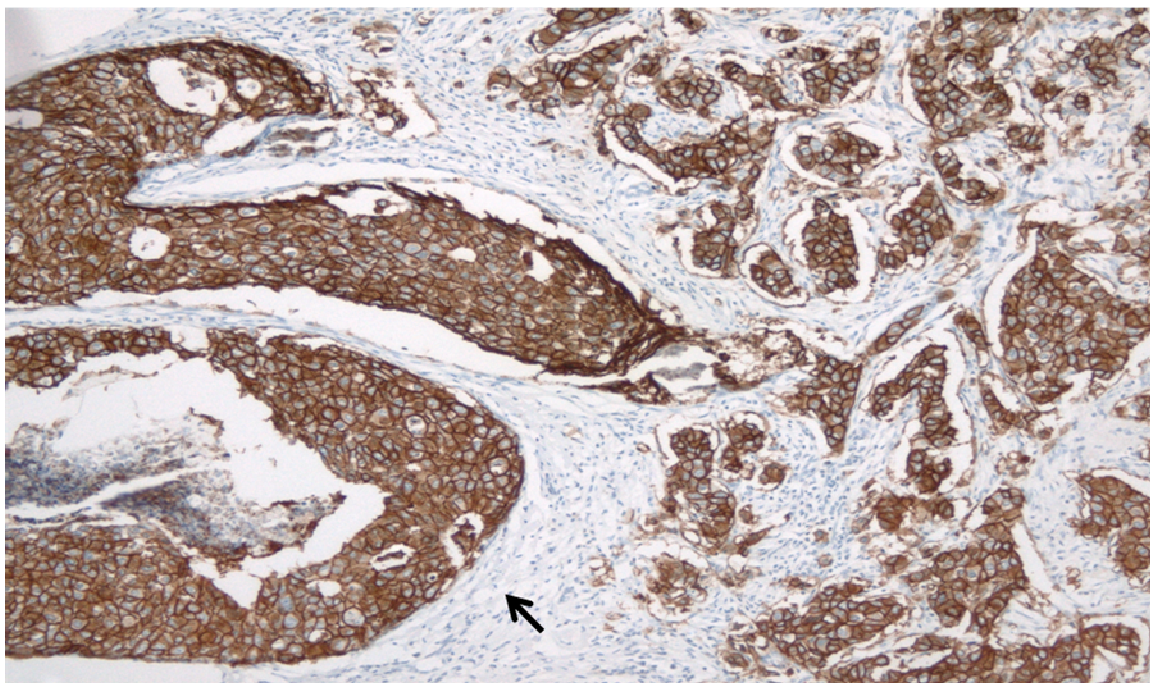


Figura 2: Positividade do receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x). Seta aponta o componente *in situ*.

