

Universidade Federal do Rio Grande do Sul
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-Graduação em Medicina

VALOR PROGNÓSTICO E PREDITIVO DOS MARCADORES
IMUNOISTOQUÍMICOS NO CARCINOMA INVASOR DE MAMA

Jorge Villanova Biazús

Tese de Doutorado apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul para a
obtenção do título de Doutor em
Medicina.

Área de concentração: Ciências Médicas
Orientadora: Dra. Maria Isabel Edelweiss

Porto Alegre

2007

A todas as mulheres que, portadoras do câncer de mama, acreditam nos caminhos da ciência e da fé.

AGRADECIMENTOS

Por um instante, pensei em desistir. A vida, às vezes, surpreende, roubando planos e sonhos; porém, ao retomar o meu caminho, senti a energia fluir de meus amigos, de meus companheiros e especialmente daqueles que mais amo, a minha família. Esta foi uma jornada desafiadora e excitante, cheia de descobertas e de percalços, superados com a ajuda e com a solidariedade fraterna de verdadeiros parceiros a quem gostaria, aqui, de homenagear e agradecer.

À Dra. Maria Isabel Edelweiss, minha orientadora, pelo seu saber, dedicação, tolerância e estímulo constantes que tornaram estes anos de convívio em uma experiência altamente enriquecedora, nos campos pessoal, intelectual e acadêmico;

Ao Dr. Diego Uchoa, incansável colaborador na análise de nosso material, não medindo esforços para o êxito de nossa tarefa;

À Dirlene de Lara Matos, pelo auxílio na análise estatística dos dados;

Ao Dr. Thadeu Cerski e a todos os demais professores e médicos do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, que me acolheram em seu laboratório;

Ao Curso de Pós-Graduação em Medicina, área de concentração Ciências Médicas, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, e ao seu corpo docente;

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação (GPPG) e ao Fundo de Incentivo à Pesquisa e Eventos do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE/HCPA), pelo apoio e suporte financeiros;

Ao Dr. Carlos Henrique Menke, meu mestre, que me ensinou os caminhos da Mastologia, pelo seu constante exemplo e estímulo por quase trinta anos;

Ao Dr. José Antônio Cavalheiro, pela amizade, companheirismo e conselhos lúcidos nos momentos difíceis;

Aos colegas do Serviço de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Enf. Eliane Rabin, Dra. Ana Cristina Bittelbrun, Dr. Rodrigo Cericatto, Dr.

Nilton Xavier, Dr. Fernando Schuh, pelo excitante convívio e pelo estímulo constantes;

À Dra. Ângela Zucatto e ao Dr. Geraldo Sidiomar Duarte, mais que parceiros de cirurgia, amigos de todos os momentos, pelo incentivo e pelo conforto de suas presenças;

À Dra. Heleusa Ione Monego, parceira, amiga, boa ouvinte e conselheira sensata nas horas de conflito;

À Letícia Freitas, secretária competente e disponível, por gerenciar o meu tempo, criando espaços para o meu trabalho;

À professora Adriana Selau Gonzaga, por colocar o seu profissionalismo e o seu coração na revisão deste texto;

À Dra. Márcia Portela Melo, mais que amiga, foi uma incansável colaboradora na elaboração desta tese — a sua capacidade e a sua organização só são superadas pela sua candura.

Agradecimento de coração

À minha esposa Marta e aos meus filhos, Mateus e Georgia, pelo amor, estímulo, paciência, compreensão e doação de seus espaços.

SUMÁRIO

Lista de Figuras.....	7
Lista de Tabelas.....	8
Lista de Abreviaturas.....	9
RESUMO.....	11
ABSTRACT.....	13
INTRODUÇÃO	15
REVISÃO DA LITERATURA	17
1 Carcinoma de Mama.....	17
1.1 Iniciação e Desenvolvimento do Câncer de Mama.....	17
1.2 Epidemiologia do Carcinoma de Mama.....	19
1.3. Evolução do Carcinoma de Mama Primário.....	26
1.4 Envolvimento Axilar no Câncer de Mama.....	26
1.5 Tratamento Adjuvante.....	27
1.6 Patologia do Câncer de Mama Invasor.....	29
1.7 Fatores Prognósticos no Câncer de Mama.....	32
1.7.1 Marcadores Tumorais.....	40
1.7.1.1 Receptores de Estrógeno e de Progesterona.....	41
1.7.1.2 HER2.....	43
1.7.1.3 BCL2.....	45
1.7.1.4 Proteína p53.....	47
1.7.1.5 Anticorpo Monoclonal Ki-67.....	49
1.7.1.6 Proteína p63.....	51
1.7.1.7 Proteína CK8.....	53
OBJETIVOS	55
Geral.....	55
Específicos.....	55
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	56
ARTIGO (Versão em inglês)	Erro! Indicador não definido.
ARTIGO (Versão em português)	Erro! Indicador não definido.
Anexo 1- Ficha para coleta de dados	115
Anexo 2- Ficha de avaliação dos achados histopatológicos	116

Lista de Figuras

Figura 1 - Taxa de incidência anual de câncer de mama por 100.000 mulheres.....	21
Figura 2 - Taxa de mortalidade anual por câncer de mama por 100.000 mulheres. .	22
Figura 3 - Taxa bruta de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres brasileiras.....	23
Figura 4 - Subtipos de câncer de mama definidos pela expressão gênica	39
Figura 5 - Probabilidade de sobrevida geral e de sobrevida livre de doença conforme o subtipo molecular definido pela expressão gênica.	40

Lista de Tabelas

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2006 das taxas brutas de incidências por 100.000 e números de casos novos por câncer de mama feminina24

Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2006 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres nos Estados e capitais.....25

Lista de Abreviaturas

AI	Aromatase Inhibitor
ASCO	American Society of Clinical Oncology
ATAC	Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination
Bcl-2	proteína Bcl2 – marcador de apoptose
CDI	Carcinoma Ductal Invasor
CDIS	Carcinoma Ductal “in situ”
CK	citoqueratina
CMF	Ciclofosfamida, Metotrexate e 5-Fluorouracil
DNA	ácido desoxirribonucleico
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
EBCTCG	Early Breast Cancer Trialist Cooperative Group
FISH	hibridização fluorescente “in situ”
HER1	Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 1
HER2	Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 2
HERA	Herceptin Adjuvant
HR	Hazard Ratio
HCPA	Hospital de Clínicas de Porto Alegre
IA	Inibidor de Aromatase
IARC	International Agency for Research on Cancer
ILD	Intervalo Livre de Doença
IMPACT	Immediate Preoperative Anastrozole Tamoxifen or Combined with Tamoxifen
IPN	Índice Prognóstico de Nottingham
Ki-67	proteína Ki-67 marcador de proliferação celular
LN	Linfonodo
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NCCN	National Comprehensive Cancer Network
NIH	National Institute of Health
NSABP	National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
MIB-1	Anticorpo monoclonal anti Ki-67
P53	proteína p53
P63	proteína p63
RE	Receptor de Estrógeno

RNA	ácido ribonucleico
RP	Receptor de Progesterona
RL	Recidiva Local
RR	Risco relativo
SG	Sobrevida Global
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
UBC	University of British Columbia
UICC	International Union Against Cancer
AJCC	American Joint Committee on Cancer

RESUMO

Base teórica: Nas últimas décadas, o prognóstico do câncer inicial da mama tem sido baseado nas características clínicas das pacientes e em aspectos histológicos dos tumores. Nos últimos anos, subtipos moleculares de carcinoma de mama foram identificados através de estudos de perfil genético por “DNA microarray”. Esta nova classificação pode melhorar a avaliação prognóstica, porém ainda não está disponível e é de alto custo. A possibilidade de identificar subtipos moleculares através de métodos mais simples e de menor custo é particularmente importante em países com recursos limitados. A identificação de subtipos do câncer de mama é particularmente importante pelas implicações clínicas e pelas opções de tratamento. Métodos: Uma coorte retrospectiva de 71 pacientes consecutivas com carcinoma primário de mama de estágio clínico I e II, tratadas no Serviço de Mastologia do HCPA entre os anos de 1993 e 1997 com um seguimento mínimo de 5 anos. Foram revisados dados sobre características clínicas, histopatológicas, evolução clínica e desfechos apresentados no período. Foi realizada uma análise imunoistoquímica de blocos representativos dos tumores, avaliando-se o Receptor Estrogênico (RE), o Receptor de Progesterona (RP), o HER2, o Ki-67, o Bcl-2, o p53, o p63 e o CK8. Os objetivos foram determinar a prevalência do perfil molecular nesta população e em seus desfechos clínicos. Resultados: 39 tumores (54,9 %) foram luminal A; 15 tumores (21,1%) foram luminal B; 15 tumores (21,1) foram basais ou triplo negativos e somente 2 tumores (2,8%) foram HER2. Não houve diferença no prognóstico entre os subtipos de câncer de mama: luminal A (RH positivo e HER2 negativo); luminal B (RH positivo e HER2 positivo); HER2 (HER2 positivo) e basal (RH negativo, HER2 negativo) em relação à sobrevida livre de doença e à sobrevida global, embora apresentassem uma forte correlação com a diferenciação e com o grau tumoral. Provavelmente, isto se deve ao pequeno número de pacientes e ao prognóstico de pacientes com estágios iniciais da doença. Conclusões: Nossos resultados sugerem que é possível identificar os subtipos do câncer de mama pela análise imunoistoquímica de RE, RP e HER2, e que a adição de outros marcadores não melhora a estimativa de prognóstico. O perfil molecular pode ser um instrumento valioso para o manejo do câncer de mama em países com recursos limitados.

Palavras-chave: câncer de mama, neoplasia da mama, subtipos moleculares, imunohistoquímica

ABSTRACT

Background: In the last decades, prognostic evaluation of initial breast cancer is mostly based on patients' clinical and tumoral histological features. Recently, molecular subtypes of invasive breast cancer were recognized through DNA microarray profiling studies. This new classification can potentially improve the prognostic evaluation but this technology is still not widely available and it's too expensive. The possibility of identifying the molecular subtypes through simpler and cheaper methods is promising especially in countries with limited resources. The identification of breast cancer subtypes is particularly important because it has clinical implications and for treatment options.

Methods: A retrospective cohort of 71 consecutive patients with pathologic stage I or II primary breast carcinomas, treated in the HCPA Breast Unit, between 1993 and 1997 with a minimum follow up of 5 years, was studied. Histological and clinical features as well as clinical outcome and survival were reviewed. Immunohistochemical analysis was carried out in representative blocks of tumors with antibodies against Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), Human Epidermal Growth Receptor – type 2 (HER2), Ki-67, Bcl-2, p53, p63 and CK8. The endpoints were to determine the prevalence of the molecular portrait in this population and its clinical outcomes.

Results: 39 tumors (54,9 %) were Luminal A, 15 tumors (21,1%) were Luminal B, 15 tumors (21,1) were Basal or triple negative and only 2 tumors (2,8%) were HER2. There was no prognostic difference among the breast cancer subtypes: luminal A (HR-positive and HER2 negative); luminal B (HR positive and HER2 positive); HER2 overexpressing (HER2 positive) and basal (HR negative, HER2 negative) relating to disease-free and overall survival, although there was a robust correlation with tumor grade and differentiation. This is probably related to limited number of patients in this study and prognosis of initial-stage patients.

Conclusions: Our results suggest that it is possible to identify breast cancer subtypes by immunohistochemical analysis of ER, PR, HER2, and that the addition of other markers didn't improve the prognosis estimates. The molecular profile may be a very useful instrument for breast cancer managing in countries with limited resources.

Keywords: breast cancer, breast neoplasia molecular subtypes,
immunohistochemistry

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença clínica e geneticamente heterogênea com várias apresentações morfológicas e com um comportamento biológico incerto. A experiência demonstra que apresentações clínicas semelhantes podem apresentar desfechos diferentes.

Esta grande heterogeneidade do câncer de mama dificulta a avaliação precisa da agressividade do tumor; torna, ainda, complexas as decisões terapêuticas e propicia tratamentos inadequados em alguns casos. Existe, neste sentido, uma grande necessidade de se identificarem os parâmetros (indicadores prognósticos) que possam prever com acurácia a probabilidade de recorrência.

Indicadores prognósticos tradicionais do câncer de mama incluem o estado dos linfonodos regionais, o estágio da doença, o tamanho do tumor, o grau histológico, o índice mitótico e o estado dos receptores de estrógeno e de progesterona. (1) A existência de comprometimento dos linfonodos axilares é reconhecida como um dos principais indicadores de prognóstico para pacientes com câncer de mama submetidas a tratamento cirúrgico. (2-4) Entretanto, observa-se que o estado dos linfonodos não é fator prognóstico suficiente quando se é avaliado o risco de recorrência e tempo de sobrevivência, visto o significativo número de recorrências em pacientes inicialmente diagnosticadas como estágio I, sem evidência de linfonodos axilares comprometidos. (5)

Nos últimos anos, a tecnologia genômica através dos estudos com “microarrays” tem permitido a identificação e a classificação dos tumores de mama de forma mais precisa, demonstrando que a heterogeneidade clínica e biológica do câncer de mama é explicada pelas diferenças na composição genética dos tumores da mama.

Usando a técnica de “cDNA microarray”, foi possível determinar que existem diferentes subtipos de câncer de mama com perfil genético distinto e com prognósticos diversos. Perou e cols. em 2000 demonstraram que é possível

estratificar os tumores de mama pelo seu perfil genético em dois grupos, com pelo menos cinco subgrupos, de acordo com a expressão de receptores hormonais (positivo/negativo) e/ou pela origem epitelial (basal/luminal). (6)

A classificação molecular, através de um número limitado de marcadores, constitui uma possibilidade de representação da doença, permitindo definir mecanismos genéticos e melhor intervenção terapêutica. Os marcadores tumorais permitem a classificação mais precisa dos tumores com base não somente morfológica, estabelecendo para cada tumor um perfil biológico, de onde se obtêm informações prognósticas e preditivas de sensibilidade do tumor a terapias convencionais e inovadoras. (7)

Segundo Viale, a avaliação anatomopatológica apurada, considerando-se os aspectos histológicos e biológicos do carcinoma primário de mama, ainda representa o instrumento de maior utilidade — embora imperfeito —, para a predição dos desfechos clínicos da doença e a sua responsividade a intervenções clínicas. Os achados morfológicos e imunoistoquímicos da patologia tradicional espelham com grande precisão a expressão de centenas de genes, que podem ser avaliados em uma simples avaliação histológica e associados a estudos imunoistoquímicos. (8)

Um exemplo desses achados, o fenótipo triplo negativo (RE e RP negativos e HER2 negativo) pode ser considerado um marcador substituto para o tumor de tipo basal e indeterminado, como pode ser inferido do trabalho de Nielsen e cols. (7)

Deste modo, os marcadores imunoistoquímicos do carcinoma de mama podem dar indicações quanto aos receptores hormonais, aos fatores de crescimento, à capacidade de proliferação e à resistência à terapêutica.

REVISÃO DA LITERATURA

1 Carcinoma de Mama

1.1 Iniciação e Desenvolvimento do Câncer de Mama

A história natural do câncer de mama envolve a progressão através de estágios clínicos e patológicos bem definidos, iniciando-se com hiperplasia intraductal, com subsequente evolução para carcinoma “in situ” e finalmente invasor. Acredita-se que o carcinoma “in situ” seja o precursor do carcinoma invasor, baseado em estudos epidemiológicos, patológicos e moleculares. Embora a iniciação seja consequente a alterações genéticas, dados recentes apontam também para alterações epigenéticas e microambientais. (9) A iniciação do câncer de mama é decorrente de eventos genéticos e epigenéticos desencadeados em uma única célula. A progressão subsequente é impulsionada pelo acúmulo de alterações gênicas adicionais combinadas com a expansão clonal e seleção. O carcinoma de mama é caracterizado por uma longa história natural e pela heterogeneidade no seu desenvolvimento clínico. A exata etiologia do câncer de mama é desconhecida; a história familiar é, sem sombra de dúvida, um dos maiores determinantes de risco, certamente indicando fatores hereditários. Menos de 10% dos casos estão associados a genes de suscetibilidade ao câncer de mama, incluindo BRCA1, BRCA2, TP53. Provavelmente, outros genes de moderada e de baixa penetrância devem explicar a maioria dos casos; ainda, graças a poucas exceções, o mecanismo através do qual estas variantes podem influir na oncogênese mamária é desconhecido. (10)

Uma vez instalado o processo neoplásico, um longo e silente período pode existir antes que a doença seja detectada clinicamente.

O prognóstico das pacientes com câncer de mama tem sido firmado com base em características clínicas e em fatores histopatológicos no momento do diagnóstico.

As pacientes diagnosticadas com câncer de mama são suscetíveis a apresentar metástases durante um longo tempo, e a definição de cura é problemática.

A longa história do câncer de mama tem sido avaliada em termos da taxa de desenvolvimento da doença. Tendo em vista um modelo de desenvolvimento exponencial do tumor e um tempo de duplicação de cem dias, vários pesquisadores registraram resultados similares, sendo que o tempo necessário para que uma única célula maligna se desenvolva e se torne uma massa de 1cm detectável clinicamente, leva um pouco mais de oito anos. Este modelo de desenvolvimento exponencial do tumor proporcionou a primeira base teórica para o uso da quimioterapia contra o câncer. (11)

Também é possível estimar um intervalo entre a detecção mamográfica e clínica a partir de dados obtidos dos programas de rastreamento mamográfico. (12) Usando informações obtidas pelos estudos do Plano de Seguro de Saúde da Grande Nova Iorque, a média de intervalo foi estimada em 1,7 anos. Outros previram intervalos de modelos matemáticos diferentes, variando de 1,3 a 2,4 anos. (13)

Convém ressaltar que existem deficiências na concepção do desenvolvimento exponencial do tumor. Desta forma, é preciso interpretar o tempo de duplicação somente como um indicador grosseiro da agressividade do tumor, e não-válido para estimar o tempo entre a oncogênese e a apresentação clínica. Com efeito, a taxa de desenvolvimento clínico do câncer de mama leva em consideração informações que envolvem a biologia genética e molecular da doença. Assim, o câncer de mama resulta de uma série de mutações nos genes reguladores do desenvolvimento, da restauração do DNA e de outros genes. Mais do que nunca, a heterogeneidade do comportamento clínico da doença sugere que a base genética pode ser variável. (14)

1.2 Epidemiologia do Carcinoma de Mama

Em 2002, estima-se que houve 1.151.298 novos casos de câncer de mama diagnosticados, sendo 410.712 mortes causadas pela doença e mais de 4,4 milhões de mulheres vivendo com a doença em todo o mundo. (15) Nos países desenvolvidos, foram diagnosticados 636.128 casos comparados com os 514.072 casos nos países em desenvolvimento. Há, também, uma taxa de 189.765 casos de mortes por câncer de mama nos países desenvolvidos e 220.648 casos nos países em desenvolvimento, provavelmente pelo diagnóstico nestes últimos países ser mais tardio, com pior prognóstico. (Figuras 1 e 2) Na Europa, as estimativas para 2004 indicavam 371.000 casos novos de câncer de mama. (16) É importante frisar, aqui, que o câncer de mama representa também uma importante questão de saúde pública na América do Sul, sendo líder em mortalidade por câncer em mulheres de países como a Argentina, o Uruguai e, inclusive, o Brasil.

Após ter havido um aumento das taxas de mortalidade desde 1951 até 1990, esses índices vêm decrescendo na maioria dos países europeus, na América do Norte (Canadá e Estados Unidos) e do Sul (Uruguai e Argentina). Por outro lado, na Europa Central e Oriental, assim como em Hong Kong e no Japão, as taxas de mortalidade estão crescendo. É necessário referir que a contribuição para o declínio em alguns locais vem de uma grande variedade de fatores, incluindo a disseminação do rastreamento mamográfico, os diagnósticos mais precisos e mais mulheres recebendo o tratamento ideal para as suas condições. (17)

A frequência do câncer de mama apresenta uma grande variabilidade geográfica. As taxas de incidência mais altas são observadas na América do Norte, na Europa Ocidental e geralmente nos países economicamente desenvolvidos, enquanto são 10 vezes mais baixas na África e nos países do Terceiro Mundo. (15)

O impacto da redução do estágio tem sido ressaltado recentemente por meio da análise dos dados do programa Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER), por intermédio de uma análise de risco competitivo que calcula a probabilidade de morte por câncer de mama e outras causas de acordo com o estágio, com a raça e com a idade no momento do diagnóstico. Ainda, a

probabilidade de morte por câncer de mama, após aproximadamente 28 anos de seguimento, varia de 0,03 a 0,10 para pacientes com doença “in situ” até uma taxa de 0,70 a 0,85, para pacientes com doença a distância, dependendo da raça e da idade. Dentre as pacientes com doença localizada ou regional, a probabilidade de morte, após quase onze anos de seguimento, varia de 0,04 a 0,11, para pacientes com tumores de até 2 cm e RE positivos e até 0,37 a 0,53, para pacientes com tumores localmente avançados e RE negativos. (18)

Lamentavelmente, o carcinoma de mama é a malignidade mais comum que afeta as mulheres nos países ocidentais, observando-se um aumento de 1% a 2% de casos anuais. (19)

Em 2003, ocorreram 41.610 novos casos de câncer de mama na população feminina brasileira, constituindo-se, assim, a causa mais comum de morte por câncer entre as mulheres, segundo dados do Instituto Nacional de Câncer.

As estimativas para 2006 apresentaram o câncer de mama como o carcinoma mais comum entre as mulheres brasileiras, sendo o Estado do Rio Grande do Sul aquele com o maior número de novos casos, estimado em 4960, com uma taxa estimada de 88,81 casos para cada 100.000 mulheres. Na capital, Porto Alegre, a taxa bruta de incidência por 100.000 mulheres foi de 146,83. Esses dados estão demonstrados na Figura 3 e nas Tabelas 1 e 2.

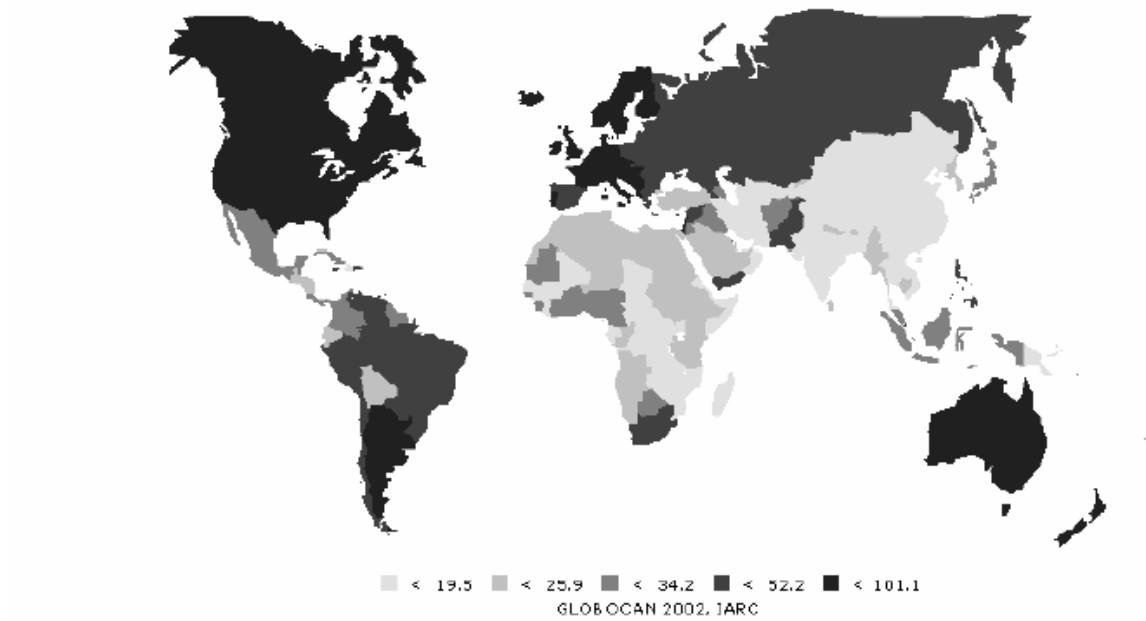


Figura 1 - Taxa de incidência anual de câncer de mama por 100.000 mulheres.

