



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MAGNO BELÉM CIRQUEIRA

**SUBCLASSIFICAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA DE
CARCINOMAS DUCTAIS DE MAMA DO HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS NO
PERÍODO DE 2003 A 2007**

**Goiânia
2011**

MAGNO BELÉM CIRQUEIRA

**SUBCLASSIFICAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA DE
CARCINOMAS DUCTAIS DE MAMA DO HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS NO
PERÍODO DE 2003 A 2007**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás para obtenção do Título de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Profa. Dra. Marise Amaral Rebouças Moreira
Co-Orientador: Prof. Dr. Ruffo de Freitas Júnior

**Goiânia
2011**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
GPT/BC/UFG**

C578s Cirqueira, Magno Belém.
Subclassificação por imunoistoquímica de carcinomas ductais de mama do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás no período de 2003 a 2007 [manuscrito] / Magno Belém Cirqueira. - 2011.
xv, 85 f. : il., figs, tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Marise Amaral Rebouças Moreira;
Co-orientador: Prof. Dr. Ruffo de Freitas Júnior.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2011.

Bibliografia.

Inclui lista de figuras, abreviaturas, siglas e tabelas.

Anexos.

1. Mama – Câncer de. 2. Câncer de mama – Hospital das Clínicas – Goiás (Estado).

CDU: 618.19-006(817.3)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluno: MAGNO BELÉM CIRQUEIRA

Orientadora: PROFA. DRA. MARISE AMARAL REBOUÇAS MOREIRA

Co-Orientador: PROF. DR. RUFFO DE FREITAS JÚNIOR

Membros:

1. DRA. MARISE AMARAL REBOUÇAS MOREIRA

2. DRA. ROSEMAR MACEDO SOUSA RAHAL

3. DR. RÉGIS REZENDE PAULINELLI

OU

4. DR. DÉLIO MARQUES CONDE

Data: 18/ 11/ 2011

Dedico este trabalho...

À minha mãe Maria Belém, que passou por muitas dificuldades nesta vida, sendo um exemplo de persistência e de caráter. Obrigado por estar comigo desde SEMPRE, pelo zelo, pelo carinho, pela educação me ensinada, pelo amor incondicional e por me ensinar a fé em DEUS. Obrigado minha querida e amada Mãe!

Ao meu pai Sebastião Martins Cirqueira (in memoriam), um exemplo de garra, de honestidade, de trabalho e de solidariedade. Sempre, sempre nos incentivou em nossos estudos, meus e de meus irmãos, apoiando tudo o que fosse necessário e enriquecedor. Orgulho-me de ter tido o senhor como meu Pai. Espero que aí do céu o senhor possa estar acompanhando tudo isso. Muitas saudades de você Meu Pai, Muitas! Esta conquista não existiria sem o senhor! Obrigado meu Pai herói!

Aos meus irmãos, Anderson, Cristiano, Norton, Naira e Iolanda. Vocês representam muito em minha vida. Cada um tem um papel todo especial e sem vocês, certamente, as coisas seriam muito mais difíceis do que são. Amo muito vocês! Obrigado a vocês e aos seus: Liliانا, Rodrigo, Najla e Bartolomeu.

À minha namorada Carolina. Obrigado pelo companheirismo, os sonhos compartilhados e a confiança em minhas escolhas. Você é um tesouro precioso que Deus me deu. Continue perseverando, pois a colheita duradoura dos frutos virá após a dura plantação. Obrigado por estar ao meu lado. Amo você!

A todos os meus preciosos familiares, pessoas indispensáveis em minha existência, incluindo meus padrinhos Sebastião e Alice, e Aldemar e Isabel, que também são exemplos de pessoas corretas e dignas que me apoiam em minha caminhada.

AGRADECIMENTOS

*Agradeço primeiramente a **DEUS**. Sem ELE nada disso existiria. Agradeço até mesmo as angústias e preocupações. Obrigado Senhor e Nossa Senhora, pelas bênçãos alcançadas e por toda a proteção, a saúde e a esperança de que tudo iria dar certo, tornando essa realização possível. Obrigado pela oportunidade de ajudar o próximo através da minha profissão.*

À Profa. Dra. Marise Amaral Rebouças a oportunidade e o apoio no desenvolvimento deste trabalho. Obrigado por todo o tempo que foi necessário para a execução desta pesquisa e pelo o seu empenho. Obrigado por contribuir com o meu crescimento profissional e pessoal.

Ao meu Co-Orientador, Dr. Ruffo de Freitas Júnior, o apoio na idealização e na construção deste projeto.

Ao acadêmico e bolsista Leonardo Ribeiro a imensurável ajuda nesta dissertação, em especial, na coleta e na construção do banco de dados.

A toda equipe do Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas, Funcionários, Chefia, Gerência, Professores e Residentes, pessoas competentes sem as quais não existiria o ambiente onde foi desenvolvido este projeto. Em especial, à Dra. Maria Auxiliadora e à Dra. Maria Helena pela importante participação neste estudo.