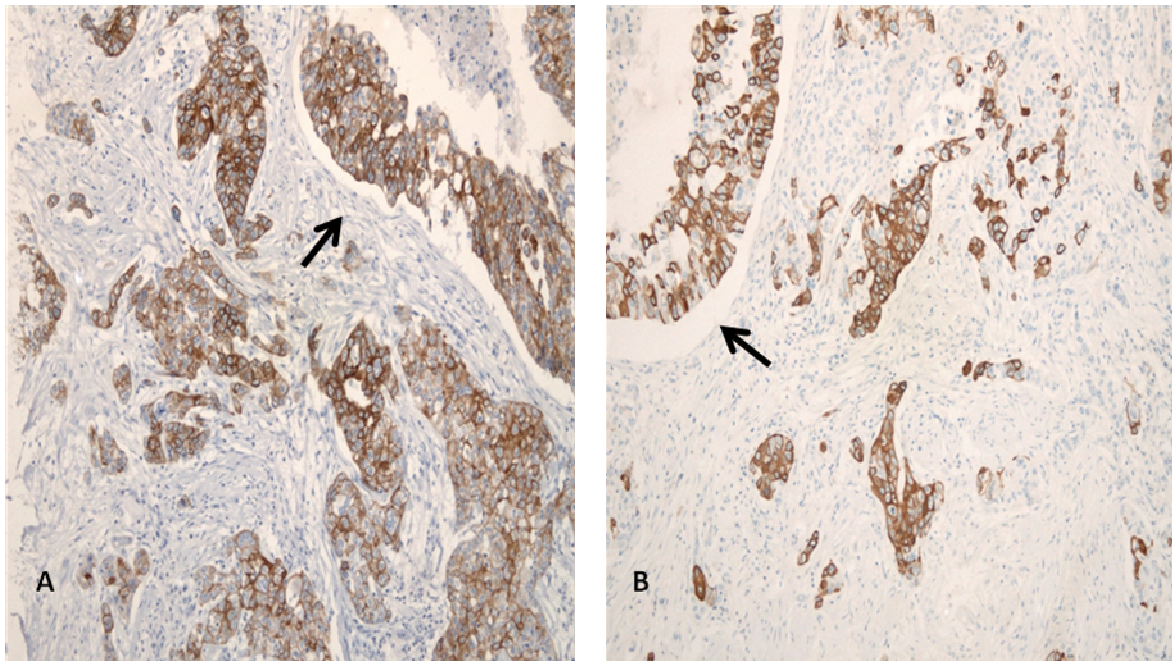


Figura 3: Positividade das citoqueratinas 5 e 14 nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x). Em A, citoqueratina 5. Em B, citoqueratina 14. Setas indicam o componente *in situ*.

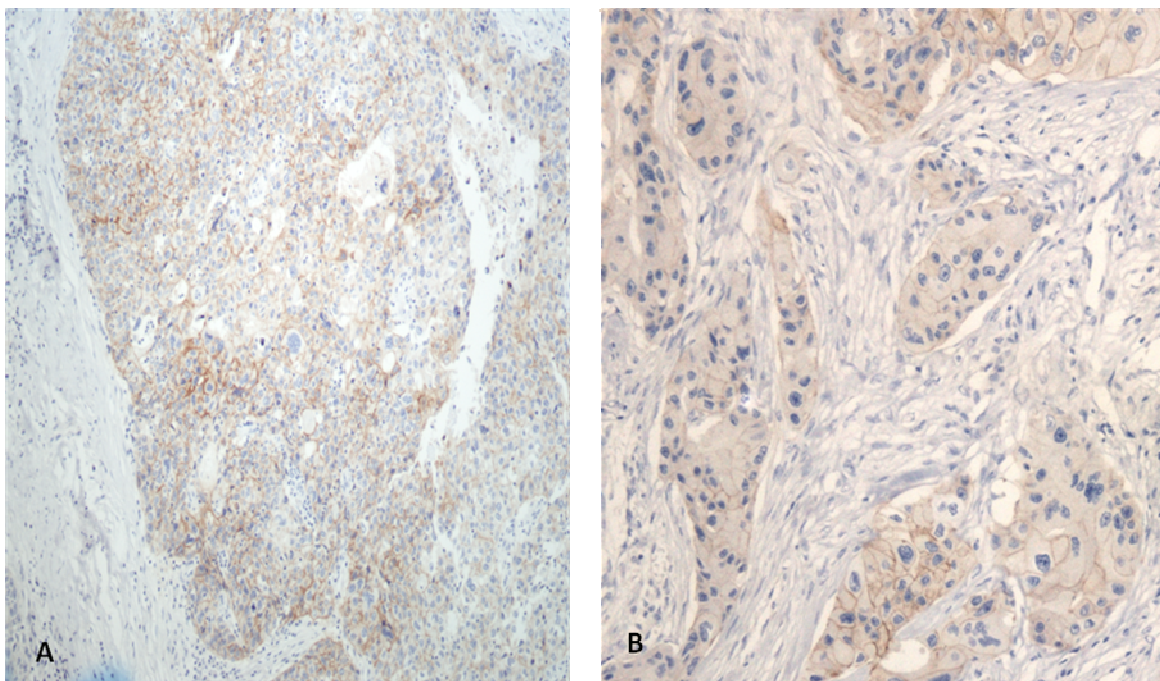


Figura 4: Positividade do receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR) nos componentes *in situ* e invasor (aumento 100x). Em A, componente *in situ*. Em B, componente invasor.

As frequências dos diferentes fenótipos moleculares estão descritas na tabela 7. Entre os carcinomas ductais *in situ* puros, o fenótipo mais frequente foi o luminal A (24/42 casos; 57,1%), seguido pelo HER2 e tipo “não classificável” (6/42 casos; 14,3% para ambos), luminal B (5/42 casos; 11,9%) e fenótipo basal (1/42 casos; 2,4%).

Entre os carcinomas ductais *in situ* associados a carcinoma invasor, o fenótipo luminal A também foi o mais frequente (44/79 casos; 55,7% e 50/77 casos; 64,9% respectivamente para os componentes *in situ* e invasor). O fenótipo HER2 correspondeu a 6/79 casos (7,6%) no componente *in situ* e 4/77 casos (5,2%) no componente invasor. O fenótipo basal foi observado em 10/79 casos (12,7%) no componente *in situ* e em 5/77 casos (6,5%) no componente invasor.