GLOBOCAN 2002, IARC.

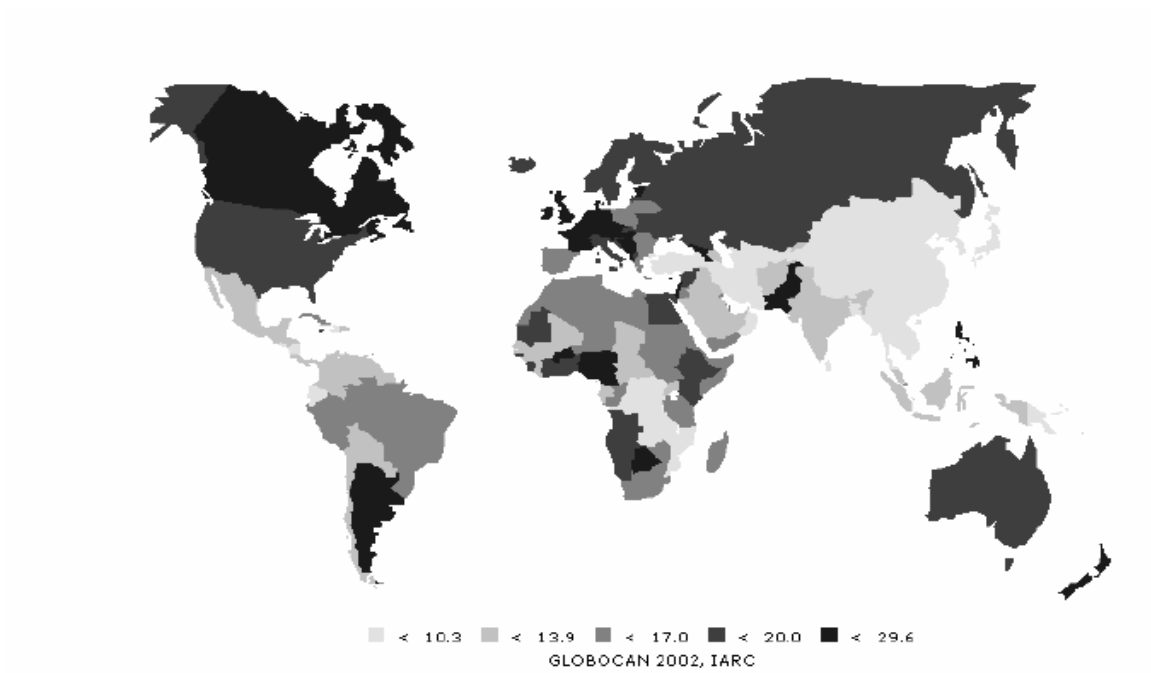


Figura 2 - Taxa de mortalidade anual por câncer de mama por 100.000 mulheres.

GLOBOCAN 2002, IARC.

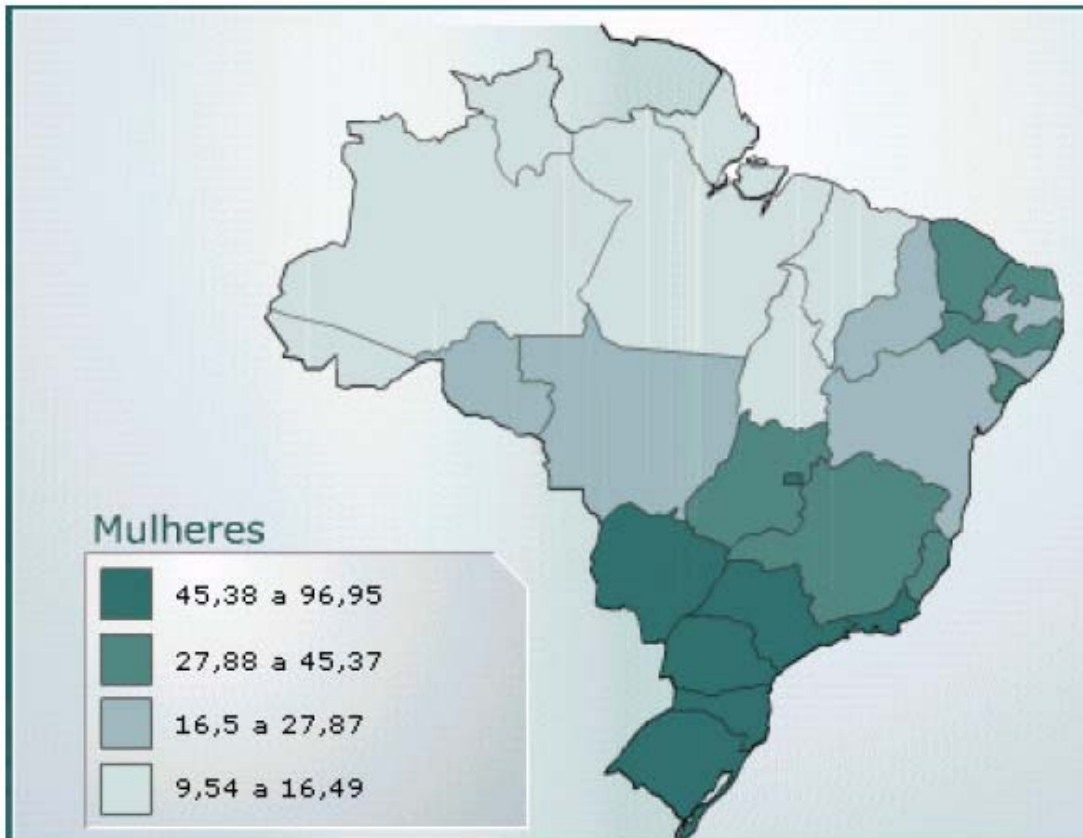


Figura 3 - Taxa bruta de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres brasileiras

Tabela 1 – Estimativas para o ano de 2006 das taxas brutas de incidências por 100.000 e números de casos novos por câncer de mama feminina

Regiões	Casos novos	Taxas brutas
Sul	9540	69,04
Sudeste	28640	70,49
Centro-Oeste	2520	37,99
Nordeste	7120	27,16
Norte	1110	15,21

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 10 de nov. 2007.

Tabela 2 – Estimativas para o ano de 2006 das taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres nos Estados e capitais

Estados	Taxa bruta	Capital	Taxa bruta
Rio Grande do Sul	88,81	Porto Alegre	146,83
São Paulo	75,45	São Paulo	100,48
Rio de Janeiro	96,95	Rio de Janeiro	128,68
Distrito Federal	53,23		
Minas Gerais	42,82	Belo Horizonte	65,95
Paraná	56,70	Curitiba	77,88
Santa Catarina	53,74	Florianópolis	73,57
Bahia	24,87	Salvador	54,67
Ceará	34,82	Fortaleza	52,61
Pernambuco	44,03	Recife	91,26

INCA/MS: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 10 de nov. 2007.

1.3. Evolução do Carcinoma de Mama Primário

A expansão do carcinoma de mama ocorre por infiltração direta do parênquima mamário, pelos ductos mamários e através do tecido linfático. Pode ocorrer infiltração direta do câncer de mama por projeções de ramificações que dão uma característica estelar no exame mamográfico. A evolução da lesão pode determinar um envolvimento direto da pele sobreposta ou da fáscia peitoral. Os pesquisadores têm enfatizado a expansão linfática verticalmente até o plexo linfático na fáscia peitoral profunda, abaixo da mama; também tem sido descrita a expansão para a região subareolar. Esses múltiplos mecanismos de expansão através da mama enfatizam a probabilidade de o câncer estar presente neste órgão bem além da massa primária palpável. Os locais mais comuns de envolvimento regional do câncer de mama são os linfonodos, axilares, supraclaviculares e da mama interna. É importante que se diga que o conhecimento do envolvimento desses locais e o seu significado permanecem importantes para o estadiamento e para o planejamento do tratamento das pacientes com câncer de mama.

Metástases à distância do carcinoma de mama podem ser observadas em uma variedade de órgãos. Desta maneira, os locais mais comuns de envolvimento metastático são os ossos, os pulmões e o fígado. Felizmente, o tempo de aparecimento das metástases distantes detectáveis pode ser extremamente longo. Frequentemente as metástases manifestam-se dez anos ou mais após o diagnóstico inicial.

1.4 Envolvimento Axilar no Câncer de Mama

O envolvimento histológico dos linfonodos axilares possui grande relação com o prognóstico. A região dos gânglios linfáticos axilares é a mais irrigada da mama, e aproximadamente 50% das pacientes com câncer de mama evidente ao exame

físico apresentam evidência histológica de envolvimento de linfonodos axilares. Destaca-se, aqui, que a probabilidade de envolvimento dos linfonodos axilares está diretamente relacionada com o desenvolvimento do tumor primário. (5) As pacientes com tumor microinvasivo são o único subgrupo cujo risco de envolvimento dos linfonodos axilares é consistentemente considerado em menos de 5%.

As pacientes com linfonodos axilares histologicamente negativos têm uma taxa de sobrevida maior do que as com envolvimento histológico. Também as pacientes com um a três linfonodos com metástases obtêm melhores resultados do que as com quatro linfonodos positivos ou mais. (20)

É necessário ressaltar que o tamanho do tumor primário e o número de linfonodos axilares envolvidos são fatores de valor prognóstico independentes. (20)

Aproximadamente 20 a 30% das pacientes com nódulos axilares negativos desenvolvem metástases distantes em um período de dez anos. Essa observação possui importantes implicações em relação à história natural da doença. Isso sugere que as metástases podem se locomover diretamente do tumor primário na mama para locais distantes pelos vasos sanguíneos, sem primeiro envolver os linfáticos regionais. Outra explicação possível seria a de que os linfonodos chamados negativos estão na verdade envolvidos com metástases ocultas, mas não-determinadas; no entanto, o aumento das secções do nódulo com a identificação de micrometástases ou o uso de técnicas imunoistoquímicas não determinaram diferenças significativas em relação à sobrevida quando comparada à de pacientes sem metástase. (21)

1.5 Tratamento Adjuvante

No câncer de mama em estágio inicial, a doença está restrita à mama e freqüentemente aos gânglios linfáticos regionais, onde pode ser cirurgicamente erradicada. Contudo, focos micrometastáticos podem permanecer como doença subclínica tanto localmente como a distância, e ao longo do tempo se pode

desenvolver uma doença metastática com repercussão clínica. O risco de recorrência é maior na primeira década, porém permanece como uma ameaça nas décadas subseqüentes.

O objetivo do tratamento adjuvante é erradicar focos metastáticos indetectáveis pela propedêutica atualmente disponível, porém já presentes no momento do diagnóstico primário. Assim sendo, é essencial que se possa estabelecer com precisão a probabilidade individual de abrigar doença metastática clinicamente oculta, usando-se, para isso, fatores prognósticos estabelecidos. Também é importante a capacidade de selecionar o tipo de tratamento adjuvante adequado isoladamente para cada paciente, baseando-se em fatores preditivos de resposta.

Recentemente o EBCTCG divulgou dados da análise de 15 anos de acompanhamento de ensaios clínicos randomizados com tratamento adjuvante, confirmando que as terapias sistêmicas (quimioterapia e hormonioterapia) estão proporcionando curas; têm-se curvas de sobrevida com diferenças significativas, embora as curvas de recorrência permaneçam praticamente estáveis após 5 anos. (22)

É preciso referir que o tratamento hormonal adjuvante deve ser oferecido a todos as pacientes com receptores hormonais positivos, independentemente da idade, do estado menopausal, do comprometimento axilar e do tamanho tumoral. (23) Observa-se, felizmente, que o tratamento do câncer de mama apresentou mudanças dramáticas positivas na última década com a introdução de novas drogas e com a melhor utilização das já conhecidas.

Embora o tamoxifeno tenha sido a droga mais importante na hormonioterapia adjuvante por mais de 20 anos, novos agentes, como os inibidores de aromatase e os inativadores dos receptores hormonais, estão em uso corrente. Os IAs de terceira geração apresentam excelentes resultados no tratamento do câncer de mama hormônio-responsivo em mulheres na menopausa através de sua potente inibição da síntese estrogênica. Diferentemente do tamoxifeno, os IAs não possuem atividade hormonal intrínseca, porém afetam a função do RE pelo bloqueio da conversão de andrógenos da adrenal para estrógenos nos tecidos periféricos e no

próprio tecido tumoral. Ensaios clínicos têm demonstrado que os IAs são mais eficientes que o tamoxifeno em prolongar o ILD e na prevenção de novos casos primários. (24)

Novas diretrizes ampliaram a utilização da terapêutica adjuvante, especialmente na ausência de comprometimento axilar. Neste sentido, as diretrizes do NCCN recomendam o tratamento adjuvante a praticamente todos os tumores acima de 0,5 cm que apresentem algum fator desfavorável, como, por exemplo, a invasão angiolímfática, o alto grau nuclear, o alto grau histológico e, acima de 1 cm, independentemente de qualquer fator. (25)

Lamentavelmente, uma grande proporção destas pacientes em estágios iniciais já poderia estar curada pelo tratamento locorregional primário — esse possui benefícios marginais em termos de ILD e de SG. Faz-se necessário, portanto, identificar com maior precisão qual é o grupo de pacientes com risco de recorrência suficientemente elevado para se justificar o emprego de terapêuticas que podem ter efeitos tóxicos e eventualmente fatais.

1.6 Patologia do Câncer de Mama Invasor

O tipo histológico mais freqüente de carcinoma de mama infiltrativo (ou invasor) é o carcinoma ductal invasor (CDI). (26, 27) Na verdade, o diagnóstico de carcinoma ductal invasor é um diagnóstico de exclusão, porque esse tipo de tumor é definido como um tipo de câncer “não classificado em nenhuma outra categoria de carcinoma mamário invasor”. (28)

Em geral, os cânceres de tipo especial compreendem 20 a 30% dos CDIs; é importante observar que, pelo menos, 90% dos tumores devem demonstrar as características histológicas definidas de um câncer de tipo especial para serem designados como tais. (26, 27)

A maioria dos CDIs possui um componente associado de carcinoma “in situ” (CDIS), ainda que a extensão do componente “in situ” varie consideravelmente. (29)

O ponto de vista dominante tem sido o de que o carcinoma invasor é derivado de um componente “in situ”, baseado não somente na coexistência das duas lesões mas também nas semelhanças histológicas entre os componentes invasores e “in situ” dentro da mesma lesão. Vários estudos documentam que os carcinomas invasores de baixo grau são mais freqüentemente associados a carcinomas “in situ” de baixo grau, e carcinomas invasores de grau elevado, com carcinomas “in situ” também de grau elevado. (29) Além disso, avaliando-se o perfil de marcadores biológicos e as anormalidades genéticas, os carcinomas invasores e “in situ” coexistentes na maioria das vezes dividem o mesmo imunofenótipo e as mesmas alterações genéticas.

É necessário referir que os carcinomas ductais invasores representam o maior grupo isolado de cânceres invasores da mama. Embora esses tumores sejam mais comumente encontrados em sua forma pura, uma minoria substancial, em torno de 28 %, apresenta focos mesclados de outros tipos histológicos. (21)

É preciso também comentar que os CDIs apresentam-se mais freqüentemente como uma massa palpável ou como uma anormalidade mamográfica. Com efeito, nenhuma característica clínica ou mamográfica específica distingue os carcinomas ductais invasivos de outros tipos histológicos.

A aparência macroscópica clássica do carcinoma ductal invasor é a de um carcinoma cirroso, caracterizado por uma massa firme e pétrea que possui uma superfície arenosa, cinza-esbranquiçada ao corte. Essa consistência e essa aparência do tumor são devidas ao estroma desmoplásico do tumor e não graças às células neoplásicas. Ainda, alguns CDIs são formados primariamente de células tumorais com pouca reação estromal desmoplásica. Embora os CDIs tenham um contorno estrelado ou espiculado com margens periféricas irregulares, algumas lesões possuem margens arredondadas e outras são totalmente circunscritas.

Urge observar que a aparência microscópica dos CDIs é altamente heterogênea em relação ao padrão de desenvolvimento, a características citológicas, à atividade mitótica, à desmoplasia estromal, à extensão do componente de CDIS associado e contorno.

Reconhecendo que os CDIs são um grupo de lesões diversas histologicamente, muitos pesquisadores têm tentado estratificá-los baseados em certas características microscópicas. O método mais comum para a subclassificação de CDIs é graduando-o, o que pode ser baseado somente nas características nucleares (graduação nuclear) ou em uma combinação de características arquiteturais ou nucleares (graduação histológica). Na prática, a graduação histológica é o método mais utilizado. Nesta graduação, os carcinomas de mama são caracterizados com base na avaliação de três características: a formação de túbulo, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica. O sistema de graduação histológica mais utilizado atualmente é o descrito por Elston e Ellis. Esse sistema é uma modificação do sistema de graduação proposto por Bloom e Richardson, em 1957. Na formação de túbulo, do pleomorfismo nuclear e da atividade mitótica, cada um desses elementos é avaliado em uma escala de 1 a 3 — a soma dos resultados para esses três parâmetros fornece o grau histológico total. Deste modo, tumores para os quais a soma dos resultados é de 3 a 5 são designados de grau 1 (bem diferenciado); os com soma de 6 e 7 são designados de grau 2 (moderadamente diferenciado) e aqueles cujo resultado somou 8 ou 9 são designados de grau 3 (insatisfatoriamente diferenciado). (27)

É necessário dizer que a expressão dos marcadores biológicos, como os receptores de estrogênio e de progesterona, os fatores de crescimento, os produtos de genes supressores de tumor, oncogenes e outros marcadores, são altamente variáveis no carcinoma ductal invasivo, o que pode ser antecipado por sua heterogeneidade histológica.

Ainda que os CDIs tenham o pior prognóstico de todos os cânceres de mama invasivos, mesmo dentro desse grupo, subgrupos de prognóstico mais favoráveis podem ser identificados.

1.7 Fatores Prognósticos no Câncer de Mama

Um fator prognóstico é qualquer elemento disponível no momento do tratamento primário que se correlacione com o Intervalo Livre de Doença (ILD) ou sobrevida global (SG), na ausência de terapia sistêmica adjuvante, e, como resultado, é capaz de se correlacionar com a história natural da doença. Em contraste, um fator preditivo é qualquer elemento associado com a resposta a um determinado tratamento. Alguns fatores, como os receptores hormonais e o HER2 superexpresso, são preditivos e prognósticos simultaneamente.

Tais fatores são usados para auxiliar na caracterização do potencial de risco de recorrência e, também, na individualização da terapêutica adjuvante quando indicada.

Os fatores prognósticos tradicionais incluem a idade, o tamanho do tumor, o comprometimento dos linfonodos, o grau tumoral, a invasão angiolinfática e os receptores hormonais. (1)

Clark e cols., estudando esses fatores, sugeriram três justificativas para o seu emprego. A primeira razão é identificar pacientes com bom prognóstico para as quais a terapia adjuvante sistêmica não oferece benefício suficiente a fim de compensar os riscos. A segunda é reconhecer pacientes cujo prognóstico seja desfavorável o suficiente para se justificar uma abordagem mais agressiva, e a terceira é selecionar pacientes que poderão ser beneficiados por diferentes tipos de tratamento. (30)

Os fatores prognósticos que são considerados variáveis independentes incluem o estado da axila, o tamanho tumoral e os receptores hormonais (estrógeno/progesterona). Os fatores adicionais incluem o grau histológico, a presença de invasão linfovascular, a idade e a raça. Desta forma, a análise destes fatores é utilizada para determinar prognóstico através da observação isolada e também combinada em sistemas de classificação de prognóstico, conseqüentemente do risco de recorrência e de morte por câncer de mama. A maioria dos casos de câncer de mama é do tipo ductal invasor, sem outras

especificações, para os quais o grau histológico é um dos mais importantes preditores de comportamento biológico. É necessário referir que os carcinomas de grau histológico III são fortemente associados com o menor intervalo livre de doença e com a sobrevida global do que os de grau I e II. (27) Destaca-se, mais uma vez, que a existência de comprometimento dos linfonodos axilares é reconhecida como um dos principais indicadores de prognóstico para pacientes com câncer de mama submetidas a tratamento cirúrgico. (3) O estado da axila é um fator tempo-dependente, pois a chance de comprometimento aumenta à medida que o tumor cresce. Entretanto, o estado dos linfonodos não é fator prognóstico suficiente quando se avaliam o risco de recorrência e o tempo de sobrevida, ocorrendo um significativo número de recorrências em pacientes inicialmente diagnosticadas como estágio I, sem evidência de linfonodos axilares comprometidos; isoladamente, o estado dos linfonodos é incapaz de definir um grupo de cura ou com 100% de mortalidade. (31)

Atualmente a prática padronizada é a de administrar o tratamento adjuvante a todos os pacientes com linfonodos positivos; no entanto, existem diferenças de risco que admitem tratamentos mais agressivos para determinados grupos de paciente. Além disso, existem muitas pacientes com linfonodos negativos que são beneficiadas por uma terapia adjuvante sistêmica. (22)

Outro aspecto que merece a nossa consideração é que o tamanho do tumor é também um fator prognóstico independente. Em muitas análises, é o segundo em importância como fator independente, atrás apenas do estado dos linfonodos. Neste sentido, o tamanho do tumor está diretamente relacionado à possibilidade de metástases axilares, ao aumento de probabilidade de recorrência e de morte. O prognóstico favorável do carcinoma ductal invasor não-palpável em relação ao clinicamente palpável e os detectados por rastreamento mamográfico em relação aos detectados ao acaso facilmente se explicam devido ao seu menor tamanho. (32)

Carter, ao analisar 24740 casos registrados no Surveillance, Epidemiology and End Results (SEER) Program of the National Cancer Institute, refere que as taxas de sobrevida em 5 anos variaram de 45,5% para tumores iguais ou maiores de 5 centímetros com axila positiva a 96,3% para tumores menores de 2 centímetros sem linfonodos comprometidos. Registra-se, aqui, que o diâmetro tumoral e o estado

dos linfonodos apresentam-se independentes, porém são aditivos como fatores prognósticos. Desta forma, conforme aumenta o tamanho do tumor, ocorre a redução da sobrevida independentemente do estado dos linfonodos; ainda, com o aumento do comprometimento dos linfonodos, a sobrevida diminui, independentemente do tamanho do tumor. Também foi relatada uma relação linear entre o diâmetro tumoral e a porcentagem de casos com o envolvimento de linfonodos.

A influência do tamanho do tumor primário pode ser observada tanto em pacientes com linfonodos negativos como positivos. Tal relação provavelmente reflete o aumento da disseminação linfática e vascular com o crescimento do tumor.

É de particular interesse nos casos com axila negativa aonde o tamanho tumoral fornece facilmente a possibilidade de identificação de pacientes com baixo ou alto risco para recorrência. (20)

Em estudo recente, pesquisando-se o banco de dados do SEER com ênfase para o tamanho tumoral e para a mortalidade, identificaram-se 83686 casos de tumores T1-T2, sendo 58070 com axila negativa e 25616 com axila positiva com desfecho final de mortalidade. Observou-se um aumento de mortalidade de 10 a 25% em axilas negativas e de 20 a 40% em axilas positivas a cada milímetro de aumento entre tumores de 3 a 50 milímetros de diâmetro, independentemente do estado da axila. (33)

Um outro fator que merece a nossa atenção diz respeito à idade. Essa, no momento do diagnóstico, tem sido associada ao prognóstico. Analisando-se tal aspecto, Nixon e cols. estudaram 1398 pacientes das quais 107 tinham menos de 35 anos no momento do diagnóstico e foram acompanhadas por um período médio de 99 meses. As pacientes com esse perfil apresentaram um risco de recorrência global e a distância aumentados em relação às mais velhas. As mais jovens apresentavam fatores associados a pior prognóstico, como o alto grau histológico, a invasão linfovascular, a necrose tumoral e os receptores hormonais negativos; mesmo considerando as variações terapêuticas e os fatores de risco relacionados à agressividade tumoral, a idade permaneceu como um fator significativo para a

recorrência local (RR, 1.70), para a recorrência a distância (RR, 1.60) e para a mortalidade (RR, 1.50). (34)

Jayasinghe e cols., ao estudarem uma coorte de 393 pacientes com diagnóstico antes dos 40 anos de idade, observaram que a sobrevida em 10 anos para o grupo de jovens (<40 anos) foi de 49%, sendo significativamente inferior ao das pacientes de meia-idade (40-69 anos) com 73%. Para mulheres jovens com axila negativa, a taxa de sobrevida de 68% foi significativamente pior ($p=0.011$) do que as de meia-idade com 90% e das idosas com 80%, após ajuste para outros fatores, como o tamanho tumoral, o comprometimento axilar e o grau histológico — assim, a idade de <40 anos apresentou um risco maior de morte. (35)

É louvável observar que várias formas de associação e de classificação de fatores clínicos, histológicos e biológicos têm sido adotadas para auxiliar na decisão terapêutica e na estimativa de prognóstico.