Não observamos diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos diferentes fenótipos moleculares no carcinoma ductal *in situ* puro ou associado a componente invasor ($p > 0,05$). O fenótipo basal evidenciou tendência à maior positividade no grupo do carcinoma ductal *in situ* associado a carcinoma invasor ($p = 0,095$).

Excelente concordância entre os diferentes fenótipos moleculares nos componentes *in situ* e invasor foi observada ($kappa = 0,823$). Para o fenótipo basal, esta concordância foi classificada como boa ($kappa = 0,688$).

TABELA 7: Classificação molecular do carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama puro e do componente invasor associado

	CDIS puro	CDIS + CI		
	CDIS	CDIS	CI	
Fenótipo	N (%)	N (%)	N (%)	p*
Luminal A	24 (57,1%)	44 (55,7%)	50 (64,9%)	0,879
Luminal B	05 (11,9%)	08 (10,1%)	06 (7,8%)	0,765
HER2	06 (14,3%)	06 (7,6%)	04 (5,2%)	0,338
Basal	01 (2,4%)	10 (12,7%)	05 (6,5%)	0,095
Não classificável	06 (14,3%)	11 (13,9%)	12 (15,6%)	0,957
TOTAL	42 (100%)	79 (100%)	77 # (100%)	

CDIS = carcinoma ductal *in situ*, CI = carcinoma invasor

Luminal A: RE+/HER2-/CK5-; Luminal B: RE+/HER2+/CK5-; HER2: RE-/HER2+/CK5-; Basal: CK5+, independente da positividade de outros marcadores; Não classificável: RE-/RP-/HER2-/CK5-

p = nível de significância

* = refere-se apenas ao componente *in situ* (puro ou associado a componente invasor)

= componente invasor não avaliável em 2 casos (sem representatividade na lâmina)

Os carcinomas invasores associados a componente *in situ* de fenótipo basal apresentaram maior probabilidade de multifocalidade / multicentricidade ($p = 0,036$).

A presença de alteração clínica associou-se com o fenótipo basal no componente *in situ* ($p = 0,013$). Apenas uma paciente não apresentava alteração clínica no grupo dos carcinomas ductais *in situ* de fenótipo basal.

Observamos tendência à associação entre o fenótipo basal no componente *in situ* e o grau histológico do componente invasor ($p = 0,091$).

O carcinoma invasor de fenótipo basal apresentou tendência à maior tamanho em relação aos tumores não basais ($20,91 \times 33,25\text{mm}$; $p = 0,095$).

Tendência à associação entre o tipo de cirurgia realizada (conservadora x radical) e o fenótipo basal no componente *in situ* foi observada ($p = 0,054$).

Não evidenciamos associações entre idade, estado menopausal, extensão do componente *in situ*, extensão da necrose, lateralidade, presença de microinvasão, tipo histológico do carcinoma invasor, acometimento axilar ou estadiamento TNM e o fenótipo basal ($p > 0,05$).

Observamos mínima concordância entre o fenótipo basal e o fenótipo triplo-negativo nos componentes *in situ* e invasor dos casos de carcinomas ductais *in situ* associados a carcinoma invasor ($kappa = 0,316$ e $0,360$ respectivamente) (Tabelas 8 e 9).

TABELA 8: Correlação entre o fenótipo basal e o fenótipo triplo-negativo no componente *in situ* de carcinomas ductais *in situ* associados a componente invasor

CDIS	Fenótipo Basal		Kappa
Fenótipo triplo-negativo	Não	Sim	
Não	60	05	0,316
Sim	09	05	

CDIS = carcinoma ductal *in situ*

Casos discordantes descritos em negrito

Kappa = índice de concordância (< 0,20 = desprezível; 0,21-0,40 = mínima; 0,41-0,6 = ruim; 0,61-0,80 = boa; 0,81-1,0 = excelente)

TABELA 9: Correlação entre o fenótipo basal e o fenótipo triplo-negativo no componente invasor de carcinomas ductais *in situ* associados a componente invasor

CI	Fenótipo Basal		Kappa
Fenótipo triplo-negativo	Não	Sim	
Não	62	01	0,360
Sim	10	04	

CI = carcinoma invasor

Casos discordantes descritos em negrito

Kappa = índice de concordância (< 0,20 = desprezível; 0,21-0,40 = mínima; 0,41-0,6 = ruim; 0,61-0,80 = boa; 0,81-1,0 = excelente)