A classificação que TNM da UICC/AJCC, atualmente em sua sexta edição de 2006, agrupa os casos de acordo com os dados clínico-patológicos no momento do diagnóstico primário e no tratamento cirúrgico primário. Tal classificação é usada para selecionar pacientes e relatar os desfechos em ensaios clínicos, possibilitando aos clínicos avaliar com base lógica se as estratégias de tratamento relatadas na literatura serão apropriadas para os seus pacientes.

O estadiamento clínico também fornece informação de grande utilidade sobre o estado atual da detecção, do manejo e do sucesso na implementação de novas estratégias no tratamento do câncer de mama.

Ainda, esse estadiamento (cTNM) é empregado para fazer recomendações sobre o tratamento locorregional. Baseia-se, pois, em evidências coletadas antes do tratamento do tumor primário, a saber, o exame físico, a avaliação por imagens e a confirmação anatomopatológica de câncer. Desta maneira, a classificação patológica (pTNM) é utilizada para estimar o prognóstico e para se fazer recomendações sobre o tratamento adjuvante. Neste sentido, ela associa os resultados do estadiamento clínico com a evidência obtida na cirurgia com a avaliação da histologia do tumor e com o estado dos linfonodos. (36)

O Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) é um índice baseado em um estudo retrospectivo, que busca prever a sobrevida em pacientes com câncer de mama. Esse índice leva em consideração o tamanho do tumor, o estado dos linfonodos e o grau histológico, permitindo estratificar as pacientes em grupos com prognóstico distinto.

O índice é calculado, considerando-se alguns aspectos, tais como o tamanho do tumor (em centímetros), multiplicado por 0,2; o grau histológico (G I=1, G II=2, G III=3) e o estado dos linfonodos (LN negativo=1, LN positivos (1 a 3) =2, LN positivos (4 ou mais)=3). É importante referir que a soma dos valores classifica as pacientes em grupos de risco. Ainda, consideram-se o grupo de bom prognóstico com soma <3,4; o de prognóstico intermediário, com soma de 3,4 a 5,4 e o de mau prognóstico, com soma >5,4. Ao empregarem tais critérios, Galea e cols., em estudo retrospectivo com uma série de 1629 pacientes, identificaram: 1) bom prognóstico, 29% da amostra com sobrevida de 80% em 15 anos; 2) prognóstico moderado, 54% dos pacientes com sobrevida de 42% em 15 anos; 3) prognóstico pobre, 17% das pacientes com 13% de sobrevida em 15 anos; sendo de 83% a sobrevida da população feminina ajustada para a idade. (31)

Na última década, com o emprego da técnica de “cDNA microarray” para avaliar a expressão gênica dos tumores, foi possível determinar que existem diferentes subtipos de câncer de mama com perfil genético distinto e com prognósticos diferentes. Perou e cols. em 2000 demonstraram que é possível estratificar os tumores de mama pelo seu perfil genético em dois grupos, com pelo menos cinco subgrupos, de acordo com a expressão de receptores hormonais (positivo/negativo) e/ou pela origem epitelial (basal/luminal). Deste modo, o grupo negativo para receptores estrogênicos apresenta três subtipos: um, com superexpressão de HER2; um com “normal like”; um basal, positivo para EGFR (receptor para o fator de crescimento epitelial), com ausência de receptores para estrógeno e para progesterona e com ausência de HER2 (subtipo triplo negativo). O grupo com receptores hormonais positivos possui dois subtipos: luminal A e luminal B. (6, 37-41)

A identificação destes subtipos reveste-se, pois, de importância clínica, visto que o subtipo luminal é o mais comum câncer de mama e em geral apresenta bom

prognóstico, com significativo aumento no intervalo livre de doença e sobrevida global, embora os subtipos luminal A e luminal B apresentem diferenças na expressão gênica e em seu prognóstico. (39, 40)

O subtipo luminal A está mais freqüentemente associado ao grau histológico baixo ou intermediário e à ausência de comprometimento de linfonodos. (40)

O subtipo denominado HER2, caracteristicamente, é destituído de receptores hormonais, comumente associado à mutação de PT53 (40-80%) e com grau nuclear 3. (39) Apresenta menor intervalo livre de doença e sobrevida global, se comparado aos tumores do tipo luminal. Tal subtipo recebe atenção especial, porque pode ser tratado de forma individualizada através do Trastuzumabe, um anticorpo específico que bloqueia a sua atividade biológica.

É necessário referir que um subtipo de carcinoma de mama bem definido é caracterizado pela ausência de amplificação HER2, RE-negativo e RP-negativo — são os chamados tumores triplo negativos, determinados a partir da imunoistoquímica e confirmados a partir de sua expressão gênica, com o mesmo padrão de expressão molecular do subtipo basal, mantendo-se o seu padrão prognóstico. (42)

Observa-se também que o fenótipo triplo negativo pode ser considerado um marcador substituto para o tumor de tipo basal, como pode ser inferido do trabalho de Kreike e cols.(42)

Nielsen e cols. identificaram um conjunto de marcadores imunoistoquímicos que poderão vir a ser incorporados, na prática clínica, para se reconhecer carcinomas de mama do subtipo basal, com prognóstico mais reservado. Com efeito, este painel de marcadores, revisado de acordo com a expressão gênica dos tumores, pode melhor definir o subtipo basal por imunoistoquímica, incluindo, além dos marcadores de RE e HER2 negativos, CK 5/6 e/ou HER1 positivos (7). Assim, o receptor do fator de crescimento epidérmico – HER1 – é um marcador que pode auxiliar a distinguir os carcinomas de mama subtipo basal.

Também está descrito um quinto subtipo, luminal C, associado com pior prognóstico dentro do grupo luminal (A e B), principalmente quanto à maior recidiva.

Tal diferença possivelmente se deve pela similaridade na expressão de alguns genes que são característicos dos tumores RE-negativos, como subtipos basal e HER2+. (40)

A expressão de marcadores para CK 5/6 e CK 17 no subtipo basal associa-se a piores desfechos para pacientes com carcinoma de mama, nas pacientes com linfonodos axilares negativos. (42) Contrariamente, Nielsen e cols identificaram que os mesmos marcadores citados, quando positivos, são preditores significativos de pior prognóstico nas pacientes com linfonodos axilares positivos (7) — essa diferença pode ser devido a coortes de pacientes diferentes.

O marcador HER1, citado anteriormente, é mais fácil de se determinar e de se quantificar do que CK 5/6 e principalmente CK 17. Não é tão específico como CK 5/6, porém aparece em frequência suficiente; combinado a outros marcadores, permite identificar por imunistoquímica o subtipo basal. Mais importante ainda, o HER1 é alvo para algumas drogas recentemente desenvolvidas, incluindo anticorpos, como o cetuximab e inibidores da tirosina-quinase, como gefitinib e erlotinib. (7)

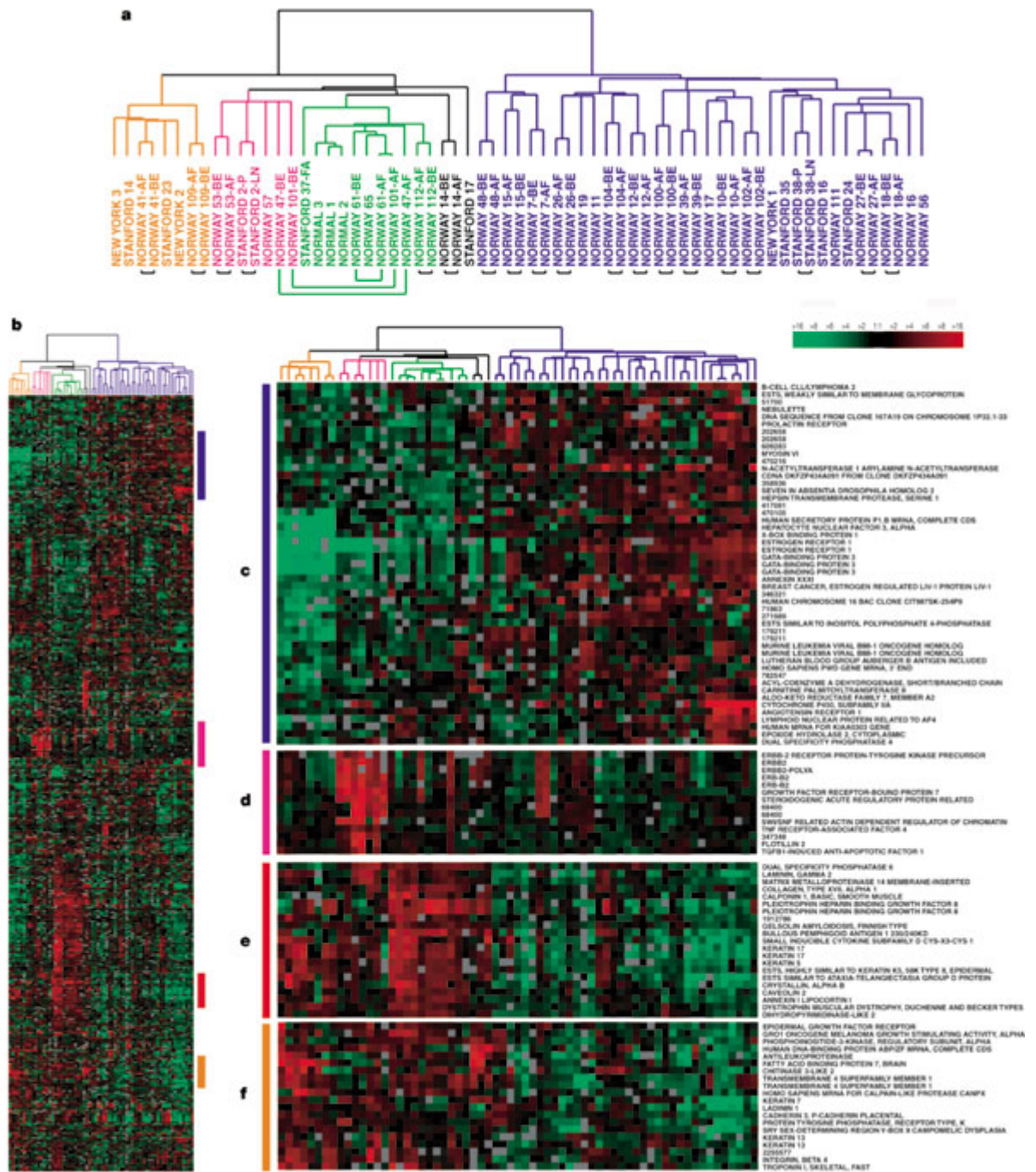


Figura 4 - Subtipos de câncer de mama definidos pela expressão gênica

Perou, CM et al. Nature 406, 747-752 (17 August 2000)(6)

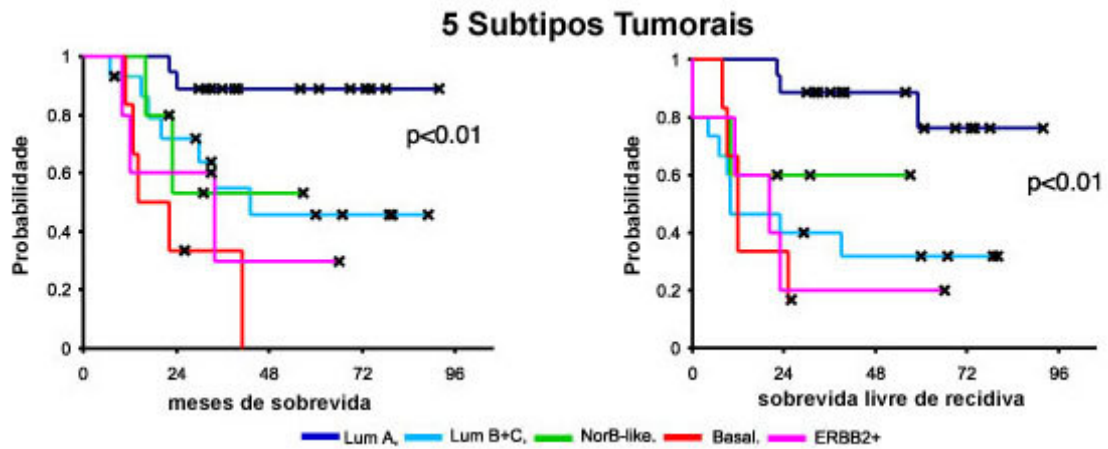


Figura 5 - Probabilidade de sobrevida geral e de sobrevida livre de doença conforme o subtipo molecular definido pela expressão gênica.

Sorlie, T; et al. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 10869-10874.(39)

1.7.1 Marcadores Tumoriais

Um dos maiores avanços no manejo do câncer de mama é a acurácia em prever os desfechos clínicos para cada paciente, de forma a permitir quem irá beneficiar-se da terapia adjuvante. Até o presente, as variáveis, como o estado dos linfonodos, o tamanho tumoral e o grau tumoral, têm sido os fatores mais determinantes do prognóstico das pacientes com câncer de mama. (32) Em muitos centros, tais variáveis são combinadas ao Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) que gera um escore prognóstico para cada paciente mais preditivo dos desfechos do que qualquer variável isolada. Entretanto, apesar de ser ampla a aplicabilidade dos índices clinicopatológicos, como o IPN, eles não possuem precisão para prever os desfechos para todas as pacientes (23, 43); permanecem incapazes, por exemplo, de separar os 20-30% das pacientes com linfonodos negativos que irão recidivar das 70-80% que não irão. Como resultado, muitas pacientes recebem tratamento adjuvante desnecessariamente.

1.7.1.1 Receptores de Estrógeno e de Progesterona

O epitélio mamário normal habitualmente expressa receptores para estrógeno e para progesterona, e esses são mediadores do processo de divisão celular nestas células. O RE é codificado pelo gene ESR1, localizado no cromossoma 6q25 (44), e o RP é codificado pelo gene PGR, localizado no cromossoma 11q22. (45)

Os dois receptores são pesquisados porque a síntese de receptores de progesterona requer uma sinalização de um receptor estrogênico intacto. Tumores que expressam ambos os receptores presumidamente se aproximam mais do tecido normal do que aqueles que não os expressam — neste sentido, são associados com melhor prognóstico. É importante ressaltar que aproximadamente dois terços dos casos de câncer de mama expressam esses receptores. A sua presença é fundamental como fator preditivo de hormônio responsividade quando houver indicação de tratamento adjuvante ou paliativo no câncer de mama. (23)

Deste modo, observa-se que os carcinomas de mama podem ser estrógenos dependentes ou independentes. Os receptores de estrógeno (RE) são conhecidos por estimular não apenas a proliferação celular mas também a indução da síntese de proteínas específicas; como já foi referido, a mais importante dessas é o receptor de progesterona (RP), conhecido como estrutura celular estrógeno-dependente. Portanto, faz sentido pensar que a determinação do RP aumenta a sensibilidade na previsão de resposta terapêutica. (46) Aproximadamente 50 a 60% das mulheres com positividade para RE respondem à terapêutica hormonal, ao passo que apenas 10% daquelas com RE negativo apresentam a mesma resposta. (3, 47)

As evidências acumuladas assinalam que o RE possui relação com prognóstico, tanto no período livre de doença como na sobrevida. No entanto, casuísticas demonstram que a diferença em relação aos receptores negativos varia somente de 8 a 10%, razão pela qual a significância estatística só foi possível com ensaios reprodutíveis em grande número de casos. Além disso, a positividade do RP também tem sido associada à maior sobrevida e ao tempo livre de doença. (46)

Deve-se comentar, agora, que os receptores de estrógeno e de progesterona

associam-se significativamente ao grau do tumor e ao subtipo histológico. Neste sentido, o grau nuclear baixo correlaciona-se, com maior frequência, a RE positivo, ao passo que o grau elevado, a RE negativo. A título de exemplificação, o carcinoma lobular e o carcinoma colóide apresentam particular tendência a serem RE positivos, ao contrário do que ocorre com os carcinomas medulares. Ainda, carcinomas de mama com maior atividade proliferativa, medida por imunistoquímica ou análises de DNA, correlacionam-se com menor positividade para RE. (46)

Como há variações de resposta ao tratamento hormonal em pacientes com RE positivo, pode-se supor que haja defeitos em receptores, mesmo que positivos nos ensaios imunistoquímicos. Algumas linhas experimentais de células dotadas de RE evidenciam mutações provenientes de códigos genéticos defeituosos que, em geral, exibem defeitos na conformação espacial do receptor, impedindo a ação das drogas anti-hormonais; entretanto, possuem eficácia na produção de seus efeitos biológicos tanto na atividade proliferativa como no aparecimento do RP. Tal fenômeno explica porque 5% dos cânceres de mama são RE negativos e RP positivos. Também se deve observar que esse subtipo de linhagem celular apresenta prognóstico favorável. (47) Apesar da presença de receptores hormonais, uma proporção de pacientes poderá não responder ao tratamento endócrino, surgindo, aqui, a importância da análise dos fatores biológicos de forma associada.

Wright e cols. descreveram pela primeira vez que a coexpressão de HER2 foi associada com uma redução de 48% para 20% do grau de resposta de pacientes RE positivo à terapia hormonal de primeira linha para o carcinoma de mama metastático (48-51); ainda que outros estudos não tenham encontrado relação entre o aumento de células, expressando o HER2, e a diminuição do intervalo livre de doença ou sobrevida. Desta maneira, conclui-se que a expressão do HER2 em carcinoma metastático RE+ não está significativamente associada a uma resposta pobre ao tamoxifeno ou a um curso clínico mais agressivo, sugerindo que estudos prévios com conclusões contrárias poderiam ocorrer devido à falha de excluir tumores RE-, menos propensos a responder ao tamoxifeno e mais frequentemente associados à superexpressão de HER2. (52)

Desta forma, os receptores hormonais tornaram-se um dos mais importantes marcadores prognósticos e preditivos para o câncer de mama, sendo a expressão

do receptor de estrógeno inversamente correlacionada com o grau histológico(51) e um indicador de resposta à terapia hormonal. (51, 53)

1.7.1.2 HER2

O gene c-erbB-2 codifica uma proteína da membrana celular expressa em praticamente todas as células epiteliais, a qual constitui o receptor de tirosina-quinase (conhecido também como HER2,HER2/neu), pertencente à mesma família do receptor do fator de crescimento epidérmico. (3) Slamon e cols. foram os primeiros a ligar a superexpressão do HER2 com o mau prognóstico no câncer de mama. Eles estudaram a associação entre a amplificação do gene HER2 com a recorrência e morte em pacientes com axila positiva e demonstraram que a amplificação do HER2 estava significativamente associada com a taxa de recorrência e com a diminuição da sobrevida. Convém frisar que essas correlações são independentes de outros fatores prognósticos e tão significativas quanto o estado da axila, para recorrência e morte. Tal estudo também evidenciou que mulheres com superexpressão de HER2 tinham sobrevida média de 3 anos, enquanto aquelas sem superexpressão tinham sobrevida média de 6-7 anos. (54) Anos mais tarde, Slamon e cols. apontaram que a amplificação gênica do HER2 correlacionava-se com a superexpressão do HER2, avaliado pela imunistoquímica. (55)

É fundamental comentar aqui que esse receptor é amplificado e superexpresso (como medido pela análise IHQ) em até 30% dos casos de câncer invasor e correlaciona-se com um pior prognóstico. (54-57)

Aproximadamente 27% dos carcinomas mamários possuem aumento da imunoexpressão de HER2, relacionado com a amplificação gênica. Outros 63% não apresentam nenhuma amplificação gênica e, ainda, têm baixos níveis de HER2. No entanto, outros 10% assinalam o aumento da imunoexpressão de HER2, sem nenhuma amplificação de seu gene. (3, 46)

É necessário referir que o papel biológico exato desta sinalização na rota oncogênica na mama não está bem definido e pode estar relacionado a um grande número de aspectos fenotípicos do câncer. Inclui-se, aqui, a progressão da hormônio dependência e a sua perda, a sua habilidade metastática e a sua resistência a drogas. (57)

O HER2 é superexpresso em aproximadamente 20% a 30% dos tumores de mama invasores de alto grau — tem sido, pois, um indicador prognóstico valioso. (53, 58-61) O estado do HER2 também prediz a resposta antiestrogênica e a quimioterapia citotóxica (3), sendo que os pacientes com forte expressão de HER2 parecem ter uma pobre resposta aos agentes hormonais como o tamoxifeno e também aos quimioterápicos não-antracíclicos. (58)

Acredita-se que a resistência à terapia hormonal tanto “in vitro” como “in vivo” está relacionada ao “bypass” do receptor de estrógeno pelo sinal do receptor do fator de crescimento. É digno de nota mencionar que dois grandes estudos com câncer primário de mama encontraram uma correlação significativa entre os níveis elevados de HER2 na circulação e os baixos níveis de receptores de estrógeno e de progesterona no tumor primário. (62, 63)

Felizmente, pacientes com tumores, apresentando elevada expressão de HER2, apresentam maior sobrevida livre da doença, quando tratados com moderadas a altas doses de doxurrubicina. (3)

À guisa de conclusão, é importante ressaltar os estudos que associam o HER2 a uma variedade de marcadores de pior prognóstico. Incluem-se, aqui, o RE negativo, as metástases nodais, o maior tamanho tumoral, o alto grau tumoral, os tipos histológicos mais agressivos, tais como o carcinoma inflamatório, a ploidia de DNA aumentada, a alta atividade mitótica e a presença de metástases hematogênicas a distância (46). Ainda, a superexpressão de HER2 também está correlacionada com uma diminuição da sobrevida. (54, 60)

1.7.1.3 BCL2

O oncogene Bcl-2, localizado no cromossomo 18q21, foi inicialmente descoberto como o gene envolvido na translocação 14;18, comum nos linfomas foliculares. (64) Este gene codifica uma proteína de membrana mitocondrial de 26 kDa e atua bloqueando a morte celular por apoptose. (65) No câncer de mama primário, a expressão de Bcl-2 parece estar fortemente relacionada aos receptores de estrógeno e aos de progesterona e inversamente diz respeito à expressão do receptor ao fator de crescimento epidérmico, às proteínas HER2 e p53. (66)

Existem discordâncias se a proteína Bcl-2 seria um fator independente prognóstico em pacientes com carcinoma de mama linfonodo-positivo. Em muitos estudos, o Bcl-2 parece ser dependente da expressão de outros fatores, como a expressão do p53 em pacientes com linfonodos axilares positivos. (66) Além disso, carcinomas de mama p53(-)/Bcl-2(+) apresentam uma melhor resposta à terapia hormonal em relação aos carcinomas p53(-)/Bcl-2(-). (67)

Em um estudo recente, que abrange 441 mulheres sem comprometimento dos linfonodos axilares, foi evidenciada uma correlação positiva entre a expressão de RE e RP e baixo grau tumoral. (65) Neste mesmo estudo, uma elevada expressão de Bcl-2 apresentou uma correlação negativa com o p53, com o HER-2, com o Ki-67, com o índice mitótico e com o tamanho tumoral. Deste modo, parece que a referida expressão está associada com características clinicopatológicas favoráveis (tumores com menores dimensões, bem diferenciados, RE positivo e com menor envolvimento de linfonodos). (68, 69)

Também se deve observar que o Bcl-2 apresenta uma expressão que varia consideravelmente na literatura. Dimitrakakis et al. descrevem, por exemplo, uma expressão de 15%. (70) Outros estudos relatam uma frequência em mais de 70% dos carcinomas de mama de baixo grau e em 50% dos carcinomas de mama em geral. (71)

Interroga-se, aqui, como o Bcl-2, sendo uma proteína anti-apoptótica, confere um prognóstico favorável ao câncer de mama. Como a suscetibilidade à

quimioterapia é creditada à habilidade de a célula entrar em apoptose, a superexpressão de proteínas anti-apoptóticas, como o Bcl-2, tem sido postulada como promotora de resistência aos quimioterápicos em tumores sólidos. Entretanto, nos casos de carcinoma de mama, uma expressão elevada de Bcl-2 está associada com marcadores de bom prognóstico, incluindo a expressão de RE e RP e baixo grau tumoral. Além disso, no grupo de pacientes com tumores RE, a elevada expressão de Bcl-2 está associada com doença de evolução mais indolente e com boa resposta ao tamoxifeno, independentemente do grau de positividade de RE. (71, 72)

Em um estudo, nas pacientes com carcinoma de mama metastático, tratadas com várias combinações de quimioterápicos não-taxanos, a alta expressão de Bcl-2 foi associada com resistência aos tratamentos com os esquemas CMF (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil) e FAC (5-fluorouracil, adriamicina, ciclofosfamida). (73) Apesar disso, outro estudo não encontrou correlação entre a expressão de Bcl-2 e a resposta ao esquema FEC (5-fluorouracil, epirrubicina, ciclofosfamida) em 103 pacientes com carcinoma de mama metastático. (74) Ainda, em estudo envolvendo 87 pacientes com câncer de mama metastático, a resposta ao plaquitaxel foi independente do grau de expressão do Bcl-2. (71)

A expressão de 8 marcadores protéicos (RE, RP, Bcl-2, ciclina E, p53, MIB-1, citoqueratinas 5/6 e HER-2), em mais de 930 casos, foi avaliada, revelando uma associação significativa com sobrevida em 10 anos; no entanto, tal painel imunoistoquímico não foi superior ao Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) em prever sobrevida a longo prazo. Contudo, o Bcl-2, como um marcador isolado, aumentou o poder prognóstico do IPN. (68)

Tumores com expressão de Bcl-2, no grupo com IPN moderado, tiveram uma redução em 52% no risco de morte quando comparados com casos sem expressão de Bcl-2 ($p = 0,004$). A expressão de Bcl-2, em grupos de pior prognóstico pelo IPN, apresentam uma diminuição de 41% do risco de morte se comparados com casos negativos para Bcl-2 ($p = 0,003$). Para os três marcadores (RE, RP e Bcl-2), o efeito benéfico da expressão positiva foi máxima nos primeiros 59 meses após o diagnóstico, decrescendo com o tempo. Análises multivariadas confirmaram o significado prognóstico independente do Bcl-2 ($P = 0,002$) na presença do IPN ($P \pm$

0,001), nesta série de casos. Desta forma, o Bcl-2 pode ser usado em conjunto ao IPN a fim de melhorar a avaliação prognóstica de cada paciente individualmente, em particular nos cinco primeiros anos após o diagnóstico do carcinoma de mama invasor. (68)

Se o papel prognóstico do Bcl-2 é consequência de sua participação na apoptose ou de funções não-apoptóticas que lhe são designadas, isso ainda permanece sem conhecimento. Funções não-apoptóticas têm sido descritas; experimentos “in vitro” revelaram que altos níveis de Bcl-2 podem resultar em um aumento dramático da inibição de crescimento em diferentes tipos celulares; ainda, tem sido proposto um papel no prolongamento do ciclo celular. (68)

1.7.1.4 Proteína p53

A ocorrência de proteínas p53 mutantes nos carcinomas de mama é comum, variando em torno de 20% a 50% dos tumores estudados. (3, 66, 75, 76) O TP53 é o mais conhecido gene mutante relacionado com tumores. Sobre isso, é importante referir que mutações de TP53, pela perda de heterozigosidade, são diagnosticadas em aproximadamente 50% das 6,5 milhões de pessoas com câncer, todo ano, por todo mundo.

O p53 “selvagem”, encontrado em populações sem câncer, é expresso em baixas quantidades em células normais, ajudando a coordenar os complexos sistemas de resposta a lesões de DNA, ao protegê-las de alterações que podem levar à neoplasia. Possui, também, funções regulatórias da entrada das células no ciclo de proliferação, de síntese de DNA e de morte celular programada (apoptose). O p53 é também capaz de suprimir outros genes, relacionados com transcrição gênica. Mais do que nunca, o p53 “selvagem” é fundamental para o controle do crescimento celular. A expressão do gene supressor tumoral p53 também pode induzir apoptose por suprimir o Bcl-2. (58, 70) É, pois, a sua expressão mutante que está associada com o desenvolvimento de tumores, ainda possuindo baixo poder

para induzir apoptose. (70) Convém destacar, agora, que a proteína p53 mutante possui uma meia-vida mais longa que a forma “selvagem” e é capaz de ligar-se ao p53 “selvagem”, formando um complexo — deste modo, inativando-o. (75)

A inativação de genes que controlam a apoptose também pode contribuir para o processo multifatorial da carcinogênese e do desenvolvimento tumoral por reduzir a taxa de morte celular, permitindo o acúmulo de defeitos genéticos. (58, 70) Neste sentido, a determinação imunohistoquímica do p53 mutante relaciona-se com pior prognóstico, com menor tempo livre de doença, com menor sobrevida, com RE negativo, com alto grau nuclear, com estágios avançados de neoplasia, de aneuploidia, com altos índices proliferativos e com a presença de HER2 (53, 58, 60, 61, 75) — esse prognóstico parece ser independente do comprometimento de linfonodos. (3, 66, 76) Também não parece haver correlação significativa entre a expressão de p53 e Ki-67. (75)

Em outros estudos, a avaliação de tumores com mutações para p53 mostrou-se benéfica em identificar mulheres com elevado risco de recorrência da doença e morte, quando o tumor tem amplificação de HER2; todavia, na ausência dessa amplificação, a presença da mutação em p53 pode não representar informação prognóstica independente adicional. (61) Por outro lado, Al-Moundhri e cols. demonstraram que o p53 parece ser um fator prognóstico independente associado com recorrência precoce da doença e com pior sobrevida. (58)

Alguns estudos têm avaliado as alterações em p53 (proteína codificada pelo gene TP53) em relação à sensibilidade à quimioterapia em câncer de mama, assim como em outras malignidades. Estudos que determinam a expressão de p53 por imunohistoquímica têm, com algumas exceções (77), falhado em prever o valor da expressão aumentada de p53 em relação à resposta de diferentes regimes de quimioterapia em pacientes com carcinoma de mama. É necessário advertir que nem todas as mutações no gene TP53 causam o aumento da expressão da proteína p53 detectável por imunohistoquímica. (78) Sem dúvida, a detecção de alterações ao nível do gene TP53 parece ser superior à avaliação imunohistoquímica do p53 como fator prognóstico, quando ambas as análises são realizadas, em paralelo, no mesmo grupo de pacientes com câncer de mama. (79) Geisler e cols. identificaram que mutações no gene TP53 que afetam alguns domínios codificantes da proteína p53

estão associadas com resistência à terapia com doxorrubicina em pacientes com carcinoma de mama; entretanto, são necessários estudos prospectivos que possam confirmar tal correlação entre essas mutações e a resistência à quimioterapia. (80)

1.7.1.5 Anticorpo Monoclonal Ki-67

O Ki-67 foi identificado por Gerdes e cols. em 1991(81), como uma proteína nuclear. O gene Ki-67 encontra-se no braço longo do cromossomo 10 (10q25). (82) Em 1993, Schluter e cols. publicaram a seqüência completa de cDNA que codifica a proteína. (83) Ainda, a expressão do Ki-67 varia de intensidade conforme a fase do ciclo celular, sendo baixa durante G1 e início da fase S, aumentando progressivamente, até alcançar o máximo durante a mitose. Além disso, a meia-vida da proteína Ki-67 está estimada em torno de 60 a 90 minutos. (84)

A proteína Ki-67, medida por técnicas de imunoistoquímica, é considerada um marcador de proliferação tumoral. A definição de pontos de corte para o Ki-67 varia entre os estudos, parecendo ser melhor considerá-lo como uma variável contínua. (84) Em 1992, após o desenvolvimento dos anticorpos MIB-1 e MIB-3, foi possível determinar a presença de Ki-67 em amostras de tecido parafinado, sendo o anticorpo MIB-1 o mais amplamente usado. (85) A expressão de Ki-67 é usualmente estimada em percentual de células tumorais positivamente marcadas pelo anticorpo, com a marcação nuclear sendo o critério mais comum de positividade.

A expressão de Ki-67 no tecido mamário normal é muito baixa (< 3% das células). (86) Uma característica interessante encontrada nestes estudos é a ausência de positividade de Ki-67 na população RE-positivo, isto é, apenas células RE negativas são proliferativas no tecido mamário normal. (86) Tal aspecto é perdido no câncer de mama, ocorrendo uma mudança progressiva e padrão do tecido normal para o tumoral, onde ambos os marcadores estão presentes em uma grande porcentagem das células. (87)

Alguns estudos estabeleceram o valor preditivo do Ki-67 no diagnóstico do câncer de mama: os escores de Ki-67 correlacionam-se com outros fatores prognósticos, como o grau histológico tumoral, o envolvimento de linfonodos, a invasão angiovascular e a expressão de receptores hormonais, com risco de recorrência, com resposta à terapia, com intervalo livre de doença e com sobrevida geral. (85)

Gottardi e cols. apontaram uma boa correlação entre o tamanho do tumor e o Ki-67: 76,1% das pacientes com tumor T1 apresentavam níveis de Ki-67 $\leq 10\%$ comparados com os 44,3% em tumores T2 ($p < 0,001$). Nenhuma correlação foi demonstrada com o estado dos linfonodos, sendo boa a correlação com os receptores hormonais: 68,7% das pacientes com tumores RE positivos possuíam níveis de Ki-67 $\leq 10\%$ comparados a 46,4% das pacientes RE negativos ($p < 0,01$). Aqui, a sobrevida livre de doença é mais longa quando os níveis do Ki-67 estão baixos. (56)

Existe uma correlação do Ki-67 com outros marcadores no câncer de mama: o Bcl-2, uma proteína antiapoptose, correlaciona-se inversamente com o Ki-67; o oncogene p53 está freqüentemente mutado ou superexpresso no câncer de mama, e tumores com essas alterações apresentam altas taxas de proliferação, medida pelo Ki-67. (88) Muitos estudos também têm demonstrado a correlação entre Ki-67 e a expressão de HER2, que, embora pareça ser positiva, ainda não está bem definida. (89) É necessário referir que o estado dos RE é amplamente descrito como inversamente correlacionado ao Ki-67, com altos níveis de positividade para RE vistos em tumores pouco proliferativos (88), e poucos estudos contradizem tal achado. (90)

Na clínica, terapias hormonais efetivas suprimem os níveis de Ki-67 tanto em estudos a curto prazo (< 6 semanas) e a longo prazo (12 semanas). Como poderia ser esperado, isso apenas ocorre em tumores com receptores hormonais positivos. Em outro estudo, a redução dos níveis de Ki-67 foi observada após 2 semanas e 12 semanas de tratamento com anastrozole antes da cirurgia em 56 pacientes (91), visto que tal redução foi de 76% e de 82%, respectivamente. Em 2 semanas, apenas 4 pacientes não apresentaram redução dos níveis de Ki-67. Algumas pacientes

evidenciaram aumentos dos níveis de Ki-67 entre 2 e 12 semanas — é possível que esse seja um indício precoce de resistência à terapia. (91)

Convém destacar que a redução de proliferação com a quimioterapia possivelmente se dá pelo aumento da apoptose em células ativamente proliferativas. A relação na diminuição dos níveis de Ki-67 durante a quimioterapia citotóxica por mais de 2 a 3 meses com longa sobrevida de seguimento foi registrada em dois estudos (88, 92), que encontraram em uma análise multivariada uma diminuição de Ki-67 superior a 25% e um escore residual de menos de 10%, predizendo uma longa sobrevida livre de doença.

Tais achados foram recentemente confirmados pelos resultados do estudo IMPACT. (93) Esse estudo comparou 12 semanas de terapia neoadjuvante com anastrozole ou tamoxifeno ou uma combinação das duas drogas em mulheres na pós-menopausa com carcinoma de mama inicial e RE positivo, seguida à cirurgia. A expressão de Ki-67 diminuiu, como foi observado em uma biópsia realizada em 2 semanas após o início do tratamento, predizendo uma maior sobrevida livre de doença nas pacientes que receberam anastrozole. (94)

Faz-se, aqui, uma conjectura: pode ser que o nível residual (durante o tratamento) de Ki-67 seja um melhor preditor de resposta e/ou de sobrevida, pois está mais correlacionado à taxa de crescimento da doença persistente (residual). Existe uma forte tendência para delinear estudos, usando-se as mudanças a curto prazo no Ki-67, como um marcador da eficácia ao tratamento. Entretanto, para a análise do Ki-67 atingir o seu potencial como marcador basal e farmacodinâmico, uma maior atenção deve ser dada em relação à padronização de metodologias, à busca de escores e a análises estatísticas. (84)

1.7.1.6 Proteína p63

O fator de transcrição p63 é homólogo do supressor tumoral p53. Contrariamente ao p53 que é dispensável para o desenvolvimento normal, o p63 é

crítico para o desenvolvimento do epitélio estratificado como a epiderme, a mama e a próstata. O p63 codifica múltiplas isoformas protéicas com atividades de repressor de transativação e de transcrição que podem regular um grande espectro de genes alvo. Também está envolvido com a formação tumoral e com a progressão no epitélio estratificado, com evidência para propriedades de supressor tumoral, bem como com propriedades oncogênicas. É expresso, ainda, especificamente nas camadas basais do epitélio estratificado e é considerado um marcador específico de células deste tipo; contudo, o seu papel na oncogênese permanece pouco definido.

Em sentido oposto à maioria dos marcadores citoplasmáticos de proteínas contráteis do citoesqueleto (actina, miosina, calponina), a p63 não é expressa por miofibroblastos e por células da parede de vasos; deste modo, é extremamente improvável a identificação falso positiva de células mioepiteliais. Além disso, porque é um marcador nuclear, é facilmente identificável em tecidos fixados, mesmo em condições não-ideais. Em relação ao nosso assunto, o câncer de mama bem diferenciado é invariavelmente destituído de células imunorreativas para p63. Também se deve observar que uma pequena fração de tumores menos diferenciados pode exibir uma fraca imunorreatividade para esse antígeno em algumas células neoplásicas. (8)

É necessário ressaltar que existe uma forte associação entre CK5 e p63, e ambos os marcadores estão associados com carcinomas de alto grau, com receptores hormonais negativos e com alto índice de proliferação. Assim, a coexpressão de CK5 e p63 nas células neoplásicas indica que o p63, como a CK5, é um marcador do câncer de mama de fenótipo basal. Há, também, uma forte relação entre a baixa expressão do BRCA1 com a expressão de CK5 e p63, bem como uma relação inversa entre a expressão p63 e CK8/18, sugerindo que a perda da expressão de p63 é necessária para a transição entre o fenótipo basal para o luminal no câncer de mama. Acredita-se que a p63 seja um marcador das células-tronco da mama. (95)

1.7.1.7 Proteína CK8

O citoesqueleto do epitélio é predominantemente formado por citoqueratinas (CK) que se agrupam em dois tipos, a saber, o tipo I (ácidas, CK 9 - CK 20) e o tipo II (neutral ou básica, CK1-CK8). (96) As citoqueratinas proporcionam estabilidade mecânica para os tecidos. Todas as citoqueratinas partilham a mesma estrutura dominante e formam obrigatoriamente heteropolímeros de qualquer combinação de moléculas do tipo I e II para formar filamentos intermediários. Atualmente são conhecidas 20 citoqueratinas expressas em pares de heteropolímeros, usualmente constituídas por uma associação de uma citoqueratina ácida com uma básica ou neutra. (97)

No tecido mamário normal, é possível distinguir entre células luminais e basais pela sua expressão de citoqueratinas. Células adjacentes à membrana basal e o mioepitélio estritamente expressam as citoqueratinas K5, K14, K17, enquanto as células luminais apresentam expressão de citoqueratinas K7, K8, K18 e K19. (98)

No epitélio mamário normal, as células luminais usualmente apontam CK8, 18 e 19 que são típicas de epitélio simples. A maioria dos tumores malignos da mama são adenocarcinomas originados do epitélio simples da mama, e anticorpos monoclonais contra CK18 têm sido empregados para identificar células neoplásicas mamárias em tumores primários e metastáticos. Ao se considerar que todas essas células podem sofrer alterações malignas, os carcinomas de mama podem ser classificados, expressando um fenótipo basal (CK5+ ou CK5+/CK8, 18,19+) ou um fenótipo luminal (CK8, 18,19+). (6)

Em relação à citoqueratina 8 (CK 8), ela é um membro da família dos filamentos intermediários FI, sendo um gene expresso por células epiteliais e por algumas células neoplásicas. A maioria do CK 8 celular está associada à CK 18, em filamento altamente insolúvel que se estende do núcleo até a membrana plasmática. Numerosos estudos têm demonstrado a correlação entre os altos níveis de expressão de CK8 e o aumento da migração e da invasão de certos tipos de células do câncer. Entretanto, a análise do perfil imunoistoquímico revelou recentemente

que a CK8 “down regulation” pode acontecer em câncer de mama. Essa específica citoqueratina teve significância na correlação com o estágio tumoral avançado e com o alto grau histológico, mas não com os estado da axila. A “down regulation” da expressão da CK 18 não é incomum no câncer primário de mama; além disso, esse fenótipo é preditivo de desfecho clínico desfavorável. (99, 100)

A expressão da CK18, em contrapartida, demonstrou ser um fator de bom prognóstico, independentemente do estado dos linfonodos em estudo de Schaller e cols. (98)

OBJETIVOS

Geral

Agrupar os carcinomas do tipo ductal invasor de mama de acordo com a expressão dos marcadores biológicos.

Específicos

Avaliar as associações destes subgrupos de tumores com fatores prognósticos já estabelecidos: o estado dos linfonodos axilares, o grau histológico tumoral, o tamanho do tumor, o índice mitótico, a presença de invasão angiolinfática e o componente intraductal extenso;

Avaliar as associações destes subgrupos de tumores com os desfechos clínicos de recorrência tumoral e/ou morte.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Feb 6;83(3):154-5.
2. Zhang DH, Salto-Tellez M, Chiu LL, Shen L, Koay ES. Tissue microarray study for classification of breast tumours. *Ann Acad Med Singapore.* 2003 Sep;32(5 Suppl):S75-6.
3. Munster PN, Norton L. Predictive factor for the response to adjuvant therapy with emphasis in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2001;3(6):361-4.
4. Gonzalez-Vela MC, Garijo MF, Fernandez F, Buelta L, Val-Bernal JF. Cathepsin D in host stromal cells is associated with more highly vascular and aggressive invasive breast carcinoma. *Histopathology.* 1999 Jan;34(1):35-42.
5. Nemoto T, Natarajan N, Bedwani R, Vana J, Murphy GP. Breast cancer in the medial half. Results of 1978 National Survey of the American College of Surgeons. *Cancer.* 1983 Apr 15;51(8):1333-8.
6. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
7. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367-74.
8. Viale G. Histopathology of primary breast cancer 2003. *Breast.* 2003 Dec;12(6):391-6.
9. Burstein HJ, Polyak K, Wong JS, Lester SC, Kaelin CM. Ductal carcinoma in situ of the breast. *N Engl J Med.* 2004 Apr 1;350(14):1430-41.
10. Easton DF, Pooley KA, Dunning AM, Pharoah PD, Thompson D, Ballinger DG, et al. Genome-wide association study identifies novel breast cancer susceptibility loci. *Nature.* 2007 Jun 28;447(7148):1087-93.
11. Kaufmann M, Fournier DV, Sievers H, Staib I, Wollgens P, Nedden R, et al. Adjuvant chemotherapy with chlorambucil and 5-fluorouracil in primary breast cancer (Cooperative Study Heidelberg). *Eur J Cancer.* 1980;Suppl 1:157-60.
12. Walter SD, Day NE. Estimation of the duration of a pre-clinical disease state using screening data. *Am J Epidemiol.* 1983 Dec;118(6):865-86.
13. Norton L. A Gompertzian model of human breast cancer growth. *Cancer Res.* 1988 Dec 15;48(24 Pt 1):7067-71.
14. Heimann R, Ferguson D, Recant WM, Hellman S. Breast cancer metastatic phenotype as predicted by histologic tumor markers. *Cancer J Sci Am.* 1997 Jul-Aug;3(4):224-9.
15. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer.* 2001 Oct 15;94(2):153-6.
16. Boyle P, Ferlay J. Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol.* 2005 Mar;16(3):481-8.
17. Peto R, Boreham J, Clarke M, Davies C, Beral V. UK and USA breast cancer deaths down 25% in year 2000 at ages 20-69 years. *Lancet.* 2000 May 20;355(9217):1822.
18. Schairer C, Mink PJ, Carroll L, Devesa SS. Probabilities of death from breast cancer and other causes among female breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 2004 Sep 1;96(17):1311-21.
19. Pandis N, Jin Y, Gorunova L, Petersson C, Bardi G, Idvall I, et al. Chromosome analysis of 97 primary breast carcinomas: identification of eight karyotypic subgroups. *Genes Chromosomes Cancer.* 1995 Mar;12(3):173-85.
20. Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer.* 1989 Jan 1;63(1):181-7.
21. Fisher ER, Palekar A, Rockette H, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). V. Significance of axillary nodal micro- and macrometastases. *Cancer.* 1978 Oct;42(4):2032-8.
22. EBCTCG. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet.* 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.
23. Eifel P, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ, Jr., Deshler A, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst.* 2001 Jul 4;93(13):979-89.
24. Buzdar AU. The ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) trial: an update. *Clin Breast Cancer.* 2004 Sep;5 Suppl 1:S6-S12.
25. NCCN NCPGiO-. *Breast Cancer.* 2007 2007.

26. Dupont WD, Page DL. Breast cancer risk associated with proliferative disease, age at first birth, and a family history of breast cancer. *Am J Epidemiol*. 1987 May;125(5):769-79.
27. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
28. Azzopardi JG, Muretto P, Goddeeris P, Eusebi V, Lauweryns JM. 'Carcinoid' tumours of the breast: the morphological spectrum of argyrophil carcinomas. *Histopathology*. 1982 Sep;6(5):549-69.
29. Lampejo OT, Barnes DM, Smith P, Millis RR. Evaluation of infiltrating ductal carcinomas with a DCIS component: correlation of the histologic type of the in situ component with grade of the infiltrating component. *Semin Diagn Pathol*. 1994 Aug;11(3):215-22.
30. Clark GM. Do we really need prognostic factors for breast cancer? *Breast Cancer Res Treat*. 1994;30(2):117-26.
31. Galea MH, Blamey RW, Elston CE, Ellis IO. The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 1992;22(3):207-19.
32. Donegan WL. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. *CA Cancer J Clin*. 1997 Jan-Feb;47(1):28-51.
33. Verschraegen C, Vinh-Hung V, Cserni G, Gordon R, Royce ME, Vlastos G, et al. Modeling the effect of tumor size in early breast cancer. *Ann Surg*. 2005 Feb;241(2):309-18.
34. Nixon AJ, Neuberger D, Hayes DF, Gelman R, Connolly JL, Schnitt S, et al. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol*. 1994 May;12(5):888-94.
35. Jayasinghe UW, Taylor R, Boyages J. Is age at diagnosis an independent prognostic factor for survival following breast cancer? *ANZ J Surg*. 2005 Sep;75(9):762-7.
36. Singletary SE, Connolly JL. Breast cancer staging: working with the sixth edition of the AJCC Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin*. 2006 Jan-Feb;56(1):37-47; quiz 50-1.
37. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol*. 2005 Oct 10;23(29):7350-60.
38. Pusztai L, Mazouni C, Anderson K, Wu Y, Symmans WF. Molecular classification of breast cancer: limitations and potential. *Oncologist*. 2006 Sep;11(8):868-77.
39. 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 Sep 11;98(19):10869-74.
40. 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*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
41. 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*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8.
42. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Bartelink H, Van de Vijver MJ. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007 Oct 2;9(5):R65.
43. Caldas C, Aparicio SA. The molecular outlook. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):484-5.
44. Menasce LP, White GR, Harrison CJ, Boyle JM. Localization of the estrogen receptor locus (ESR) to chromosome 6q25.1 by FISH and a simple post-FISH banding technique. *Genomics*. 1993 Jul;17(1):263-5.
45. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, Lagercrantz J, Fried G, et al. Human estrogen receptor beta-gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab*. 1997 Dec;82(12):4258-65.
46. Osborne CK, Schiff R, Arpino G, Lee AS, Hilsenbeck VG. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast*. 2005 Dec;14(6):458-65.
47. Grabau DA, Thorpe SM, Knoop A, Vach W, Schroder HD, Blichert-Toft M, et al. Immunohistochemical assessment of oestrogen and progesterone receptors: correlations with the DCC method and clinical outcome in primary breast cancer patients. *Breast*. 2000 Aug;9(4):208-17.
48. Carlomagno C, Perrone F, Gallo C, De Laurentiis M, Lauria R, Morabito A, et al. c-erb B2 overexpression decreases the benefit of adjuvant tamoxifen in early-stage breast cancer without axillary lymph node metastases. *J Clin Oncol*. 1996 Oct;14(10):2702-8.
49. Lipton A, Ali SM, Leitzel K, Demers L, Chinchilli V, Engle L, et al. Elevated serum Her-2/neu level predicts decreased response to hormone therapy in metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Mar 15;20(6):1467-72.