6. DISCUSSÃO

No presente estudo, avaliamos o perfil molecular de 121 casos de carcinoma ductal *in situ* de alto grau da mama, incluindo carcinomas ductais *in situ* puros (42 casos; 35% da casuística) ou associados a componente invasor (79 casos; 65% da casuística), com ênfase na identificação do fenótipo basal. Poucos trabalhos na literatura avaliaram os diferentes perfis moleculares dos carcinomas ductais *in situ* da mama, assim como os carcinomas ductais *in situ* de fenótipo basal. Bryan *et al.* avaliaram 66 casos de carcinoma ductal *in situ* de alto grau, sendo 50 casos puros (76%) e 16 casos com carcinoma invasor associado (24%). Paredes *et al.* e Livasy *et al.* avaliaram, respectivamente, 79 e 245 casos de carcinoma ductal *in situ* puro da mama. Em grande estudo (*Nurses' Health Study*), Tamimi *et al.* avaliaram 2897 pacientes, sendo 272 casos de carcinoma ductal *in situ* e 2249 casos com tumor invasivo.

Escolhemos um subgrupo específico de carcinomas ductais *in situ* da mama, isto é, os de alto grau histológico, pois sabe-se que os carcinomas de fenótipo basal são mais frequentes entre os tumores invasores de alto grau histológico (Reis-Filho & Tutt, Rakha *et al.*, Silva *et al.* e Tavassoli & Fadare). Assim, a escolha pelos carcinomas ductais *in situ* de alto grau foi baseada na possibilidade de encontrar, neste subgrupo, maior frequência do fenótipo basal.

Optamos por avaliar carcinomas ductais *in situ* puros e associados a componente invasor, a fim de comparar se a frequência dos fenótipos seria diferente entre os tumores puros e os associados a componente invasor, assim como comparar a concordância entre os fenótipos dos componentes *in situ* e invasor.

Nossas fontes documentais para obtenção de dados clínicos e mamográficos foram os pedidos de exames anátomo-patológicos arquivados no Laboratório de Patologia Mamária do HC/UFMG, muitos deles com informações incompletas, justificando o grande número de dados clínicos sem informação em nossa casuística.

O critério proposto por Rakha *et al.* para definir o fenótipo basal (positividade para citoqueratina basal 5, independente de outros marcadores) foi adotado em nosso estudo. Diferente deste, Nielsen *et al.* propuseram o uso de um perfil molecular de quatro anticorpos (negatividade para receptor de estrógeno e HER2 e positividade para citoqueratina 5/6 e/ou EGFR) para definição do fenótipo basal. Para Rakha *et al.*, a negatividade para receptor de estrógeno relaciona-se com pior prognóstico, porém em análise multivariada, excluindo-se o grau nuclear, não evidencia-se tal relação. De acordo com Tavassoli & Fadare (2007), ainda não há consenso na literatura internacional em relação aos marcadores que melhor definem e identificam os tumores basais.

O receptor de estrógeno expressa-se em 70% dos carcinomas ductais *in situ* segundo Allred *et al.*, percentual semelhante ao encontrado em nosso estudo, e o HER 2 expressa-se em aproximadamente 50% dos carcinomas ductais *in situ*. Identificamos um percentual de positividade para o HER2 menor que o descrito na literatura (28,6% x 50%).

Em nosso trabalho, não encontramos diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos diferentes marcadores e fenótipos moleculares no carcinoma ductal *in situ* puro ou associado a componente invasor. O fenótipo basal evidenciou tendência à maior positividade no grupo do carcinoma ductal *in situ* associado a carcinoma invasor ($p= 0,095$). Em estudo prévio, Tamimi *et al.* encontraram diferenças entre as frequências dos fenótipos luminal A, luminal B e HER2 nos carcinomas ductais *in situ* puros comparados aos

carcinomas com componente invasor associado. Entretanto, tal diferença não foi observada para os fenótipos basal e “não classificável”. Ressalta-se que, em seu estudo, Tamimi *et al.* avaliaram 272 pacientes com carcinoma ductal *in situ* puro e 2249 pacientes com carcinoma invasor, totalizando 2521 casos, amostra aproximadamente vinte vezes maior que a de nosso estudo.

A distribuição de frequência dos fenótipos moleculares observada em nosso estudo foi semelhante à relatada por Paredes *et al.* e Livasy *et al.*, tendo sido o fenótipo luminal A o mais frequente. Nossos dados identificaram o fenótipo basal em 10/79 casos (12,7%) no componente *in situ* e em 5/77 casos (6,5%) no componente invasor. Em sua casuística, Tamimi *et al.* evidenciaram frequência de 7,7% e 10,9% respectivamente para o fenótipo basal nos componentes *in situ* e invasor.