50. Nicholson S, Wright C, Sainsbury JR, Halcrow P, Kelly P, Angus B, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 1990 Dec 20;37(6):811-4.
51. Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res.* 1989 Apr 15;49(8):2087-90.
52. Elledge RM, Green S, Ciocca D, Pugh R, Allred DC, Clark GM, et al. HER-2 expression and response to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Clin Cancer Res.* 1998 Jan;4(1):7-12.
53. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol.* 2002 May 1;20(9):2310-8.
54. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.
55. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989 May 12;244(4905):707-12.
56. Gottardi O, Tabiaddon D, Scanzi F, Bono A, Majno M, Ferrari M, et al. [Clinical and prognostic usefulness of Ki67 determination in breast carcinoma]. *Pathologica.* 1992 Nov-Dec;84(1094):15-22.
57. van de Vijver MJ, Mooi WJ, Wisman P, Peterse JL, Nusse R. Immunohistochemical detection of the neu protein in tissue sections of human breast tumors with amplified neu DNA. *Oncogene.* 1988 Feb;2(2):175-8.
58. Al-Moundhri M, Nirmala V, Al-Mawaly K, Ganguly S, Burney I, Rizvi A, et al. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. *Pathol Oncol Res.* 2003;9(4):226-31.
59. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol.* 2001 Mar 15;19(6):1865-78.
60. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg.* 2001 May;233(5):630-8.
61. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwege D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Jan 1;22(1):86-96.
62. Fehm T, Maimonis P, Weitz S, Teramoto Y, Katalinic A, Jager W. Influence of circulating c-erbB-2 serum protein on response to adjuvant chemotherapy in node-positive breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Mar;43(1):87-95.
63. Molina R, Jo J, Zanon G, Filella X, Farrus B, Munoz M, et al. Utility of C-erbB-2 in tissue and in serum in the early diagnosis of recurrence in breast cancer patients: comparison with carcinoembryonic antigen and CA 15.3. *Br J Cancer.* 1996 Oct;74(7):1126-31.
64. Tsujimoto Y, Cossman J, Jaffe E, Croce CM. Involvement of the bcl-2 gene in human follicular lymphoma. *Science.* 1985 Jun 21;228(4706):1440-3.
65. van Slooten HJ, Claahsen PC, van Dierendonck JH, Duval C, Pallud C, Mandard AM, et al. Expression of Bcl-2 in node-negative breast cancer is associated with various prognostic factors, but does not predict response to one course of perioperative chemotherapy. *Br J Cancer.* 1996 Jul;74(1):78-85.
66. Zhang GJ, Tsuda H, Adachi I, Fukutomi T, Yamamoto H, Hirohashi S. Prognostic indicators for breast cancer patients with one to three regional lymph node metastases, with special reference to alterations in expression levels of bcl-2, p53 and c-erbB-2 proteins. *Jpn J Clin Oncol.* 1997 Dec;27(6):371-7.
67. Hurlimann J, Larrinaga B, Vala DL. bcl-2 protein in invasive ductal breast carcinomas. *Virchows Arch.* 1995;426(2):163-8.
68. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2468-75.
69. Joensuu H, Pylikkanen L, Toikkanen S. Bcl-2 protein expression and long-term survival in breast cancer. *Am J Pathol.* 1994 Nov;145(5):1191-8.
70. Dimitrakakis C, Konstadoulakis M, Messaris E, Kymionis G, Karayannis M, Panoussopoulos D, et al. Molecular markers in breast cancer: can we use c-erbB-2, p53, bcl-2 and bax gene expression as prognostic factors? *Breast.* 2002 Aug;11(4):279-85.
71. Poelman SM, Adeyanju MO, Robertson MA, Recant WM, Karrison T, Fleming GF, et al. Human breast cancer susceptibility to paclitaxel therapy is independent of Bcl-2 expression. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):4043-8.

72. Eissa S, Labib R, Khalifa A, Swelam N, Khalil F, El-Shenawy AM. Regulators of apoptosis in human breast cancer. *Clin Biochem.* 1999 Jul;32(5):321-6.
73. Bonetti A, Zaninelli M, Leone R, Cetto GL, Pelosi G, Biolo S, et al. bcl-2 but not p53 expression is associated with resistance to chemotherapy in advanced breast cancer. *Clin Cancer Res.* 1998 Oct;4(10):2331-6.
74. Sjöstrom J, Krajewski S, Franssila K, Niskanen E, Wasenius VM, Nordling S, et al. A multivariate analysis of tumour biological factors predicting response to cytotoxic treatment in advanced breast cancer. *Br J Cancer.* 1998 Sep;78(6):812-5.
75. Ioachim EE, Malamou-Mitsi V, Kamina SA, Goussia AC, Agnantis NJ. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer Res.* 2000 Nov-Dec;20(6B):4221-5.
76. Tanyi J, Tory K, Bankfalvi A, Shroder W, Rath W, Fuzesi L. Analysis of p53 mutation and cyclin D1 expression in breast tumors. *Pathol Oncol Res.* 1999;5(2):90-4.
77. Clahsen PC, van de Velde CJ, Duval C, Pallud C, Mandard AM, Delobelle-Deroide A, et al. p53 protein accumulation and response to adjuvant chemotherapy in premenopausal women with node-negative early breast cancer. *J Clin Oncol.* 1998 Feb;16(2):470-9.
78. Sjögren S, Inganäs M., Norberg, T., Lindgren, A., Nordgren, H., Holmberg, L., Bergh, J. The p53 gene in breast cancer: prognostic value of complementary DNA sequencing versus immunohistochemistry. *J Natl Cancer Inst.* 1996;88:173-82.
79. Thorlacius S, Thorgilsson B, Bjornsson J, Tryggvadottir L, Borresen AL, Ogmundsdottir HM, et al. TP53 mutations and abnormal p53 protein staining in breast carcinomas related to prognosis. *Eur J Cancer.* 1995 Oct;31A(11):1856-61.
80. Geisler S, Lonning PE, Aas T, Johnsen H, Fluge O, Haugen DF, et al. Influence of TP53 gene alterations and c-erbB-2 expression on the response to treatment with doxorubicin in locally advanced breast cancer. *Cancer Res.* 2001 Mar 15;61(6):2505-12.
81. Gerdes J. Ki-67 and other proliferation markers useful for immunohistological diagnostic and prognostic evaluations in human malignancies. *Semin Cancer Biol.* 1990 Jun;1(3):199-206.
82. Fonatsch C, Duchrow M, Rieder H, Schluter C, Gerdes J. Assignment of the human Ki-67 gene (MK167) to 10q25-qter. *Genomics.* 1991 Oct;11(2):476-7.
83. Schluter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol.* 1993 Nov;123(3):513-22.
84. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 1;23(28):7212-20.
85. Lehr HA, Hansen DA, Kussick S, Li M, Hwang H, Krummenauer F, et al. Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count. *Hum Pathol.* 1999 Nov;30(11):1314-20.
86. Clarke RB, Howell A, Potten CS, Anderson E. Dissociation between steroid receptor expression and cell proliferation in the human breast. *Cancer Res.* 1997 Nov 15;57(22):4987-91.
87. Shoker BS, Jarvis C, Clarke RB, Anderson E, Hewlett J, Davies MP, et al. Estrogen receptor-positive proliferating cells in the normal and precancerous breast. *Am J Pathol.* 1999 Dec;155(6):1811-5.
88. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer.* 2001 Oct 19;85(8):1106-12.
89. Nicholson RI, McClelland RA, Finlay P, Eaton CL, Gullick WJ, Dixon AR, et al. Relationship between EGF-R, c-erbB-2 protein expression and Ki67 immunostaining in breast cancer and hormone sensitivity. *Eur J Cancer.* 1993;29A(7):1018-23.
90. Pinder SE, Wencyk P, Sibbering DM, Bell JA, Elston CW, Nicholson R, et al. Assessment of the new proliferation marker MIB1 in breast carcinoma using image analysis: associations with other prognostic factors and survival. *Br J Cancer.* 1995 Jan;71(1):146-9.
91. Dowsett M, Smith IE, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Griffith C, et al. Short-term changes in Ki-67 during neoadjuvant treatment of primary breast cancer with anastrozole or tamoxifen alone or combined correlate with recurrence-free survival. *Clin Cancer Res.* 2005 Jan 15;11(2 Pt 2):951s-8s.
92. Billgren AM, Rutqvist LE, Tani E, Wilking N, Fornander T, Skoog L. Proliferating fraction during neoadjuvant chemotherapy of primary breast cancer in relation to objective local response and relapse-free survival. *Acta Oncol.* 1999;38(5):597-601.
93. Smith IE, Dowsett M, Ebbs SR, Dixon JM, Skene A, Blohmer JU, et al. Neoadjuvant treatment of postmenopausal breast cancer with anastrozole, tamoxifen, or both in combination: the Immediate Preoperative Anastrozole, Tamoxifen, or Combined with Tamoxifen (IMPACT) multicenter double-blind randomized trial. *J Clin Oncol.* 2005 Aug 1;23(22):5108-16.

94. Baum M, Buzdar A, Cuzick J, Forbes J, Houghton J, Howell A, et al. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. *Cancer*. 2003 Nov 1;98(9):1802-10.
95. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandao 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*. 2005 Nov;47(5):458-66.
96. Hesse M, Magin TM, Weber K. Genes for intermediate filament proteins and the draft sequence of the human genome: novel keratin genes and a surprisingly high number of pseudogenes related to keratin genes 8 and 18. *J Cell Sci*. 2001 Jul;114(Pt 14):2569-75.
97. Fuchs E, Cleveland DW. A structural scaffolding of intermediate filaments in health and disease. *Science*. 1998 Jan 23;279(5350):514-9.
98. Schaller G, Fuchs I, Pritze W, Ebert A, Herbst H, Pantel K, et al. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1996 Nov;2(11):1879-85.
99. Woelfle U, Sauter G, Santjer S, Brakenhoff R, Pantel K. Down-regulated expression of cytokeratin 18 promotes progression of human breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2004 Apr 15;10(8):2670-4.
100. Oshima RG, Baribault H, Caulin C. Oncogenic regulation and function of keratins 8 and 18. *Cancer Metastasis Rev*. 1996 Dec;15(4):445-71.

ARTIGO (Versão em inglês)

Prognostic and predictive value of immunohistochemical tumor markers in Ductal Invasive Carcinoma

Jorge Villanova Biazús¹, Maria Isabel Edelweiss², Márcia Melo¹, Diego Uchoa².

¹ Breast Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

² Pathology Unit, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brazil.

Financial Support: Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Correspondence:

Dr. Jorge Villanova Biazús

End: Ramiro Barcelos, 2350 sala 600

CEP: 900035-003 Porto Alegre-RS-Brazil

e-mail: biazus@portoweb.com.br

ABSTRACT

Background: Recently, molecular subtypes of invasive breast cancer were recognized through DNA microarray profiling studies. This new classification can potentially improve the prognostic evaluation but this technology is still not widely available and it's too expensive. The possibility of identifying the molecular subtypes through simpler and cheaper methods is promising especially in countries with limited resorts. The identification of breast cancer subtypes is particularly important because it has clinical implications and for treatment options. **Methods:** A retrospective cohort of 71 consecutive patients with pathologic stage I or II primary breast carcinomas, treated in the HCPA Breast Unit, between 1993 and 1997 with a minimum follow up of 5 years, was studied. Histological and clinical features as well as clinical outcome and survival were reviewed. Immunohistochemical analysis was carried out in representative blocks of tumors with antibodies against Estrogen Receptor (ER), Progesterone Receptor (PR), Human Epidermal Growth Receptor – type 2 (HER2), KI-67, Bcl-2, p53, p63 and CK8. The endpoints were to determine the prevalence the molecular portrait in this population and its clinical outcomes. **Results:** 39 tumors (54,9 %) were Luminal A, 15 tumors (21,1%) were Luminal B, 15 tumors (21,1) were Basal or triple negative and only 2 tumors (2,8%) were HER2. There was no prognostic difference among the breast cancer subtypes: luminal A (HR-positive and HER2-negative); luminal B (HR-positive and HER2-positive); HER2-overexpressing (HER2-positive) and basal (HR-negative, HER2-negative) relating to disease-free and overall survival, although there was a robust correlation with tumor grade and differentiation. This is probably related to limited number of patients in this study and prognosis of initial-stage patients. **Conclusions:** Our results suggest that it is possible to identify breast cancer subtypes by immunohistochemical analysis of ER, EP, HER2, and that the addition of other markers didn't improve the prognosis estimates. The molecular profile may be a very useful instrument for breast cancer managing in countries with limited resorts.

Keywords: breast cancer, breast neoplasia molecular subtypes, immunohistochemistry

INTRODUCTION

Breast cancer is a heterogeneous disease composed by multiple subtypes biologically distinct as has been demonstrated by gene expression pattern studies. DNA microarray gene expression profile studies identified various distinct subtypes.(1) These subtypes demonstrated different prognosis and show the possibility for targeting specific therapy. (Sorlie, Perou et al. 2001),(Sorlie, Tibshirani et al. 2003),(Sotiriou, Neo et al. 2003),(Nielsen, Hsu et al. 2004)

The genomic portrait revealed 2 main groups based in the estrogen receptor expression. Tumors that are estrogen receptor negative (Basal and HER2 subtypes) and those with estrogen receptor positive (Luminal A and Luminal B subtypes)

Basal tumors are characteristically negative for estrogen and progesterone receptors and low expression for HER2, associated with the expression of genes for basal epithelia characteristics, especially expressing genes for cytokeratin 5, 6, 17. (1)

HER2 expressing tumors may be allocated in two groups: one estrogen receptor negative that shows a genomic expression close to basal subtype (ER negative / HER positive) and another associated with ER positive showing a gene expression pattern close to luminal cells pattern correlated with Luminal B subtype. (2, 3)

Although the subtypes were based in breast cancer genomic profile studies, it was possible to establish a parallel model based in immunohistochemical analyses and to generate a molecular profile highly correlated with tumors genomic expression. (4-6)

The molecular profile established by immunohistochemistry identifies the subtypes as: luminal A (HR+ / HER2-), luminal B (HR+ / HER2+), HER2 (HR- / HER2+) and basal-like (ER-,EP-,HER2-,citokeratin 5/6+, and / or HER1+) and a unclassified subtype (all the markers negative). (4)

Recently, Kreike e cols working with triple negative tumors (ER-,EP-,HER2-) has shown that all triple negative tumors may be considered as basal-like by its general gene expression pattern. (5)

Tumor classification trough immunohistochemical molecular profile is easy and it's done with low cost, and it offers a valuable instrument for breast cancer managing while the sophisticated and expensive expression profile still lack of standardization and validation studies, and they could be especially useful in countries with limited resources as Brazil. Aiming to correlate the immunohistochemical molecular profile with clinical and pathologic features we analyzed a panel of tumor markers including ER, EP, HER2, p53, p63, Ki-67, Bcl-2 and CK8.

Tumors were classified as: Luminal A, Luminal B, HER2 and Basal-like or triple negative and were correlated with clinical and pathologic features. We also sought correlations with other known prognostic markers to reinforce prognostic relevance for recurrence and death.

MATERIALS AND METHODS

We analyzed 87 cases of invasive ductal carcinoma of the breast, that were treated in the Breast Unit of the Hospital de Clinicas de Porto Alegre (HCPA) between January 1993 and January 1997, and had a follow up of at least 5 years. Seventy one cases had tumor blocks with enough tumor to perform all the analyses included in the study protocol.

The data collected derived from medical file records and included: age at diagnosis, race, family history, type of treatment, disease free survival, type of recurrence and death.

The clinical TNM stage at the moment of the diagnosis, tumor size, axillary status, was collected from medical records. Histological grade, nuclear grade and mitotic index were based in Scarff-Bloom-Richardson criteria modified by Elston–Ellis (7), also were recorded lymphatic vascular invasion (LIV) and extensive intraductal carcinoma according internal routine of the pathology laboratory. Clinical follow up was performed according the Breast Unit routine with medical evaluation every three months and annual blood chemistry, Chest X ray, Bone scan, abdominal ultrasonography, mammography and breast ultrasound, or at any time for suspicious of local recurrence or metastatic disease.

Data privacy was granted; all collected information was used only and exclusively for scientific purposes expressed in the research project submitted and approved by the ethical committee.

Inclusion criteria

The protocol included patients with pTNM (2004) stages I, IIA and IIB, submitted to surgical treatment, with or without radiotherapy and that received adjuvant treatment according the Breast Unit routine at that time. All cases were followed for disease free interval and overall survival. Only cases with complete medical records for data collection were included. Patients with stages III and IV, invasive lobular carcinoma and invasive ductal carcinomas of especial types were excluded, as well, lobular carcinoma “in situ” and intraductal carcinoma “in situ” and those submitted to neoadjuvant therapy. The characteristics of the selected cohort are shown in Table 1.

Histopathological analysis

The immunohistochemistry analysis was performed in the Pathology Unit of the HCPA. The IHC analyzed were: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), HER2, p53, p63, Ki-67, Bcl-2 and CK8.

Seventy one paraffin blocks of formalin-fixed tumor tissue were available for study. The blocks had a 4µm tissue sections slides stained with hematoxylin-eosin to review diagnosis and grading.

After histological confirmation of invasive breast carcinoma in the original paraffin blocks new slides were prepared for IHC staining according Pathology Unit routine as follows: desparaffinization and rehydration of tissue sections, inactivation of endogenous peroxidase and blockage of unspecific reactions. Primary antibodies were incubated for 12 hours at 4°C, with dilution according suppliers' recommendations followed by the application of streptavidin-biotin-peroxidase complex (LSAB, Dako) and revealed with diaminobenzidine tetrachloride (Kit DAB, Dako). Control tissue slides from breast and and / or skin were included in each set of stained slides.

Staining results were assessed by two pathologists MIE and DU, blinded for clinical data and outcomes of the cohort.

IHC analysis criteria

A positive ER and PR was recorded only if immunostaining was seen within the nuclei cells using a semiquantitative scoring system, being positive above 2 (Harvey, Clark et al. 1999), HER2 required a strong membranous stain in at least 10% of tumor cells. Cytokeratin 8 was scored positive if cytoplasmatic staining was seen using a semiquantitative system, being positive above 4. (8). Positive Bcl-2 was

recorded if cytoplasmatic immunostaining was seen in at least 30% of the tumor cells; positive Ki-67 was recorded if more than 15% nuclei cells showed immunostaining; positive p53 was recorded if immunostaining was seen in at least 10% of tumor cells and p63 was recorded as present or absent in cells nuclei.

Analysis Sequence

To estimate the probability of an unfavorable outcome, four steps were outlined. First, we analyzed ER, EP and HER2 overexpression and its relations with the entire cohort, considering clinical and histological features as well unfavorable outcomes (recurrence and death). In the phase two, tumors were classified according its immunohistochemical characteristics: luminal A (ER or EP positive and HER2 negative), luminal B (ER or EP positive and HER2 positive), HER2 (ER and EP negative and HER2 positive), basal-like or triple negative (ER negative, EP negative and HER2 negative) and its correlations with clinical and pathological features as well unfavorable outcomes (recurrence and death).

In the third phase, we analyzed the correlations among the subgroups with the other molecular markers seeking associations with outcomes.

Finally, we analyzed how the therapeutical approach was correlated with these subgroups.

Statistical Analysis

Binary variables (correlations among tumor markers and subtypes with histological features and unfavorable outcomes) were submitted to Pearson's Chi-square test or Fischer exact test when necessary. For associations of tumor markers

and subtypes with disease free interval and overall survival the Student t test was employed. Logistic regression was performed to analyze the interaction of independent variables with dependent variables. Analyses were conducted using the Statistical Package for Social Sciences (SPSS) version 12.0. All the analyses were age adjusted and other possibly significant data was adjusted through multiple logistic regressions.

RESULTS

Estrogen Receptor

We observed that 54 (76%) of the tumors were ER positive and 17 (24%) were ER negative. The ER positive expression showed a statistical significant difference with tubular formation ($p < 0.007$), mitotic index ($p < 0.000$), nuclear grade ($p < 0.004$) and Nottingham's combined histologic grade ($p < .000$), pointing to a strong correlation to tumor differentiation. There was no significant statistical difference with lymphatic and vascular invasion ($p = 0.896$). The correlations with other tumor markers showed a significant difference with Bcl-2 ($p < 0.004$) and CK8 ($p < 0.000$) and there was no significant statistical difference with all the others. Data shown in Table 1.

Considering the axillary status (0, 1-3, ≥ 4 positive lymph nodes) there was no significant statistical difference ($p = 0.943$) as well with tumor size ($p = 0.056$), although 87,1% T1 tumors were ER + while 66,7% of T3 tumors were ER-. Age also was not significant. The mean time to recurrence value was shorter for ER- (3.0 years) than for ER+ (4.4 years) although it was not statistical significant ($p = 0.263$).

The ER expression was not significant for predicting recurrence ($p = 0.067$) and death ($p = 0.671$).

Progesterone Receptor

Like the ER, progesterone receptor (PR) showed a significant statistical result with tubule formation ($p < 0.007$), mitotic index ($p < 0.004$) and Nottingham's grade ($p < 0.000$) showing strong correlation with tumor differentiation. There was no significant statistical difference with lymphatic and vascular invasion ($p = 0.896$). The correlations with other tumor markers showed a significant difference with Bcl-2 ($p < 0.006$) and CK8 ($p < 0.000$) and there was no significant statistical difference with all the others. As for ER, the axillary status and tumor size were significant. Age also was not significant. The mean time to recurrence value was shorter for PR- (3.0 years) than for PR+ (4.4 years) although it was not statistically significant ($p = 0.263$).

The PR expression was not significant for predicting recurrence ($p = 0.067$) and death ($p = 0.671$) also.

HER2

The relationship between HER2 status and histological features were negative. There was no significant correlation with tubule formation ($p = 0.402$), mitotic index ($p = 0.837$), nuclear grade ($p = 0.498$), Nottingham grade ($p = 0.781$). There was no relation with axillary status ($p = 0.610$), tumor size ($p = 0.569$) and age ($p = 0.780$). For those patients who had disease recurrence the disease free interval was similar for HER2+ (4.2 years) and HER2- (4.4 years). HER2 overexpression was not statistically significant for recurrence ($p = 0.481$) and death ($p = 0.464$). Data overview of correlations among tumor markers are shown in Table 2.

Analysis by molecular profile

Four groups were formed corresponding to the molecular subtypes of breast cancer. The first group corresponding a molecular Luminal A subtype with 39 cases or 54.9% of the cohort, the second corresponding to a molecular Luminal B subtype with 15 cases or 21.1%, a third group corresponding to the molecular HER2 overexpression subtype with 2 cases or 2.8% and a fourth group corresponding to the Basal –like or triple negative subtype with 15 cases or 21.1%, as seen in table 3.