Nossos resultados demonstraram boa concordância entre carcinomas ductais *in situ* e carcinomas mamários invasivos sincrônicos em relação ao *status* do receptor hormonal, HER2 e os diferentes fenótipos moleculares, confirmando dados descritos anteriormente por Allred *et al.* A comparação para a citoqueratina basal 5 não pode ser feita, pois não encontramos estudos anteriores no *Pubmed* e *Scielo* que avaliaram este marcador específico.

Nossos dados não identificaram associação entre o diagnóstico de fenótipo basal no componente *in situ* e a presença de componente invasor, embora tenha sido observada tendência a esta associação ($p = 0,09$). Associação entre o fenótipo basal no componente *in situ* e a presença de componente invasor poderia ser esperada, tendo em vista que os carcinomas basais apresentam comportamento clínico mais agressivo segundo diferentes autores (Perou *et al.*, Sorlie *et al.*, Carey *et al.*, Nielsen *et al.*, Van de Rijn *et al.* e Rakha *et al.*).

Nossos resultados revelaram associação entre o fenótipo basal no componente *in situ* e a presença de alteração clínica nas pacientes ($p = 0,013$). Não encontramos trabalhos disponíveis na literatura que realizaram esta comparação.

Observamos, em nosso estudo, mínima concordância entre o fenótipo basal e o fenótipo triplo-negativo nos componentes *in situ* e invasor dos casos de carcinomas ductais *in situ* associados a carcinoma invasor. Este dado contrapõe os achados de Perou *et al.* e Sorlie *et al.*, que afirmam que tumores basais são frequentemente triplo-negativos.

Nossos dados trazem uma contribuição para a melhor caracterização molecular dos carcinomas ductais *in situ* da mama, apesar das limitações do tamanho da amostra. Novos estudos, com casuística maior de carcinomas *in situ* puros, serão realizados para correlacionar a evolução dos casos de acordo com o fenótipo molecular.

7. CONCLUSÕES

1. A frequência dos fenótipos moleculares entre os carcinomas ductais *in situ* puros foi: luminal A (24/42 casos; 57,1%), luminal B (5/42 casos; 11,9%), HER2 (6/42 casos; 14,3%), fenótipo basal (1/42 casos; 2,4%) e tipo não classificável (6/42 casos; 14,3%). Entre os carcinomas ductais *in situ* associados a carcinoma invasor, a frequência de fenótipos foi, respectivamente, para os componentes *in situ* e invasor: luminal A (44/79 casos; 55,7% e 50/77 casos; 64,9%), luminal B (8/79 casos; 10,1% e 6/77 casos; 7,8%), HER2 (6/79 casos; 7,6% e 4/77 casos; 5,2%), fenótipo basal (10/79 casos; 12,7% e 5/77 casos; 6,5%) e tipo não classificável (11/79 casos; 13,9% e 12/77 casos; 15,6%).
2. Não encontramos diferença estatisticamente significativa entre as frequências dos diferentes fenótipos moleculares no carcinoma ductal *in situ* puro ou associado a componente invasor. O fenótipo basal evidenciou tendência à maior frequência no grupo do carcinoma ductal *in situ* associado a carcinoma invasor ($p = 0,095$).
3. Houve excelente concordância entre o carcinoma ductal *in situ* e o carcinoma invasor em relação ao receptor de estrógeno ($kappa = 0,969$), CK14 ($kappa = 0,851$) e EGFR ($kappa = 1$) e boa concordância em relação ao receptor de progesterona, HER2 e CK5 ($kappa = 0,722$, $0,778$ e $0,698$ respectivamente). Obteve-se boa concordância geral entre os diferentes fenótipos moleculares nos componentes *in situ* e invasor ($kappa = 0,786$).
4. O fenótipo basal apresentou associação com a presença de alteração ao exame clínico ($p = 0,013$) e multifocalidade/multicentricidade do tumor ($p = 0,036$). Este fenótipo apresentou tendência à associação com o tipo de cirurgia realizada ($p = 0,054$), tamanho ($p = 0,095$) e grau histológico do componente invasor ($p = 0,091$) e não esteve associado a outras características clínicas das pacientes (idade, estado menopausal),

morfológicas dos tumores (extensão do carcinoma *in situ* e da necrose, lateralidade, microinvasão, tipo histológico do carcinoma invasor), acometimento axilar e estadiamento TNM.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-REHIM DM, *et al.* Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* v.203, n.2, p.661-71, Jun. 2004.