There was a statistical significant difference among subtypes and tubule formation ($p<.007$), nuclear grade ($p<.000$), mitotic index ($p<.020$) and Nottingham combined histologic grade ($p<.001$) showing strong relationship between Luminal A subtype with well differentiated tumors and undifferentiated tumors with HER2 (100% NG 2-3) and triple negative subtypes (93,3% NG 2-3). There was no significant correlation between Nottingham's combined histologic grade with disease relapse ($p=0.159$) and death, although 47.6% of disease relapses occurred in undifferentiated tumors and 60% of death occurred in the group classified as undifferentiated.

Clinical staging by TNM classification system were significantly correlated to any particular molecular subtype although tumor size had a significant difference among them ($p<0.01$), with triple negative group presenting larger tumors. There was no significant difference with other histological features, LVI ($p=0.932$) and extensive intraductal component ($p=0.664$) Multiple logistic regression failed to establish interaction among: age, clinical stage and subtype group.

Regarding to other tumor markers, only the CK8 had a significant relationship with the molecular subtypes ($p<0.006$), it was strongly correlated to Luminal A and Luminal B molecular subtypes.

There was no statistical significant difference among subtypes and recurrence ($p=0.295$), neither whether it was a local or systemic recurrence ($p=0.692$), although 71.4% of the local relapses were within the Luminal A subtype group; we think that it

could be explained by the omission of adjuvant systemic therapy in this low risk patients at that time.

There was no statistical significant difference molecular subtypes and death, although the mortality rate of 13.3% (2/5) in Luminal B subtype was twice of the triple negative subtype with 6.71% (1/15). Data shown in table 4.

Analysis by unfavorable outcomes

There were 21 recurrences (29.6%), 7 were local relapses (9.9%) and 14 were distant relapses (19.7%), even though 6 (85.7%) cases of local relapses occurred after conservative surgery it didn't reach statistical significance ($p=0.163$). They were frequent in afrobrasilian woman ($p<0.046$) and were not related to age ($p=0.720$). Interestingly, all the local relapses occurred in patients with negative lymph nodes ($p<0.041$) and neither of them received adjuvant treatment. Patients on adjuvant protocol had a very low local relapse rate ($p=0.179$). The intraductal extensive component was not significant for local relapse ($p=0.337$), and lymphatic vascular invasion showed a trend ($p=0.073$) as it was present in 57% of cases with local relapse. Nuclear grade was the only parameter associated with a statistical significant difference for LR ($p<0.050$). Local relapse was not associated with death ($p=0.654$), there were no systemic relapse in this group during the observation period.

There were 14 systemic relapses (19.7%) without significant difference among molecular subtypes, with a subtype distribution of Luminal A (19.7%), Luminal B (33.3%), Basal ou triple negative (13.3%) and HER2 without systemic relapses. We observed that Basal subtype tumors had precocious recurrences compared with the other subtypes ,although in was not statistical significant. Data expressed in Graphic 1.

The mortality rate was 7% after at least 5 years of follow up, with a median follow up of 7.8 years and 60% of deaths occurred in group below 50 years of age at diagnosis.

The relationship between clinical staging and death was not significant but expressed a moderate trend ($p=0.077$). There were no deaths in clinical stage I and 80% of deaths came from clinical stage IIB. There were no significant correlations with isolated tumor markers: Bcl-2 ($p=0.646$), HER2 ($p=0.464$), p63 ($p=0.464$), p53 ($p=0.510$), CK8 ($p=0.728$), Ki-67 ($p=0.301$), RE ($p=0.671$), RP ($p=0.671$). Data shown in table 5.

Axillary status relations and outcomes

Axillary status was correlated at a significant level with any of the molecular subtypes, also there was no relation with nuclear grade, mitotic index or Nottingham combined score. Axillary status had no relationship with any of tumors markers. An important and robust correlation with local and systemic relapse was detected ($p<0.000$) but there was no correlation at a significant level with death ($p=0.136$), although all deaths came from patients with axillary lymph nodes metastasis. Data shown in table 6.

Adjuvant treatment and surgical approach

This group of 71 patients was managed according treatment protocol used at that time, 40 received systemic adjuvant therapy with Tamoxifen, chemotherapy (CMF protocol) or both and 31 patients had no adjuvant therapy.

The treated group had 25% recurrence rate (10 cases), 2 local relapses and 8 systemic relapses and the other group had a recurrence rate of 35,5% (11 cases), 5 local relapses and 6 systemic relapses.

Local relapses rate was 3.2% (1/31) in Modified radical Mastectomy group and 15% (6/40) in the conservative treatment group. Systemic relapse rate was 16.1% (5/31) in Modified Radical Mastectomy group and 22,5% (9/40) in the conservative treatment group with no significant difference ($p=0.970$).

DISCUSSION

Breast cancer is a heterogeneous disease; patients presenting with the same clinical and pathological features may develop different outcomes. These differences probably are explained by limitations of a classification based only in tumor morphology. (9)

Recent studies have classified breast cancer into distinct subtypes based on genomic expression and molecular profile. The main point is to discover with high degree of success which group has the best and worse prognosis; if each subtype represents a distinct form of disease then it would be helpful to set prognosis and to direct therapy to molecular targets.

The cDNA microarray profiling studies analyzing multiple gene sets have identified distinct subtypes with different clinical outcomes. (1-3, 9)

Parallel to these, a molecular profile was built from immunohistochemical analysis of tumor markers and showed a good correlation with the subtypes identified by DNA microarray expression profile studies, specially in the triple negative phenotype (4-6).

The cDNA microarray studies have shown that the most powerful denominator in determining the gene expression profiles and prognostic groups of breast cancer is estrogen receptor (ER) and ER-related genes. (10, 11)

In this study, we have analyzed a panel tumor markers by immunohistochemistry looking for associations with histological clinical features and arranging them in subgroups representing a molecular profile as afore mentioned.(4-6) According with previously published by Carey et al., tumor markers as determined by immunohistochemical methods were adequate for determining the molecular subtype's prevalence. (4)

Our data shows that in this study ER and PR expression were not independent prognostic factors for unfavorable outcomes, probably due to the small sample, since, there was a very significant correlation with tubular formation ($p < 0.007$), mitotic rate ($p < 0.000$), nuclear grade ($p < 0.004$) and Nottingham's combined histological grade ($p < 0.000$), showing to a robust correlation to tumor differentiation. The ER and PR correlations with other tumor markers showed a statistical significance with Bcl-2 ($p < 0.004$) and CK8 ($p < 0.000$) that were highly correlated to the Nottingham grade Bcl-2 ($p < 0.021$) and CK8 ($p < 0.007$) suggesting that they could represent a more differentiated subset of tumors with good prognosis. (7)

The ER expression and the nodal status showed no significant statistical association ($p = 0.943$) as well with tumor size ($p = 0.056$), although 87,1% T1 tumors were ER + while 66,7% of T3 tumors were ER-. The mean time to recurrence value was shorter for ER- (3.0 years) than for ER+ (4.4 years) although it was not statistical significant ($p = 0.263$). In this study 33.3% (18/54) of the ER+ patients received Tamoxifen as the only adjuvant therapy and in this group there were no local relapses and only 2 systemic recurrences, and at end of the follow up period 88.9% were disease free. In agreement with other studies ER and PR expression have great predictive value for adjuvant hormonal therapy. (12, 13)

The ER- and RP- tumors showed a strong correlation with high grade tumors evaluated by the Nottingham grade ($p < 0.000$), but failed to show a statistical significance level considering time to recurrence.

In this study we had 23.9% (15/70) of HER2 positive tumors but unlike Slamon and others (14-21) there was not a statistical significant difference with grade, nodal status, recurrence and death. It was correlated with Ki-67 and CK8 expression but without any clinical implication.

Unlike we expected Ki-67 expression was not related to mitotic rate, and no association with other prognostic factors as: tumor size ,grade, nodal status, ER-,disease free survival and overall survival as shown by others.(22-24) Ki-67 correlated with HER2 and CK8 at a significant level as shown in table 2 , but without any association that could emerge from that data.

As we could might predict CK8 and Bcl-2 had a robust association with ER+ and PR+ expression(1) and they were associated with good histological features as low mitotic rate, high tubule formation and low nuclear grade and were also associated with Luminal A and Luminal B subtypes although this association did not generate any valuable data on clinical outcomes. In agreement with Callagy et al. we found a correlation between Bcl-2 and Nottingham grade but could not confirm the good prognosis as they report. (15)

We could not find any association of p53 expression with early recurrence and worse overall survival as reported by Al-Moundry et al.(14), neither with RE- tumors, high grade, HER2 overexpression as reported by others. (25-27)

Unlike we could expect p63 expression was not associated with RE, RP and2 expression this disagree with Ribeiro Silva et al. reporting that There was a strong relationship between CK5 and p63 expression and both markers were associated with hormonal receptor-negative high-grade carcinomas with high proliferative rate. Furthermore, there was coexpression of CK5 and p63 in neoplastic cells, indicating that p63, like CK5, is a marker of the basal phenotype of breast cancer.(28)

Microarray analyses on breast cancers have identified gene expression profiles able to separate tumor classes associated with patient survival. Perou et al (1). and Sorlie et al (2). showed that the expression profiles primarily distinguished ER+ from ER-tumors and called them luminal and basal subtypes because of their respective luminal and basal characteristics. van't Veer et al (11) had similar observation but extended this to gene expression (or genetic profile) associations with survival in an untreated, node-negative cohort.

Concurrent with recent studies (2-4, 6, 9) we were able to identify in this cohort, groups expressing a distinct molecular profile: Luminal A subtype (HR+, HER2-) with 54.9% of the cases (39/71), Luminal B subtype (HR+,HER2-) with

21.1% (15/71), HER2 subtype (HR-,HER2+) with 2.8% (2/71) and basal or triple negative (HR-,HER2-) with 21.1% (15/71).

In agreement with current knowledge, in this study the basal subtype seems to correlate with worse prognosis, showing a significant relationship with larger tumors ($p < 0.01$) and undifferentiated grade ($p < 0.001$), while Luminal A subtype correlates with well differentiated tumors.

In the same way that individual analysis of tumor markers were not significantly associated with recurrence and death, the molecular subtypes didn't show significance too; probably due to small size of the cohort studied. Although in this study the death rate of the Luminal B subtype (13.3%) was twice the rate of the basal subtype (6.7%).

Interestingly 71.4% of the local relapses occurred in the Luminal A subtype with negative axillary status, which could be explained by the omission of adjuvant treatment for these patients at that time, this observation may play an important role for refining treatment management in the future, since 30% patients with negative lymph nodes will relapse. (29).

In this study the axillary status stands out as a strong prognostic factor; but there was no correlation of any of the tumor markers with positive lymph nodes. A statistical significant difference with local relapse and systemic relapse ($p < 0.001$) was observed, and even though not statistical significant, all deaths occurred in patients with metastatic disease in axillary lymph nodes.

CONCLUSION

Using a molecular profile based upon an immunohistochemical panel with ER,PR and HER2, it's possible to classify breast cancer into a groups representing molecular subtypes significantly related to the tumor differentiation.

The basal or triple negative subtype showed high mitotic index, low tubule formation, high nuclear grade and high Nottingham combined grade, while Luminal A presents itself with an opposite profile. It was impossible to establish a correlation of the molecular subtypes with recurrence and death.

Clinical staging and axillary status were the most important prognostic factors, independent of immunohistochemical analysis and molecular profile. In countries with limited resorts, the molecular profile may be a valuable tool for managing primary breast cancer, especially in node negative patients.

REFERENCES

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
2. 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 Sep 11;98(19):10869-74.
3. 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*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
4. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
5. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Bartelink H, Van de Vijver MJ. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007 Oct 2;9(5):R65.
6. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5367-74.
7. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
8. Schaller G, Fuchs I, Pritze W, Ebert A, Herbst H, Pantel K, et al. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1996 Nov;2(11):1879-85.
9. 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*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8.
10. Pusztai L, Ayers M, Stec J, Clark E, Hess K, Stivers D, et al. Gene expression profiles obtained from fine-needle aspirations of breast cancer reliably identify routine prognostic markers and reveal large-scale molecular differences between estrogen-negative and estrogen-positive tumors. *Clin Cancer Res*. 2003 Jul;9(7):2406-15.
11. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
12. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1865-78.
13. EBCTCG. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.
14. Al-Moundhri M, Nirmala V, Al-Mawaly K, Ganguly S, Burney I, Rizvi A, et al. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2003;9(4):226-31.
15. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res*. 2006 Apr 15;12(8):2468-75.
16. Ferrero JM, Ramaioli A, Largillier R, Formento JL, Francoual M, Ettore F, et al. Epidermal growth factor receptor expression in 780 breast cancer patients: a reappraisal of the prognostic value based on an eight-year median follow-up. *Ann Oncol*. 2001 Jun;12(6):841-6.
17. Harris AL, Nicholson S, Sainsbury JR, Farndon J, Wright C. Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. *J Steroid Biochem*. 1989;34(1-6):123-31.
18. Nicholson S, Wright C, Sainsbury JR, Halcrow P, Kelly P, Angus B, et al. Epidermal growth factor receptor (EGFr) as a marker for poor prognosis in node-negative breast cancer patients: neu and tamoxifen failure. *J Steroid Biochem Mol Biol*. 1990 Dec 20;37(6):811-4.

19. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12.
20. van de Vijver MJ, Mooi WJ, Wisman P, Peterse JL, Nusse R. Immunohistochemical detection of the neu protein in tissue sections of human breast tumors with amplified neu DNA. *Oncogene*. 1988 Feb;2(2):175-8.
21. Wright C, Angus B, Nicholson S, Sainsbury JR, Cairns J, Gullick WJ, et al. Expression of c-erbB-2 oncoprotein: a prognostic indicator in human breast cancer. *Cancer Res*. 1989 Apr 15;49(8):2087-90.
22. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2001 Oct 19;85(8):1106-12.
23. Gottardi O, Tabiaddon D, Scanzi F, Bono A, Majno M, Ferrari M, et al. [Clinical and prognostic usefulness of Ki67 determination in breast carcinoma]. *Pathologica*. 1992 Nov-Dec;84(1094):15-22.
24. Lehr HA, Hansen DA, Kussick S, Li M, Hwang H, Krummenauer F, et al. Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count. *Hum Pathol*. 1999 Nov;30(11):1314-20.
25. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg*. 2001 May;233(5):630-8.
26. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwege D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2004 Jan 1;22(1):86-96.
27. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol*. 2002 May 1;20(9):2310-8.
28. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandao 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*. 2005 Nov;47(5):458-66.
29. Fisher ER, Palekar A, Rockette H, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). V. Significance of axillary nodal micro- and macrometastases. *Cancer*. 1978 Oct;42(4):2032-8.

Table 1. Characteristics of 71 patients evaluated with Invasive Breast Carcinoma

Characteristics	n = 71
Age	50,80 ± 11,55
Race	
Caucasian	67 (94,4%)
Afrobrazilian	4 (5,6%)
Age	
< 50 years	36 (50,7%)
> 50 years	35 (49,3%)
Tumor stage	
T1	31 (43,7%)
T2	37 (52,1%)
T3	3 (4,2%)
Nodal status	
0	39 (54,9%)
01 - 3	27 (28%)
> 4	5 (7%)
Nottingham Grade	
3 - 5	22 (31%)
6 - 7	25 (35,2%)
8 - 9	24 (33,8%)
Tubule Formation	
> 75%	10 (14,1%)
10 - 75%	34 (47,9%)
< 10%	27 (38%)
Mitotic Rate	
0 - 5	21 (29,6%)
6 - 10	12 (16,9%)
> 10	38 (53,5%)
Nuclear Pleomorphism	
small and regular uniform cells	13 (18,3%)
moderate nuclear size and variation	40 (56,3%)
marked nuclear variation	18 (25,4%)
Lymphatic Vascular Invasion	
present	20 (28,2%)
absent	51 (71,8%)
pTNM	
T1N0M0	15 (21,1%)
T1N1M0	16 (22,5%)
T2N0M0	20 (28,2%)
T2N1M0	17 (23,95)
T3N0M0	3 (4,25)
Clinical Stage	
I	15 (21,1%)
IIA	36 (50,7%)
IIB	20 (28,2%)

Data expressed through frequency analysis

Table 3. Association of the molecular subtypes and histological features

	Basal n= 15	Luminal B n =15	Luminal A n = 39	HER2 n = 2	P *
Nottingham Grade					
3 - 5	1 (6,67%)	5 (33,33%)	16 (41,03%)	0 (0%)	0,03
6 - 7	2 (6,67%)	6 (40%)	16 (41,03%)	1 (50%)	
8 - 9	12 (80%)	4 (26,67%)	7 (17,95%)	1 (50%)	
Tubule formation					
> 75%	1 (6,67%)	1 (6,67%)	8 (20,51%)	0 (0%)	0,04
10 - 75%	4 (26,67%)	10 (66,67%)	20 (51,28%)	0 (0%)	
< 10%	10 (66,67%)	4 (26,67%)	11 (28,215)	2 (100%)	
Mitotic rate					
0 - 5	0 (0%)	5 (33,33%)	15 (38,46%)	1 (50%)	0,04
6 - 10	1 (6,67%)	3 (20%)	8 (20,51%)	0 (0%)	
> 10	14 (93,33%)	7 (46,67%)	16 (31,37%)	1 (50%)	
Nuclear pleomorphism					
small and regular uniform cells	0 (0%)	2 (13,33%)	11 (28,21%)	0 (0%)	0,01
moderate nuclear size and variation	6 (40%)	9 (60%)	25 (64,10%)	0 (0%)	
marked nuclear variation	9 (60%)	4 (26,67%)	3 (7,69%)	2 (100%)	

Data expressed through frequency analysis

* Chi Square test

Table 4. Association of the molecular subtypes with clinical and immunohistochemical features

	Basal n=15	Luminal B n =15	Luminal A n = 39	HER2 n = 2	P *
Positive marker					
RE	0 (0%)	15 (100%)	39 (100%)	0 (0%)	< 0,05
RP	0 (0%)	15 (100%)	39 (100%)	0 (0%)	< 0,05
HER2	0 (0%)	15 (100%)	0 (0%)	2(100%)	< 0,05
p53	5 (33,33%)	2 (13,33%)	9 (23,08%)	1 (50%)	0,49
p63	3 (20%)	4 (26,67%)	9 (23,08%)	1 (50%)	0,82
Ki-67	4 (12,12%)	4 (12,12%)	5 (12,82%)	1 (50%)	0,35
CK8	6 (40%)	15 (100%)	30 (76,92)	0 (0%)	< 0,05
Tumor Stage					
T1	3 (20%)	6 (40%)	21 (53,85%)	1 (50%)	0,22
T2	10 (66,67%)	9 (60%)	17 (43,59%)	1 (50%)	
T3	2 (13,33%)	0 (0%)	1 (2,56%)		
Nodal status					
0	7 (46,67%)	9 (60%)	21 (53,85%)	2(100%)	0,88
1 - 3	7 (46,67%)	5 (33,33%)	15 (38,46%)	0 (0%)	
> 4	1 (6,67%)	1 (6,67%)	3 (7,69%)		
Clinical Stage					
I	0 (0%)	3 (20%)	11 (28,21%)	1 (50%)	0,28
IIA	9 (60%)	9 (60%)	17 (43,59%)	1 (50%)	
IIB	6 (40%)	3 (20%)	11 (28,21%)		

Data expressed through frequency analysis

* Chi Square test

Table 5. Association of the molecular subtypes and outcomes

	Basal n= 15	Luminal B n =15	Luminal A n = 39	HER2 n = 2	P
Recurrence					
No	13 (86,67%)	9 (60%)	26 (66,67%)	2 (100%)	0,28*
Yes	2 (13,33%)	6 (40%)	13 (33,33%)	0 (0%)	
Type of recurrence					
					0,54*
local relapse	1 (6,67%)	1 (6,67%)	5 (12,82%)	0 (0%)	
bone	0 (0%)	1 (6,67%)	5 (12,82%)	0 (0%)	
pulmonary	1 (6,67%)	2 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	
hepatic	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,56%)	0 (0%)	
brain	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
pulmonary and hepatic	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)	
bone and pulmonary	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	
lost follow up	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	
Time to recurrence	3 ± 2,65	4,40 ± 1,82	4,46 ± 2,03	0	0,54**
Death					
Yes	1 (6,67%)	2 (13,33%)	2 (5,13%)	0 (0%)	0,64*
No	13 (86,67%)	12 (80%)	37 (94,87%)	2 (100%)	
Lost follow up	1 (6,67%)	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	

Data expressed through frequency analysis

* Chi Square test

** Anova

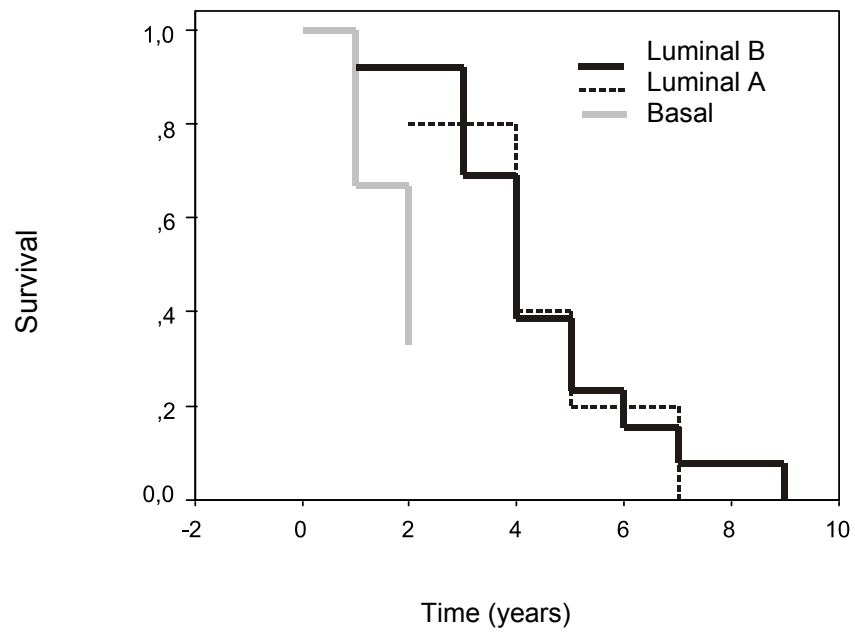
Table 6. Association between nodal status and outcomes

Outcomes/Lymph Nodes	0 n= 39	1 – 3 n = 27	> 4 n= 5	P
Local relapse				0,08*
No	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	
Yes	7 (17,95%)	0 (0%)	0 (0%)	
Others	4 (21,05%)	6 (22,22%)	4 (80%)	
Death				0,13*
Yes	0 (0%)	4 (14,81%)	1 (20%)	
No	38 (97,44%)	22 (81,48%)	3 (80%)	
Lost follow up	1 (2,56%)	1 (3,70%)	0 (0%)	

Data expressed through frequency analysis

* Chi Square test

Survival analysis – Time to recurrence



ARTIGO (Versão em português)

Valor prognóstico e preditivo dos marcadores imunoistoquímicos no carcinoma invasor da mama

Jorge Villanova Biazús¹, Maria Isabel Edelweiss², Márcia Portela Melo¹, Diego Uchoa².

¹ Serviço de Mastologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

² Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil.

Financiamento

Fundo de Incentivo à Pesquisa (FIPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

Correspondência

Dr. Jorge Villanova Biazús

End: Ramiro Barcelos, n.2350, sala 600

CEP: 900035-003

Porto Alegre

Rio Grande do Sul

Brasil

RESUMO

Base teórica: Nos últimos anos, subtipos moleculares de carcinoma de mama foram identificados através de estudos de perfil genético por “DNA microarray”. Esta nova tecnologia pode melhorar a avaliação prognóstica, porém ainda não está disponível e é de alto custo. A possibilidade de se identificar subtipos moleculares através de métodos mais simples e de menor custo é particularmente importante em países com recursos limitados. A identificação de subtipos do câncer de mama é particularmente importante pelas implicações clínicas e pelas opções de tratamento.