ABD EL-REIHM DM, *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.* v.116, n.3, p.340-50, Sep. 2005.

ABDEL-FATAH TM, *et al.* Morphologic and molecular evolutionary pathways of low nuclear grade invasive breast cancers and their putative precursor lesions: further evidence to support the concept of low nuclear grade breast neoplasia family. *Am J Surg Pathol.* v.32, n.4, p.513-23, Apr. 2008.

AMERICAN JOINT COMMITTEE ON CANCER. *AJCC Cancer Staging Manual.* 6th ed. New York: Springer, 2002.

ALLRED DC, *et al.* Overexpression of HER2/neu and its relationship with other prognostic factors change during progression of in situ to invasive breast cancer. *Hum Pathol.* v.23, n.9, p.974-9. Sep. 1992.

ALLRED DC, *et al.* Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* v.11, n.2, p.155-68, Feb. 1998.

ALLRED DC. Biologic characteristics of ductal carcinoma in situ. In: Silverstein MJ, ed. *Ductal carcinoma in situ of the breast.* 2nd ed. Philadelphia: Lippincott Williams &Wilkins, p.37-48. 2002.

Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2010>.

BRYAN BB, SCHNITT SJ, COLLINS LC. Ductal carcinoma in situ with basal-like phenotype: a possible precursor to invasive basal-like breast cancer. *Mod Pathol.* v.19, n.5, p.617-21, May. 2006.

BUERGER H, *et al.* Comparative genomic hybridization of ductal carcinoma in situ of breast - evidence of multiple genetic pathways. *J Pathol.* v.187, n.4, p.396-402, Mar. 1999a.

BUERGER H, *et al.* Different genetic pathways in the evolution of invasive breast cancer are associated with distinct morphological subtypes. *J Pathol.* v.189, n.4, p.521-6, Dec. 1999b.

CAREY LA, *et al.* Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* v.295, n.21, p.2492-502, Jun. 2006.

CAREY LA, *et al.* The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* v.13, n.8, p.2329-2334, Apr. 2007.

DABBS DJ, *et al.* Basal phenotype of ductal carcinoma in situ: recognition and immunohistologic profile. *Mod Pathol.* v.19, n.11, p.1506-11, Aug. 2006.

DE BROT M, *et al.* Basal-like breast cancers: clinicopathological features and outcome. *Rev Assoc Med Bras.* v.55, n.5, p.529-34, Sep-Oct. 2009.

DIAZ LK, *et al.* Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol.* v.14, n.6, p.419-30, Nov. 2007.

DUTRA MC, *et al.* Immunophenotype and evolution of breast carcinomas: a comparison between very Young and postmenopausal women. *Rev Bras Ginecol Obstet.* v.31, n.2, p.54-60, Feb. 2009.

ELLIS IO, ELSTON CW, POLLER DN. Ductal carcinoma *in situ*. In: ELSTON CW & ELLIS IO. *The breast*. Edinburg: Churchill Livingstone, p.249-82, 1998.

ELSTON CW, ELLIS IO. Assessment of histologic grade. In: ELSTON CW & ELLIS IO eds. *Systemic Pathology* 3rd Ed. v.13, p. 365-84, Churchill Livingstone. Edinburg, Scotland, UK. 1998.

FITZGIBBONS PL, *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.

FULFORD LG, *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.

GOLDHIRSCH A, *et al.* Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. *Ann Oncol*. v.20, n.8, p.1319–29, Aug. 2009.

HAMMOND ME, *et al.* American Society of Clinical Oncology / College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. v.134, n.6, p.E1-E16, Jun. 2010.

JEKEL JF, ELMORE JG, KATZ DL. Epidemiologia, bioestatística e medicina preventiva. Porto Alegre: Artmed; p. 99-112. 1999.

KIM MJ, *et al.* Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu overexpressing phenotypes. *Hum Pathol*. v. 37, n.9, p.1217-26, Sep. 2006.

LAGIOS MD, *et al.* Mammographically detected ductal carcinoma in situ: frequency of local recurrence following tyelectomy and prognostic effect of nuclear grade on local recurrence. *Cancer*. v.63, n.4, p.618-24, Feb.1989.

LIVASY CA, *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. v.19, n.2, p.264-71, Feb. 2006.

LIVASY CA, *et al.* Identification of a basal-like subtype of breast ductal carcinoma in situ. *Hum Pathol*. v.38, n.2, p.197-204, Feb. 2007.

MALZAHN K, *et al.* Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arc*. v.433, n.2, p.119-29, Aug. 1998.