Métodos: Uma coorte retrospectiva de 71 pacientes consecutivas com carcinoma primário de mama de estágio clínico I e II, tratadas no Serviço de Mastologia do HCPA, entre os anos de 1993 e 1997, com um seguimento mínimo de 5 anos. Foram revisados dados sobre características clínicas, histopatológicas, evolução clínica e desfechos apresentados no período. Foi realizada uma análise imunoistoquímica de blocos representativos dos tumores, avaliando-se o Receptor Estrogênico (RE), o Receptor de Progesterona (RP), o HER2, o KI-67, o Bcl-2, o p53, o p63 e o CK8. Os objetivos foram determinar a prevalência do perfil molecular nesta população e seus desfechos clínicos.

Resultados: 39 tumores (54,9 %) foram luminal A; 15 tumores (21,1%) foram luminal B; 15 tumores (21,1) foram basais ou triplo negativos e somente 2 tumores (2,8%) foram HER2. Não houve diferença no prognóstico entre os subtipos de câncer de mama: luminal A (RH positivo e HER2 negativo); luminal B (RH positivo e HER2 positivo); HER2 (HER2-positivo) e basal (RH negativo, HER2-negativo) em relação à sobrevida livre de doença e à sobrevida global, embora apresentassem uma forte correlação com a diferenciação e com o grau tumoral. Provavelmente, isto se deve ao pequeno número de pacientes e ao seu prognóstico com estágios iniciais da doença.

Conclusões: Nossos resultados sugerem que é possível identificar os subtipos do câncer de mama pela análise imunoistoquímica de RE, RP e HER2, e que a adição de outros marcadores não melhora a estimativa de prognóstico. O perfil molecular imunoistoquímico pode ser um instrumento valioso para o manejo do câncer de mama em países com recursos limitados.

Palavras-chave: câncer de mama, neoplasia da mama, subtipos moleculares, imunohistoquímica

INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea composta por uma variedade de subtipos biologicamente distintos como se demonstra pelos estudos de expressão gênica dos tumores. Tais estudos, usando microplataformas de DNA, identificaram vários subtipos distintos. (1) Estes subtipos evidenciam diferenças no prognóstico e nas possibilidades de dirigir o tratamento a alvos específicos. (2-5) Dentro desta estratificação pela expressão gênica, sobressaem 2 grupos principais baseados nos receptores de estrógeno, a saber, os tumores com receptores de estrógeno negativos (subtipo basal e subtipo HER2+) e os com receptores de estrógeno positivos (subtipo luminal A e luminal B). (1, 3, 4)

Os tumores basais apresentam caracteristicamente receptores negativos para o estrógeno e para a progesterona e expressão baixa para HER2, associados à expressão de genes característicos do epitélio basal da mama, especialmente expressando genes para as citoqueratinas 5, 6, 17. (1)

Os tumores HER2+ aloca-se em dois subgrupos: o primeiro, associado a RE- que tem expressão gênica que os aproxima aos tumores basais (subtipo RE-/HER+) e um segundo grupo, associado a RE+ e/ou RP+ que se agrupam aos tumores com expressão gênica das células luminiais, compondo o subtipo luminal B. (3, 4)

Embora os subtipos tenham sido estabelecidos por estudos da análise da expressão gênica do câncer de mama, foi possível estabelecer um paralelo, empregando-se a análise imunohistoquímica dos tumores, a fim de se criar um perfil molecular com grande correspondência à expressão gênica dos tumores. (2, 6, 7)

O perfil molecular assim estabelecido pela imunohistoquímica identifica os subtipos como: luminal A (RE+ e/ou RP+ /HER2-), luminal B (RE+ e/ou RP+ /HER+), HER2 (RE- /HER2+), basal (RE-, RP-, HER2-, citoqueratina 5/6+, e/ou HER1+), subtipo indeterminado — todos marcadores negativos (Carey, Perou et al. 2006). Recentemente Kreike e cols., ao estudarem o subtipo triplo negativo,

demonstraram que todos os tumores (RE-, RP-, HER2-) podem ser considerados do subtipo basal, levando-se em conta a sua expressão gênica global. (7)

A classificação através do perfil imunoistoquímico é de fácil execução e de baixo custo. Desta forma, deverá ser um instrumento valioso no manejo clínico do câncer de mama, enquanto as sofisticadas e dispendiosas técnicas de expressão gênica não forem padronizadas e validadas — poderá ser especialmente útil em países com recursos financeiros limitados como o Brasil. Para avaliar a correlação entre o perfil molecular imunoistoquímico com os parâmetros clínicos e histopatológicos, realizou-se uma análise imunoistoquímica para RE, RP, HER2, Ki-67, Bcl-2, p53, p63, CK8.

Os casos foram classificados como: luminal A, luminal B, HER2 e basal ou triplo negativo, e foram correlacionados com fatores clínicos e histopatológicos. Avaliou-se também se a associação com outros fatores prognósticos conhecidos reforçaria a impressão prognóstica de acordo com os desfechos de recorrência e morte.

MATERIAL E MÉTODOS

Foram revisados 87 casos de pacientes com carcinoma ductal invasor de mama, tratadas e acompanhadas no Ambulatório de Mastologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), no período de janeiro de 1993 a janeiro de 1997 e acompanhadas por um período mínimo de 5 anos. Destes, 71 casos apresentavam blocos de parafina, contendo tumor suficiente para se realizar todas as análises requeridas pelo protocolo em estudo.

Os dados coletados, a partir da pesquisa em prontuários no SAMIS, incluíram: a idade da paciente no momento do diagnóstico, a etnia, a história familiar de carcinoma de mama em parente de primeiro grau, o tipo de tratamento recebido, o intervalo livre da doença, especificando-se o local de metástase e o óbito. O

estadiamento clínico TNM no momento do diagnóstico, o tamanho do tumor, o estado da axila foram extraídos do prontuário médico. O grau histológico, o grau nuclear e o índice mitótico foram determinados de acordo com os critérios de Scarff-Bloom-Richardson, modificados por Elston-Ellis (8); ainda foram avaliados a presença de invasão angiolinfática e o extenso componente intraductal, conforme rotina do Serviço de Patologia do HCPA.

O seguimento clínico dos casos foi realizado de acordo com a rotina do Serviço de Mastologia do HCPA que determina revisões clínicas trimestrais e exames laboratoriais, incluindo-se, aqui, a análise bioquímica do sangue, o Rx de tórax, a ecografia abdominal total, a cintilografia óssea, a ecografia mamária e mamografia anuais ou a qualquer momento na suspeita de recorrência ou de doença metastática.

Assegurou-se a privacidade de todos os dados obtidos, visto que essas informações foram utilizadas exclusivamente com a finalidade científica expressa no projeto de pesquisa, com a garantia da preservação da identidade das pessoas pesquisadas quando da divulgação do trabalho.

Critérios de inclusão

Foram incluídas pacientes com tumores em estádios I (T1N0M0), IIA (T0N1M0/ T1N1M0/ T2N0M0) e IIB (T2N1M0/ T3N0M0), submetidas a tratamento cirúrgico, seguido ou não de radioterapia e/ou tratamento adjuvante, acompanhadas no Ambulatório de Mastologia do HCPA, independentemente do desfecho durante o período de seguimento, isto é, a "cura", o surgimento de metástases ou a morte. O estadiamento foi realizado conforme as normas recomendadas pela União Internacional Contra o Câncer (UICC/AJCC). Somente foram incluídas pacientes com registros médicos com informações completas a fim de se alimentar o banco de dados do estudo. Pacientes com carcinomas ductal ou lobular "in situ", carcinoma ductal de tipo especial e carcinoma lobular invasor em qualquer estágio ou ductal

invasor em estádios III ou IV e também as submetidas à quimioterapia neoadjuvante foram excluídas.

Análise anatomopatológica

A análise imunoistoquímica foi realizada no Serviço de Patologia do HCPA. Os marcadores tumorais avaliados foram o receptor de estrógeno (RE), o receptor de progesterona (RP), o HER2, o p53, o Ki-67, o Bcl-2, o p63 e o CK 8.

Os espécimes cirúrgicos foram fixados em formalina tamponada e emblocados em parafina, sendo avaliados cortes de 4 micra de espessura, corados pela hematoxilina-eosina. Os cortes representativos do tumor foram submetidos à técnica imunoistoquímica utilizada na rotina do Serviço de Patologia do HCPA, que consiste na desparafinização e reidratação, recuperação antigênica, inativação da peroxidase endógena e bloqueio das reações inespecíficas. Os anticorpos primários foram incubados por 12 horas, a 4°C, nas diluições sugeridas pelos fornecedores, seguido da aplicação do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase (LSAB, Dako) e revelação com diaminobenzidina tetraidroclorido (Kit DAB, Dako).

A revisão das lâminas foi realizada por dois patologistas MIE e DU, sem conhecimento das características clínicas e demográficas da coorte estudada.

Análise imunoistoquímica

Os receptores de estrógeno e de progesterona foram avaliados pelo método semiquantitativo proposto por Allred, tendo-se em conta a intensidade (0, ausente; 1, fraco; 2, moderada; 3, forte) e a expressão (0,ausente; 1+,1/100; 2+, até 1/10; 3+, até 1/3; 4+, até 2/3; 5+,>2/3); foram considerados positivos quando a soma resultar

em escore acima de 2 (Harvey, Clark et al. 1999).

O HER2 foi graduado como positivo quando a forte coloração membranosa moderada estiver presente em mais de 10% das células tumorais, sendo as amostras positivas graduadas em focal, fraca, coloração não-contínua da membrana (1+); focal, moderada, reatividade contínua da membrana (2+); homogênea, forte e positividade contínua da membrana (3+).

O p53 será considerado positivo se mais de 10% dos núcleos forem corados.

O bcl-2 será considerado positivo quando mais de 30% das células tumorais apresentarem imunorreatividade citoplasmática.

O p63 pode estar presente ou ausente.

O CK8 foi avaliado pelo método semiquantitativo proposto por Schaller: a intensidade (0, ausente; 1, fraco; 2, moderado; 3, forte) multiplicada pelo escore da percentagem de células coradas (ausente; 1, <10%, 2; até 50%;3, 50-80%; 4, acima de 80%); o escore é de 0-4 (negativo) e de 5-12 (positivo)(9).

O Ki67 é expresso pela porcentagem de núcleos corados — será considerado positivo se > 15% foram esses núcleos .

Seqüência do estudo

Para se estimar a probabilidade de desfecho desfavorável, o delineamento do estudo seguiu quatro etapas. Inicialmente, analisou-se isoladamente a relação da expressão dos receptores de estrógeno, de progesterona e a superexpressão de HER2 em relação aos parâmetros histológicos, ao estado dos linfonodos, ao estado menopausal e à ocorrência de recorrência a toda a população estudada.

Na segunda, classificam-se os tumores de acordo com as suas características imunoistoquímicas em: subtipo luminal A (RE+ e/ou RP+,her2-), subtipo luminal B

(RE+ e/ou RP+,her2+), subtipo HER2 (HER2+,RE-, RP-) e subtipo basal ou triplo negativo (RE-,RP-,HER2-), correlacionando-se, aqui, os parâmetros histológicos, o estado menopausal, o estado da axila, com os desfechos de recorrência e morte.

Na terceira etapa, associam-se outros marcadores biomoleculares aos grupos já estabelecidos, buscando-se identificar as correlações tanto positivas como negativas para os desfechos encontrados.

Na quarta etapa, verificou-se como as intervenções terapêuticas se correlacionaram com os subgrupos estudados.

Os dados com as características da coorte estudada são apresentados na tabela1.

Análise Estatística

As variáveis contínuas foram descritas através de valor máximo, valor mínimo, média e desvio padrão e as variáveis nominais foram descritas através de análises de frequência.

As associações entre os grupos foram verificadas através da análise One-Way Anova.

As demais associações entre 2 grupos de variáveis nominais foram verificadas através do Teste Qui - Quadrado ou Teste Exato de Fischer; entre variáveis contínuas, a associação foi testada através do Teste t-Student para amostras independentes, sendo que, em todos os testes, foram respeitadas as suposições dos mesmos.

A normalidade dos dados foi verificada através do teste não-paramétrico de "One-Sample Kolmogorov-Smirnov Test".

Foi considerado estatisticamente significativo um alfa de 0,05 em todas as associações.

As análises foram realizadas, utilizando-se o SPSS (versão 12.0), Chicago.

RESULTADOS

Receptores de Estrógeno

Observou-se que 54 (76%) dos casos amostrados expressaram RE positivos e 17(24%) foram RE negativos.

A expressão do RE apresentou relação estatisticamente significativa com a formação tubular ($p < 0.007$), com o grau nuclear ($p < 0.000$), com o índice mitótico ($p < 0.004$) e com o Grau histológico de Nottingham ($p < 0.000$), demonstrando-se que a sua expressão está fortemente relacionada à diferenciação tumoral. Não houve relação estatisticamente significativa com a invasão angiolinfática ($p = 0.896$). A relação com outros marcadores imunoistoquímicos mostrou significância estatística com Bcl-2 ($p < 0.006$) e CK8 ($p < 0.000$), contudo não apresentou significância estatística com HER2 ($p = 0.166$), p63 ($p = 0.933$), p53 ($p = 0.209$), Ki-67 ($p = 0.249$). Em relação ao estado da axila (0, 1-3, ≥ 4 linfonodos comprometidos), não houve correlação com significância estatística ($p = 0.943$); em relação ao tamanho tumoral ($p = 0.056$), com 87,1% dos tumores T1 apontaram RE+, enquanto 66,7% dos tumores T3 apresentaram RE-. Considerando-se a idade, não houve correlação significativa antes ou após os 50 anos. Mostrou-se relação significativa com o tamanho tumoral no momento do diagnóstico, sendo de menores dimensões quando RE+ ($p < 0.003$) O tempo médio para a recorrência foi menor para RE- (3,0 anos) do que RE+ (4,4 anos), no entanto sem atingir significância estatística ($p = 0.263$).

A expressão de receptores estrogênicos não foi significativa na predição de recorrência ($p = 0.067$) e morte ($p = 0.671$).

Receptor de Progesterona

Também apresentou relação estatisticamente significativa com a formação tubular ($p < 0.007$), com o grau nuclear ($p < 0.000$), com o índice mitótico ($p < 0.004$) e com o Grau de Nottingham ($p < 0.000$). Não houve relação estatisticamente significativa com a invasão angiolinfática ($p = 0.896$). Considerando-se os outros marcadores imunoistoquímicos, demonstrou relação estatisticamente significativa com o Bcl-2 ($p < 0.006$), com o CK8 ($p < 0.000$) e sem relação com o HER2 ($p = 0.209$), com o p63 ($p = 0.933$), com o p53 ($p = 0.209$) e com o Ki-67 ($p = 0.249$). Apresentou relação significativa com o tamanho tumoral no momento do diagnóstico, sendo de menores dimensões quando RP+ ($p < 0.003$). O tempo médio para a recorrência foi menor para RE- (3,0 anos) do que RP+ (4,4 anos), porém sem atingir significância estatística ($p = 0.263$). Não houve correlação do estado dos RP com o desfecho morte ($p = 0.671$).

HER2

A expressão imunoistoquímica do HER2 (3+) não apresentou relação estatisticamente significativa com a formação tubular ($p = 0.402$), com o grau nuclear ($p = 0.498$), com o índice mitótico ($p = 0.837$), com o Grau histológico de Nottingham ($p = 0.781$), com a invasão angiolinfática ($p = 0.809$) e nem com os marcadores imunoistoquímicos. Não mostrou relação com o estado da axila ($p = 0.610$), com o tamanho tumoral ($p = 0.569$) e nem com a idade ($p = 0.780$). O tempo médio para a recorrência foi semelhante para HER2+ (4,2 anos) e para HER2- (4,4 anos). Não houve correlação do estado dos RP com o desfecho morte ($p = 0.671$).

A expressão do HER2 (3+) não foi preditiva de recorrência ($p = 0.481$) e morte ($p = 0.464$).

As correlações entre os marcadores são apresentadas na tabela 2.

Análise de grupos conforme o perfil molecular

Quatro grupos de tumores foram formados, correspondendo aos subtipos moleculares. O primeiro grupo apresenta positividade para, pelo menos, um dos receptores hormonais e sem superexpressão de HER2 (RE+ e/ou RP+,HER2-) com 39 casos ou 54,9% da amostra que corresponderia ao subtipo luminal A; o segundo grupo expressa RE+ e/ou RP+,HER2+, representando o subtipo luminal B com 15 casos ou 21,1% da amostra; o terceiro grupo (RE-,RP-,HER2+), subtipo HER2 com 2 casos ou 2,8% e o quarto grupo (RE-,RP-,HER2-), subtipo basal ou triplo negativo com 15 casos ou 21,1% da amostra.

Foi significativa a correlação entre os grupos entre a formação tubular ($p<0.007$), o grau nuclear ($p<0.000$), o índice mitótico ($p<0.02$) e o índice de Nottingham ($p<0.001$), demonstrando-se a associação com tumores bem diferenciados com o subtipo luminal A e tumores pouco diferenciados aos subtipos HER2 (100% GN 2-3) e basal ou triplo negativo (93,3% GN 2-3).

O estadiamento clínico e a classificação TNM não apresentaram relação estatisticamente significativa com qualquer grupo em particular, embora isoladamente o tamanho tumoral evidenciou diferença significativa entre os subgrupos ($p<0.01$), tendo o grupo triplo negativo tumores de maiores dimensões.

Não houve diferença significativa com outros parâmetros histológicos, com a invasão angiolinfática ($p=0.932$) e com o extenso componente "in situ" ($p=0.644$).

Considerando-se os outros marcadores imunoistoquímicos avaliados, somente a expressão de CK8 mostrou significância estatística com os subgrupos estudados ($p<0.006$), sendo fortemente relacionada aos subtipos luminal A e B.

A divisão em subgrupos não mostrou significância quanto à recorrência ($p=0.295$) e também quanto ao tipo de recorrência ($p=0.692$), ainda que 71,4% das recorrências locais tenham ocorrido no subgrupo luminal A (RH+/HER2-) que poderia ser explicado pela ausência de terapia adjuvante nestes casos considerados de bom prognóstico pelos critérios adotados na época. Quando analisada a

mortalidade, não mostrou significância estatística entre os subgrupos, se bem que, no subgrupo luminal B, a taxa de 13,3% (2/15) tenha sido duas vezes a ocorrida no grupo basal com 6,71% (1/15).

Não houve correlação estatisticamente significativa entre o Grau histológico de Nottingham e a ocorrência ou não de recidiva ($p=0.159$), mesmo que 47,6% destas tenham ocorrido no grupo classificado como pouco diferenciado. Não houve correlação estatisticamente significativa entre o Grau histológico de Nottingham e morte ($p=0.969$), embora 60% destas tenham ocorrido no grupo classificado como pouco diferenciado. As correlações conforme o perfil molecular são apresentadas nas tabelas 3 e 4.

Análise conforme recorrência e óbito

Ocorreram 21 recorrências (29,6%), sendo 7 do tipo locorregional (9,9%) e 14 a distância (19,7%); ainda que 6 casos (85,7%) tenham ocorrido após o tratamento conservador, isso não atingiu significância estatística ($p=0.163$). Essas recorrências foram mais frequentes na raça negra ($p<0.046$) e não possuíram relação com a idade ($p=0.720$)

Todas as recorrências locais aconteceram em pacientes com ausência de comprometimento axilar ($p<0.041$), e nenhuma destas pacientes recebeu terapêutica adjuvante com hormônio ou com quimioterapia. Nas 18 pacientes (25,4%) que receberam tamoxifeno adjuvante, não houve recorrência local, embora sem significância estatística ($p=0.179$). A presença de componente intraductal extenso não foi significativa para a recorrência local ($p=0.337$), bem como a presença de invasão angiolinfática que apenas sinalizou uma tendência ($p=0.073$), estando presente em 57% dos casos com RL. O grau nuclear foi o único parâmetro histológico associado à RL com ($p<0.050$). A ocorrência de recidiva local não foi significativa para morte ($p=0.654$); ainda, nenhum caso de RL desenvolveu metástase a distância no período de observação do estudo.

Ocorreram 14 recorrências a distância (19,7%), não havendo diferença significativa entre os grupos; porém, houve a distribuição percentual para luminal A (17,9%), luminal B (33,3%), basal (13,3%) e HER2 sem recorrências a distância.

A mortalidade observada foi de 7% com seguimento mínimo de 5 anos, sendo que 60% das mortes em pacientes ocorreram com menos de 50 anos no momento do diagnóstico. O tamanho do tumor não apresentou correlação significativa com os desfechos de óbito, com o número de recorrências e com o tipo de recorrência.

A presença de invasão angiolinfática não teve significância ($p=0.699$) relacionada ao óbito.

O estadiamento clínico apontou uma tendência muito expressiva em relação ao óbito ($p=0.077$), no entanto sem significância estatística. Não ocorreu nenhum óbito em pacientes com estágio clínico I, sendo que 80% dos óbitos ocorreram no estágio IIB.

Não houve, também, significância para os seguintes elementos: Bcl-2 ($p=0.646$), HER2 ($p=0.464$), p63 ($p=0.464$), p53 ($p=0.510$), ck8 ($p=0.728$), Ki-67 ($p=0.301$), RE ($p=0.671$), RP ($p=0.671$).

Perfil molecular e comprometimento dos linfonodos axilares

Não foi observada relação com o nível de significância entre os subtipos estudados e o grau de comprometimento axilar; também não houve relação do estado da axila com o índice mitótico, com o grau nuclear ou com o Grau total de Nottingham. Nenhum dos marcadores imunoistoquímicos associou-se com o estado patológico da axila. Observou-se importante relação com a recorrência local e a distância ($p<0.000$); ainda que não tenha atingido significância estatística para morte ($p=0.136$), observa-se que os óbitos ocorreram em pacientes com axila comprometida.

Efeito do tratamento

Este grupo de 71 pacientes foi tratado conforme rotina assistencial empregada no período estudado; 40 receberam tratamento sistêmico adjuvante com tamoxifeno, quimioterapia com protocolo CMF ou com a associação destes, e 31 pacientes não receberam adjuvância.

Foram observadas 21 recorrências (29,6% dos casos), sendo 7 (9,9%) casos de recorrência local e 14 (19,7%) casos de recorrência a distância. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos quanto a mortes e à recorrência.

O grupo tratado apresentou 25% de recorrência (10 casos), sendo 2 (5%) recorrências locorregionais, e o grupo não-tratado apresentou recorrência em 35,5% (11 casos) — destes, 5 (16,1%) foram do tipo locorregional.

A recorrência locorregional ocorreu em 1 (3,2%) dos 31 casos de MRM e em 6 (15%) dos 40 casos de cirurgia conservadora, sem apresentar diferença estatisticamente significativa. A recorrência a distância ocorreu em 5 (16,1%) em casos submetidos à MRM e em 9 (22,5%) em casos de cirurgia conservadora, também sem apresentar diferença significativa ($p=0.970$).

DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea, assim sendo, pacientes com o mesmo perfil clinicopatológico podem ter desfechos clínicos completamente distintos. Tais diferenças são possivelmente causadas pela limitação de uma classificação baseada apenas na morfologia tumoral. (5)

Estudos recentes classificam os tumores de mama dentro de subgrupos clinicamente relevantes baseados na expressão gênica e em marcadores

moleculares. O objetivo principal é encontrar formas de se determinar com maior precisão os grupos com melhor e com pior prognóstico, considerando-se cada subtipo uma doença biologicamente distinta, visando aliar fatores que sejam prognósticos e preditivos para a melhor escolha terapêutica.