MATOS I, *et al.* p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows*. v.447, n.4, p.688-94, Jul. 2005.

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

MOLL R, KREPLER R, FRANKE WW. Complex cytokeratin polypeptide patterns observed in certain human carcinomas. *Differentiation.* v.23, n.3, p.256-69. 1983.

MONFAIR F. Is 'basal-like' carcinoma of the breast a distinct clinicopathological entity? A critical review with cautionary notes. *Pathobiology.* v.75, n.2, p.119-31, Jun. 2008.

MURAD TM, SCHARPELLI DG. The ultrastructure of medullary and scirrhous mammary duct carcinoma. *Am J Pathol.* v.50, n.2, p.335-60, Feb. 1967.

NIELSEN TO, *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* v.10, n.16, p.5367-74, Aug. 2004.

O'SULLIVAN MJ, MORROW M. Ductal carcinoma in situ – current management. *Surg Clin N Am.* v.87, n.2, p.333-51, Apr. 2007.

PAGE DL, ANDERSON TJ. Diagnostic histopathology of the breast. Edinburg: Churchill Livingstone. p.120-92. 1987.

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.

PAREDES J, *et al.* P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch.* v.450, n.1, p.73-80, Jan. 2007.

PEROU CM, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* v.406, n.6797, p.747-52, Aug. 2000.

RAKHA EA, PUTTI TC, ABD EL-REHIM DM, *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, *et al.* Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. v.42, n.18, p. 3149-56, Oct. 2006b.

RAKHA EA, *et al.*, Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. v.109, n.1, p.25-32, Jan. 2007a.

RAKHA EA, *et al.* Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. v.50, n.4, p.434-38, Mar. 2007b.

RAKHA EA, ELLIS IO. Triple-negative/basal like breast cancer: review. *Pathology*. v.41, n.1, p.40-7, Jan. 2009a.

RAKHA EA, *et al.* Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. v.113, n.3, p.411-22, Feb. 2009b.

RAKHA EA, REIS-FILHO J. Basal-like breast carcinoma: from expression profiling to routine practice. *Arch Pathol Lab Med*. v.133, n.6, p.860-68, Jun. 2009c.

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

ROUZIER R, *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. v.11, n.16, p.5678-85, Aug. 2005.

SCOTT MA, *et al.* Ductal carcinoma *in situ* of the breast: reproducibility of histological subtype analysis. *Hum Pathol*, v.28, n.8, p967-73, Aug. 1997.

SILVA F, *et al.* Carcinoma da mama tipo basal. *Acta Med Port*. v.21, n.4, p.373-78, Jul-Aug. 2008.

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

SILVERSTEIN MJ, *et al.* A prognostic index for ductal carcinoma of the breast *in situ*. *Cancer*. v.77, n.11, p. 2267-74, Jun. 1996.

SOERJOMATARAM I, *et al.* An overview of prognostic factors of long-term survivors of breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* v.107, n.3, p.309-330, Feb. 2008.

SORLIE T, *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, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data set. *Proc Natl Acad Sci USA.* v.100, n.14, p.8418-23, Jul. 2003.

TAMIMI RM, *et al.* Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma *in situ* and invasive cancer. *Breast Cancer Research,* v.10, n.4, p.R67, Aug. 2008.

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

The Consensus Conference Committee. Consensus conference of the classification of ductal carcinoma in situ. *Cancer.* v.80, n.9, p.1798-802, Nov. 1997.

VAN DE RIJN M, *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.1991-96, Dec. 2002.

WOLFF AC, *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.

World Health Organization. Classification of Tumours Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. Lyon: IARC Press, 2003.

APÊNDICE 1: PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (COEP)

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Parecer nº. ETIC 635/08

**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 04 de fevereiro de 2009, após atendidas as solicitações de diligência, o projeto de pesquisa intitulado "**Carcinoma ductal *in situ* da mama tipo basal: detecção por imunofenotipagem molecular**" 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. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

APÊNDICE 2: PROTOCOLO DE PESQUISA

PERFIL MOLECULAR DOS CARCINOMAS DUCTAIS *IN SITU* DA MAMA DE ALTO GRAU

N: _____ Data: ___/___/___

1. IDENTIFICAÇÃO

Nome: _____

Registro: _____ Idade: _____ anos

Cor: (1) branca (2) negra (3) parda (4) amarela

Estado menopausal: (1) pré (2) pós

2. CLÍNICA

Alteração clínica: (1) nódulo (2) derrame mamilar (4) inversão mamilar
(8) alteração pele (88) sem alteração clínica (99) sem informação

Tamanho lesão clínica: (1) $\leq 2\text{cm}$ (2) 2,1-5cm (3) $>5\text{cm}$
(88) sem alteração clínica (99) sem informação

Alteração mamográfica: (1) microcalcificações (2) nódulo
(4) assimetria focal (8) distorção arquitetural
(88) sem alteração MMG (99) sem informação

BI-RADS: (1) Cat 1 (2) Cat 2 (3) Cat 3 (4) Cat 4 (5) Cat 5 (6) Cat 6
(7) Cat 0 (88) sem alteração MMG (99) sem informação

3. TRATAMENTO CIRÚRGICO

(1) setorectomia / quadrantectomia (4) mastectomia + BLS

(2) setorectomia / quadrantectomia + BLS (5) mastectomia + EA

(3) setorectomia / quadrantectomia + EA

4. ANATOMO-PATOLÓGICO

Nº biópsia: _____ Ano biópsia: _____

Lateralidade: (1) esquerda (2) direita (3) bilateral **Lat bio:** (1) E (2) D

Diagnóstico patológico: (1) CDIS puro (2) CDIS + invasor

Classificação morfológica do CDIS: (1) comedo (2) sólido (4) cribriforme
(8) papilar (16) micropapilar (32) apócrino (64) outro

Tamanho CDIS: _____ mm

Extensão CDIS: (1) foco único (2) multifocal (3) multicêntrico

Tamanho da menor margem cirúrgica em relação ao CDIS: ____ mm

Necrose: (1) ausente (2) presente focal (3) presente extensa

Grau nuclear: (1) baixo (2) intermediário (3) alto

Gradação histológica CDIS: (1) alto grau (2) grau intermediário (3) baixo grau

Microinvasão: (1) sim (2) não

Classificação histológica do componente invasor associado:

- | | |
|------------------------------------|---------------------------------|
| (1) carcinoma ductal invasor SOE | (6) carcinoma papilífero |
| (2) carcinoma medular típico | (7) carcinoma metaplásico |
| (3) carcinoma medular atípico | (8) carcinoma inflamatório |
| (4) carcinoma tubular | (9) carcinoma lobular invasor |
| (5) carcinoma colóide | (88) NA |

Tamanho do componente invasor: _____ mm

Extensão do componente invasor: (1) foco único (2) multifocal (3) multicêntrico

Tamanho da menor margem cirúrgica em relação ao componente invasor: ____ mm

Gradação histológica do componente invasor:

- (1) alto grau (2) grau intermediário (3) baixo grau

Estadiamento TNM: (1) estadio 0 (2) estadio I (3) estadio II

- (4) estágio III (5) estágio IV

5. IMUNO-HISTOQUÍMICA

CDIS: RE: (1) negativo (2) positivo (3) NA

RP: (1) negativo (2) positivo (3) NA

HER2: (1) negativo (2) positivo (3) NA

CK5: (1) negativo (2) positivo (3) NA

CK14: (1) negativo (2) positivo (3) NA

EGFR: (1) negativo (2) positivo (3) NA

COMPONENTE INVASOR: RE: (1) negativo (2) positivo (3) NA

RP: (1) negativo (2) positivo (3) NA

HER2: (1) negativo (2) positivo (3) NA

CK5: (1) negativo (2) positivo (3) NA

CK14: (1) negativo (2) positivo (3) NA

EGFR: (1) negativo (2) positivo (3) NA

APÊNDICE 3: PROTOCOLO PARA REAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA

PROTOCOLO ENVISION FLEX/HRP

- 1- Desparafinização e recuperação antigênica por calor em solução FLEX pH alto (DAKO)
- 2- Lavagem em tampão de lavagem (*Wash buffer*- DAKO)
- 3- Bloqueio peroxidase endógena (água oxigenada 10 V)
- 4- Lavagem em tampão
- 5- Aplicação do anticorpo primário 30 minutos, temperatura ambiente
- 6- Lavagem em tampão (2x 5 minutos cada)
- 7- Aplicação *Envision FLEX+ Mouse (Linker)* 20 minutos, temperatura ambiente
- 8- Lavagem em tampão (2x 5 minutos cada)
- 9- Aplicação *Envision FLEX/HRP*. 20 minutos, temperatura ambiente
- 10- Lavagem em tampão (2x 5 minutos cada)
- 11- Aplicação DAB (*Substrate Working Solution mix*), 5 minutos
- 12- Lavagem em água corrente 5 minutos
- 13- Contra-coloração em hematoxilina de Harris, 2 minutos
- 14- Lavagem em água corrente, 5 minutos
- 15- Desidratação, montagem