A técnica de "microarray", pelo estudo de vários genes simultaneamente, permitiu subclassificar o carcinoma de mama em grupos com características gênicas distintas e com forte determinismo quanto ao prognóstico. (1, 3-5) Em paralelo, estudos com marcadores tumorais pela técnica de imunistoquímica correlacionam os seus achados com os grupos determinados pela técnica de "microarray", encontrando forte concordância entre ambas, em especial no fenótipo basal ou no triplo negativo. (2, 6, 7)

Neste estudo, em concordância com estudo conduzido por Carey e cols., o uso de marcadores tumorais determinados por imunistoquímica mostra-se adequado para se estimar a prevalência de subtipos tumorais. (6)

A expressão dos receptores de estrógeno foi o fator mais importante a fim de se discriminar a expressão dos subtipos, seguido pelo grau tumoral. Os receptores de estrógeno e de progesterona aparecem como marcadores importantes não somente para definir os subtipos tumorais como também possuem forte capacidade preditiva de resposta à terapêutica hormonal. Neste sentido, aproximadamente 50% a 60% das mulheres com positividade para RE respondem à terapêutica hormonal, ao passo que apenas 10% daquelas RE negativas apresentam a mesma resposta. Essa predição à resposta terapêutica pode ser aumentada pela combinação de RE e de RP positivos, tendo-se, assim, uma resposta em torno de 78% .(10-13)

Neste estudo, assim como em outros, o RE não aparece como um fator prognóstico independente para desfechos desfavoráveis, provavelmente devido ao pequeno tamanho da amostra, pois apresentou forte correlação com a formação tubular ($p < 0,007$), com o índice mitótico ($p < 0,000$), com o grau nuclear ($p < 0,004$) e com o Grau de Nottingham ($p < 0,000$), demonstrando, deste modo, forte correlação com a diferenciação tumoral. A correlação dos RE e RP com outros marcadores tumorais mostrou-se altamente significativa com Bcl-2 e CK8, que por sua vez foram fortemente correlacionados com o Grau de Nottingham, com o Bcl-2 ($p < 0.021$) e

com o CK8 ($p < 0.007$), sugerindo que talvez representem um subgrupo de tumores com bom prognóstico. (8, 10) Embora sem significância, o tempo médio de recorrência foi menor nas pacientes com RE negativo. Desta maneira, os RE e RP permanecem como importantes fatores preditores de resposta à terapia hormonal. (14)

Ainda, observou-se 23,9% (15/70) de HER2 superexpresso; porém diferentemente de Slamon e de outros autores (15-18), não houve, aqui, diferença estatisticamente significativa com o grau tumoral, com o estado dos linfonodos, com a recorrência e com a morte. O HER2 correlacionou-se, pois, significativamente com Ki-67 e CK8, contudo sem implicações clínicas.

Ao contrário do esperado, a expressão de Ki-67 não se relacionou com o índice mitótico, e não se observaram associações com outros fatores prognósticos, tais como o tamanho do tumor, o estado dos linfonodos, o RE negativo, bem como desfechos clínicos, conforme demonstrado por outros. (19-22)

O Ki-67 correlacionou-se significativamente com o HER2 e com o CK8, de acordo com o apresentado na tabela 2, no entanto sem produzir qualquer associação com os desfechos estudados.

Como se previu, a expressão de CK8 e de Bcl-2 apresentou forte correlação com a expressão de RE e de RP. (4) Deste modo, evidenciaram-se achados histológicos favoráveis, como o baixo número de mitoses, a alta formação tubular e o baixo grau nuclear; também se associaram aos subtipos luminal A e luminal B — mesmo assim, isso não gerou informação valorizável sobre desfechos clínicos. Em concordância com Callagy e cols., encontrou-se, aqui, correlação com o Grau de Nottingham, entretanto não se consegue confirmar o bom prognóstico por eles relatado. (23)

Neste estudo, não se produziu qualquer associação de p53 com recorrência precoce ou pior sobrevida global, como foi relatado por Al-Moundry e cols., nem com tumores RE-, com alto grau de superexpressão de HER2, conforme foi relatado por outros. (24-26)

Ao contrário do que esperou aqui, a expressão de p63 não se associou com RE, com RP e com a superexpressão de HER2, em desacordo com o narrado por Ribeiro Silva e cols. que referem uma forte relação entre CK5 e p63; ainda, para eles, ambos os marcadores estavam associados a receptores hormonais negativos, a carcinomas de alto grau e a altas taxas de proliferação. Além disso, a coexpressão de CK5 e p63 em células neoplásicas indica que a expressão de p63, como a expressão de CK5, é um marcador do câncer de mama do tipo basal. (27)

De acordo com o perfil molecular estabelecido por estudos anteriores (2-6), na amostra de pacientes estudadas, foram identificados quatro subtipos distintos: luminal A (RE+ e/ou RP+, HER2-), correspondendo a 54,9% dos casos (39/71); luminal B (RE+ e/ou RP+, HER2+) com 21,1% (15/71), subtipo HER2 (RE- e RP-, HER2+) com 2,8% (2/71) e basal ou triplo negativo (RE- e RP-, HER2-), correspondendo a 21,1% (15/71) dos casos. Concordando com a literatura, neste estudo o subtipo basal parece relacionar-se a um pior prognóstico, apresentando uma associação significativa com tumores de maior tamanho ($p < 0,01$) e pouco diferenciados ($p < 0,001$). Como foi descrito por outros pesquisadores, o subtipo luminal A correlaciona-se com tumores bem diferenciados, e os tumores basal ou triplo negativos, com tumores pouco diferenciados.

Da mesma forma que a análise individual dos marcadores tumorais, os grupos formados conforme o perfil molecular não foram preditivos de recorrência ou de morte, o que possivelmente pode ser explicado pelo tamanho reduzido da amostra, mesmo que, no subgrupo luminal B, a taxa de mortalidade de 13,3% tenha sido mais de duas vezes a ocorrida no grupo basal com 6,7%. Apesar de 71,4% das recorrências locais terem ocorrido no subgrupo luminal A (RH+/HER2-) — o que pode ser explicado pela ausência de terapia adjuvante nestes casos considerados de bom prognóstico pelos critérios adotados na época —, esse achado pode significar, no futuro, um fator a mais nas decisões ligadas à terapia complementar no carcinoma de mama, considerando-se que aproximadamente 30% das pacientes com linfonodos axilares negativos recidivam. (28)

Em estudo anterior, Carey e col. relataram que os tumores basais não apresentaram associação com comprometimento axilar no momento do diagnóstico,

enquanto o subtipo HER2+ foi significativamente associado à presença de metástases axilares. (6)

Neste estudo, o grau de comprometimento dos linfonodos axilares aparece como fator prognóstico independente, não havendo correlação dos marcadores tumorais com o estado da axila. Uma associação significativa com recorrência local e a distância ($p < 0,001$) foi encontrada e, apesar de não ser significativa, todas as mortes ocorreram nas pacientes com axila comprometida.

CONCLUSÃO

Empregando-se o perfil molecular baseado no estudo imunoistoquímico de RE, de RP e de HER2, é possível classificar os tumores em subtipos distintos, significativamente relacionados à diferenciação tumoral. Os tumores subtipo basal (triplo negativos) apresentam alto índice mitótico, baixa formação tubular, pleomorfismo acentuado e alto Grau total de Nottingham. Não foi possível, entretanto, estabelecer relação dos subtipos com os desfechos de recorrência e de morte. O estadiamento clínico e o estado da axila foram os fatores prognósticos mais importantes, independentemente da análise imunohistoquímica dos tumores e de seu perfil molecular. Em regiões com recursos limitados, poderá ser efetivamente um instrumento para orientar o manejo do câncer de mama, especialmente nas pacientes com linfonodos negativos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
2. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5367-74.
3. 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 Sep 11;98(19):10869-74.
4. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
5. 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*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8.
6. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
7. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Bartelink H, Van de Vijver MJ. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007 Oct 2;9(5):R65.
8. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10.
9. Schaller G, Fuchs I, Pritze W, Ebert A, Herbst H, Pantel K, et al. Elevated keratin 18 protein expression indicates a favorable prognosis in patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1996 Nov;2(11):1879-85.
10. EBCTCG. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet*. 2005 May 14-20;365(9472):1687-717.
11. Eifel P, Axelson JA, Costa J, Crowley J, Curran WJ, Jr., Deshler A, et al. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: adjuvant therapy for breast cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst*. 2001 Jul 4;93(13):979-89.
12. Osborne CK, Schiff R. Estrogen-receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol*. 2005 Mar 10;23(8):1616-22.
13. Osborne CK, Schiff R, Arpino G, Lee AS, Hilsenbeck VG. Endocrine responsiveness: understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. *Breast*. 2005 Dec;14(6):458-65.
14. Bast RC, Jr., Ravdin P, Hayes DF, Bates S, Fritsche H, Jr., Jessup JM, et al. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. *J Clin Oncol*. 2001 Mar 15;19(6):1865-78.
15. Al-Moundhri M, Nirmala V, Al-Mawaly K, Ganguly S, Burney I, Rizvi A, et al. Significance of p53, Bcl-2, and HER-2/neu protein expression in Omani Arab females with breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2003;9(4):226-31.
16. Callagy G, Cattaneo E, Daigo Y, Happerfield L, Bobrow LG, Pharoah PD, et al. Molecular classification of breast carcinomas using tissue microarrays. *Diagn Mol Pathol*. 2003 Mar;12(1):27-34.
17. Ferrero JM, Ramaioli A, Largillier R, Formento JL, Francoual M, Ettore F, et al. Epidermal growth factor receptor expression in 780 breast cancer patients: a reappraisal of the prognostic value based on an eight-year median follow-up. *Ann Oncol*. 2001 Jun;12(6):841-6.
18. Harris AL, Nicholson S, Sainsbury JR, Farndon J, Wright C. Epidermal growth factor receptors in breast cancer: association with early relapse and death, poor response to hormones and interactions with neu. *J Steroid Biochem*. 1989;34(1-6):123-31.
19. Bottini A, Berruti A, Bersiga A, Brizzi MP, Bruzzi P, Aguggini S, et al. Relationship between tumour shrinkage and reduction in Ki67 expression after primary chemotherapy in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2001 Oct 19;85(8):1106-12.
20. Gottardi O, Tabiaddon D, Scanzi F, Bono A, Majno M, Ferrari M, et al. [Clinical and prognostic usefulness of Ki67 determination in breast carcinoma]. *Pathologica*. 1992 Nov-Dec;84(1094):15-22.

21. Lehr HA, Hansen DA, Kussick S, Li M, Hwang H, Krummenauer F, et al. Assessment of proliferative activity in breast cancer: MIB-1 immunohistochemistry versus mitotic figure count. *Hum Pathol.* 1999 Nov;30(11):1314-20.
22. Urruticoechea A, Smith IE, Dowsett M. Proliferation marker Ki-67 in early breast cancer. *J Clin Oncol.* 2005 Oct 1;23(28):7212-20.
23. Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, et al. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res.* 2006 Apr 15;12(8):2468-75.
24. Beenken SW, Grizzle WE, Crowe DR, Conner MG, Weiss HL, Sellers MT, et al. Molecular biomarkers for breast cancer prognosis: coexpression of c-erbB-2 and p53. *Ann Surg.* 2001 May;233(5):630-8.
25. Bull SB, Ozcelik H, Pinnaduwa D, Blackstein ME, Sutherland DA, Pritchard KI, et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplification is associated with poor survival in node-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2004 Jan 1;22(1):86-96.
26. Lakhani SR, Van De Vijver MJ, Jacquemier J, Anderson TJ, Osin PP, McGuffog L, et al. The pathology of familial breast cancer: predictive value of immunohistochemical markers estrogen receptor, progesterone receptor, HER-2, and p53 in patients with mutations in BRCA1 and BRCA2. *J Clin Oncol.* 2002 May 1;20(9):2310-8.
27. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandao 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.* 2005 Nov;47(5):458-66.
28. Fisher ER, Palekar A, Rockette H, Redmond C, Fisher B. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). V. Significance of axillary nodal micro- and macrometastases. *Cancer.* 1978 Oct;42(4):2032-8.

Tabela 1 - Características dos 71 casos da população em estudo

Características	n = 71
Idade	50,80 ± 11,55
Raça	
Branca	67 (94,4%)
Preta	4 (5,6%)
Idade	
< 50 anos	36 (50,7%)
> 50 anos	35 (49,3%)
Tamanho do tumor	
T1	31 (43,7%)
T2	37 (52,1%)
T3	3 (4,2%)
Linfonodos	
0	39 (54,9%)
de 01 a 03	27 (28%)
> 4	5 (7%)
Grau de Nottingham	
03 a 05	22 (31%)
de 06 a 07	25 (35,2%)
de 08 a 09	24 (33,8%)
Formação tubular	
> 75%	10 (14,1%)
de 10 a 75%	34 (47,9%)
< 10%	27 (38%)
Número de mitoses	
de 0 a 05	21 (29,6%)
de 06 a 10	12 (16,9%)
> 10	38 (53,5%)
Pleomorfismo nuclear	
núcleo pequeno e regular	13 (18,3%)
moderado aumento nuclear	40 (56,3%)
marcada variação de tamanho nuclear	18 (25,4%)
Invasão angiolinfática	
presente	20 (28,2%)
ausente	51 (71,8%)
pTNM	
T1N0M0	15 (21,1%)
T1N1M0	16 (22,5%)
T2N0M0	20 (28,2%)
T2N1M0	17 (23,95)
T3N0M0	3 (4,25)
Estadiamento	
I	15 (21,1%)
IIA	36 (50,7%)
IIB	20 (28,2%)

Dados expressos através de análises de frequência

Tabela 3 - Associação entre os subtipos moleculares e fatores histológicos

	Basal n= 15	Luminal B n =15	Luminal A n = 39	HER2 n = 2	P *
Grau de Nottingham					
3 a 5	1 (6,67%)	5 (33,33%)	16 (41,03%)	0 (0%)	0,03
6 a 7	2 (6,67%)	6 (40%)	16 (41,03%)	1 (50%)	
8 a 9	12 (80%)	4 (26,67%)	7 (17,95%)	1 (50%)	
Formação tubular					
> 75%	1 (6,67%)	1 (6,67%)	8 (20,51%)	0 (0%)	0,044
10 a 75%	4 (26,67%)	10 (66,67%)	20 (51,28%)	0 (0%)	
< 10%	10 (66,67%)	4 (26,67%)	11 (28,215)	2 (100%)	
Número de mitoses					
0 a 5	0 (0%)	5 (33,33%)	15 (38,46%)	1 (50%)	0,04
6 a 10	1 (6,67%)	3 (20%)	8 (20,51%)	0 (0%)	
> 10	14 (93,33%)	7 (46,67%)	16 (31,37%)	1 (50%)	
Pleomorfismo nuclear					
núcleo pequeno e regular	0 (0%)	2 (13,33%)	11 (28,21%)	0 (0%)	0,01
moderado aumento nuclear	6 (40%)	9 (60%)	25 (64,10%)	0 (0%)	
marcada variação de tamanho nuclear	9 (60%)	4 (26,67%)	3 (7,69%)	2 (100%)	

Dados expressos através de análises de frequência

* Teste de Qui-quadrado

Tabela 4 - Associação entre os subtipos moleculares e fatores clínicos e imunoistoquímicos

	Basal n=15	Luminal B n =15	Luminal A n = 39	HER2 n = 2	P *
Positividade para marcador					
RE	0 (0%)	15 (100%)	39 (100%)	0 (0%)	< 0,05
RP	0 (0%)	15 (100%)	39 (100%)	0 (0%)	< 0,05
HER2	0 (0%)	15 (100%)	0 (0%)	2 (100%)	< 0,05
p5	5 (33,33%)	2 (13,33%)	9 (23,08%)	1 (50%)	0,49
p63	3 (20%)	4 (26,67%)	9 (23,08%)	1 (50%)	0,82
Ki-67	4 (12,12%)	4 (12,12%)	5 (12,82%)	1 (50%)	0,35
CK8	6 (40%)	15 (100%)	30 (76,92)	0 (0%)	< 0,05
Tamanho do tumor					
T1	3 (20%)	6 (40%)	21 (53,85%)	1 (50%)	0,22
T2	10 (66,67%)	9 (60%)	17 (43,59%)	1 (50%)	
T3	2 (13,33%)	0 (0%)	1 (2,56%)		
Linfonodos					
0	7 (46,67%)	9 (60%)	21 (53,85%)	2 (100%)	0,88
1 a 3	7 (46,67%)	5 (33,33%)	15 (38,46%)	0 (0%)	
> 4	1 (6,67%)	1 (6,67%)	3 (7,69%)		
Estadiamento					
I	0 (0%)	3 (20%)	11 (28,21%)	1 (50%)	0,28
IIA	9 (60%)	9 (60%)	17 (43,59%)	1 (50%)	
IIB	6 (40%)	3 (20%)	11 (28,21%)		

Dados expressos através de análises de frequência

* Teste de Qui-quadrado

Tabela 5 - Associação entre os subtipos moleculares e desfechos

	Basal n= 15	Luminal B n =15	Luminal A n = 39	HER2 n = 2	P
Recorrência					
não	13 (86,67%)	9 (60%)	26 (66,67%)	2 (100%)	0,28*
sim	2 (13,33%)	6 (40%)	13 (33,33%)	0 (0%)	
Tipo de recorrência					
locorregional	1 (6,67%)	1 (6,67%)	5 (12,82%)	0 (0%)	0,54*
óssea	0 (0%)	1 (6,67%)	5 (12,82%)	0 (0%)	
pulmonar	1 (6,67%)	2 (33,3%)	0 (0%)	0 (0%)	
hepática	0 (0%)	0 (0%)	2 (2,56%)	0 (0%)	
cerebral	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)	
pulmonar e hepática	0 (0%)	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)	
óssea e pulmonar	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	
perda de seguimento	0 (0%)	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	
Tempo entre diagnóstico e recorrência					
	3 ± 2,65	4,40 ± 1,82	4,46 ± 2,03	0	0,54**
Óbito					
sim	1 (6,67%)	2 (13,33%)	2 (5,13%)	0 (0%)	0,64*
não	13 (86,67%)	12 (80%)	37 (94,87%)	2 (100%)	
perda de seguimento	1 (6,67%)	1 (6,67%)	0 (0%)	0 (0%)	

Dados expressos através de análises de frequência

* Teste de Qui-quadrado

** Anova

Tabela 6 - Associação entre estado dos linfonodos e desfechos

desfecho/linfonodos	0 n= 39	1 – 3 n = 27	> 4 n= 5	P
Recorrência local				0,08*
sem recorrências	0 (0%)	0 (0%)	1 (20%)	
sim	7 (17,95%)	0 (0%)	0 (0%)	
outras	4 (21,05%)	6 (22,22%)	4 (80%)	
Óbito				0,13*
sim	0 (0%)	4 (14,81%)	1 (20%)	
não	38 (97,44%)	22 (81,48%)	3 (80%)	
perda de seguimento	1 (2,56%)	1 (3,70%)	0 (0%)	

Dados expressos através de análises de frequência

* Teste de Qui-quadrado

Análise de sobrevida – intervalo livre de doença

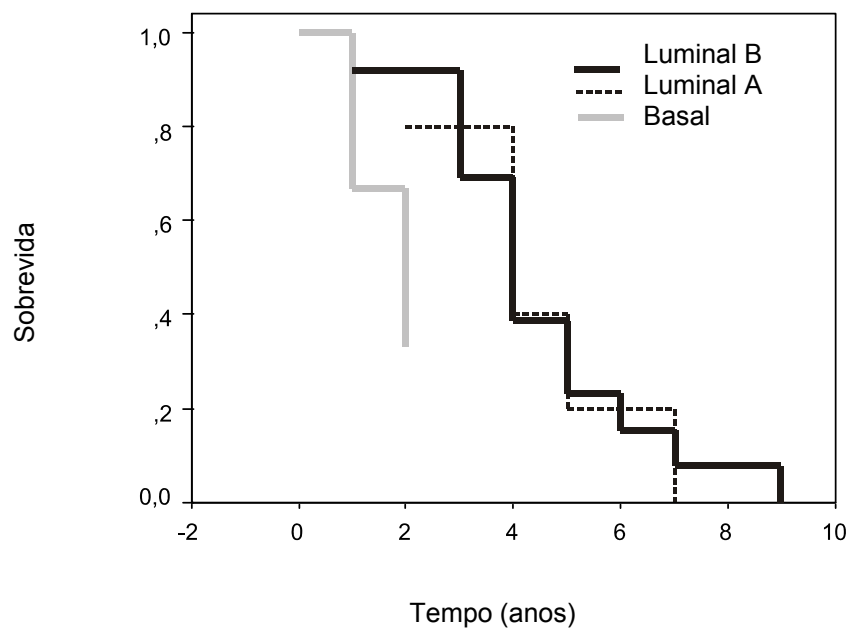


Gráfico 1 - Tempo para a recorrência conforme perfil molecular

Anexo 1- Ficha para coleta de dados

**VALOR PROGNÓSTICO E PREDITIVO DOS MARCADORES IMUNOISTOQUÍMICOS NO
CARCINOMA INVASOR DE MAMA**

FICHA PARA COLETA DOS DADOS

Ficha Número

ATENÇÃO: Pacientes com tumores estádios I (T1N0M0), IIA (T0N1M0/ T1N1M0/ T2N0M0) e IIB (T2N1M0/ T3N0M0)

NOME: _____ **PRONTUÁRIO:** _____

Data de nascimento: _____

Cor: branca preta parda Sexo: feminino

Peso: _____ Altura: _____ IMC: _____

História familiar CA de mama: mãe irmã(s) filha(s)

História familiar CA de ovário e/ou outros _____ sim não

Idade menarca: _____ anos Idade menopausa: _____ anos

Uso de contraceptivo oral: sim não

Uso de TH: sim não E isolado E + P Tempo de uso: _____ anos

Paridade: G ___ A ___ P ___ Idade primeira gestação: _____ anos

Amamentou: sim não Soma dos meses amamentando: _____ meses

DATA DO DIAGNÓSTICO: _____

Local CA – Mama: Direita Esquerda

QSE QIE QSI QII Central não-determinado

DATA DA CIRURGIA: _____

Cirurgia: MRM Setor + EA Hemimastectomia + EA

RECONSTRUÇÃO no mesmo tempo cirúrgico: sim não

Sim → TRAM GRANDE DORSAL com prótese sem prótese

LAUDO EXAME ANATOMOPATOLÓGICO: Número AP: _____

Tamanho do tumor invasor: _____ mm

Tipo histológico: CARCINOMA DUCTAL INVASOR

Com extenso componente intraductal Com Doença de Paget

Invasão angiolímfática: sim não indeterminada

Grau histológico (Nottingham ou outro sistema de graduação – especificar: _____)

Grau 1 Grau 2 Grau 3 Grau não pode ser determinado

Distância da margem mais próxima: _____ mm Nos linfonodos: Total _____ / Com metástase _____

pTNM: pT ___ pN ___ pM ___ Estádio _____

TTO COMPLEMENTAR:

Radioterapia QT Adjuvante QT Neoadjuvante Hormonioterapia

RECORRÊNCIA: sim não Data: _____

Locorregional Metástase óssea pulmonar hepática cerebral

ÓBITO: sim não Data: _____ Causa: _____

Anexo 2- Ficha de avaliação dos achados histopatológicos

Protocolo aplicado para carcinoma de mama invasor (Baseado na 6. ed. AJCC/UICC, jan 2003)

Protocolo CAP (College of American Pathologists)

MICROSCOPIA

N. Prontuário: _____

N. Ficha: _____

Tipo histológico

- Carcinoma ductal invasor
- Carcinoma ductal invasor com extenso componente intraductal
- Carcinoma ductal invasor com Doença de Paget

6 a 10 mitoses por 10 HPF* (score 2)

10 mitoses por 10 HPF (score 3)

Grau total de Nottingham: Grau I: 3 – 5 pontos

Grau II: 6 - 7 pontos

Grau III: 8 – 9 pontos

Grau não pode ser determinado

Grau histológico

(Nottingham Histologic Score)

Formação tubular

> 75% do tumor (score 1)

10 a 75% (score 2)

< 10% do tumor(score 3)

Invasão angiolinfática

Ausente

Presente

Indeterminada

Pleomorfismo nuclear

Núcleo pequeno e regular (score 1)

Moderado aumento de tamanho (score2)

Marcada variação do tamanho, nucléolo, cromatina, etc (score 3)

Número de mitoses (*HPF = high power fields)

(Para uma objetiva 25x com uma área de 0,274mm²)

< 10 mitoses por 10 HPF* (score 1)

10 a 20 mitoses por 10 HPF* (score 2)

20 mitoses por 10 HPF (score 3)

OU

(Para uma objetiva 40x com uma área de 0,152mm²)

0 a 5 mitoses por 10 HPF* (score 1)

Microcalcificações

Não- identificadas

Presente no CDIS

Presente no carcinoma invasor

Presente no tecido não-neoplásico

Presente tanto no tecido tumoral como não-neoplásico

OBSERVAÇÕES