Aos amigos e aos colegas de trabalho. Obrigado pela amizade e por todos os momentos dessa nossa caminhada!

Ao Dr. Fernando Augusto Soares e técnicos do Hospital do Câncer A.C.Camargo, em especial ao Carlos Ferreira Nascimento. Obrigado pela atenção e presteza, com que os microarranjos de tecidos desta pesquisa foram construídos.

Ao corpo docente do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde. Obrigado pelo conhecimento repassado, pela importância e pela beleza de seu trabalho. Suas experiências transmitidas são fundamentais para a formação de bons pesquisadores.

À Valdecina e à Raquel, do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Goiás, a atenção, a paciência e o empenho.

Aos Professores da banca de qualificação: Dr. Celmo Celeno Porto, Dra. Rosemar Macedo Sousa Rahal e Dr. Régis Rezende Paulinelli pelos comentários e sugestões para o aprimoramento desta pesquisa.

A todas as pacientes que foram parte deste projeto. Que o conhecimento aqui gerado possa se multiplicar e ajudar a todos aqueles que necessitam de atendimento em saúde, em especial no Hospital das Clínicas da UFG.

A todos aqueles que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho e para o meu desenvolvimento profissional e pessoal.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Patologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, com o apoio financeiro da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Goiás – FAPEG – no formato bolsa de estudos.

“Não sei se a vida é curta ou longa para nós, mas sei que nada do que vivemos tem sentido, se não tocarmos o coração das pessoas. Muitas vezes basta ser: colo que acolhe, braço que envolve, palavra que conforta, silêncio que respeita, alegria que contagia, lágrima que corre, olhar que acaricia, desejo que sacia, amor que promove. E isso não é coisa de outro mundo, é o que dá sentido à vida. É o que faz com que ela não seja nem curta, nem longa demais, mas que seja intensa, verdadeira, pura enquanto durar”.

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

Cora Coralina

SUMÁRIO

SUMÁRIO	X
FIGURAS, TABELAS E QUADROS	XII
SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS	XIII
APRESENTAÇÃO	XIV
RESUMO	XV
ABSTRACT	XVI
1. INTRODUÇÃO.....	1
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	2
2.1. INTRODUÇÃO.....	2
2.2. ASPECTOS GERAIS.....	3
2.2.1. Câncer de Mama.....	3
2.2.2. Epidemiologia.....	4
2.2.3. Fatores de Risco.....	7
2.2.4. Fatores Prognósticos e Fatores Preditivos.....	8
2.3. MARCADORES MOLECULARES	11
2.3.1. Receptores Hormonais.....	11
2.3.2. Receptor do fator epidérmico tipo 2 (HER2)	13
2.3.3. Antígeno Ki-67	14
2.3.4. Citoceratina 5.....	15
2.3.5. Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR).....	16
2.4. SUBTIPOS MOLECULARES.....	17
2.4.1. Subtipo Luminal A	18
2.4.2. Subtipo Luminal B.....	19
2.4.3. Superexpressão de HER2.....	20
2.4.4. Basaloide	21
2.4.5. Mama-Normal Símile.....	23
2.4.6. Claudin-low	23
2.5. MICROARRANJO DE TECIDOS	24
JUSTIFICATIVA	25

3. OBJETIVOS	26
3.1. OBJETIVO GERAL	26
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	26
4. METODOLOGIA.....	27
4.1. ASPECTOS ÉTICOS	27
4.2. CASUÍSTICA	27
4.3. TAMANHO DA AMOSTRA.....	28
4.4. PACIENTES E METODOS	29
4.4.1. Critérios de inclusão.....	29
4.4.2. Critérios de exclusão.....	29
4.4.3. Construção dos microarranjos de tecidos	30
4.4.4. Imunoistoquímica	31
4.4.5. Análise dos dados.....	35
5. PUBLICAÇÕES.....	36
ARTIGO 1	37
ARTIGO 2	54
7. CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO	72
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	73
REFERÊNCIAS	74
ANEXOS.....	82
ANEXO 1. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	83
ANEXO 2. NORMAS PARA PUBLICAÇÃO DA REVISTA FEMINA.....	84

FIGURAS, TABELAS E QUADROS

Figura 1	Incidência estimada de câncer de mama no mundo em 2008.....	05
Figura 2	Incidência e mortalidade por câncer de mama no mundo em 2008. Taxas padronizadas por idade, estimadas (Mundial) por 100.000.....	05
Figura 3	Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da mama feminina).....	06
Figura 4	Construção do bloco de microarranjos de tecido contendo 278 amostras de carcinoma ductal invasor de mama.....	31
Figura 5	Microtomia, imunoistoquímica e visualização ao microscópio óptico dos marcadores quando positivos.....	35
Tabela 1	Estimativas para o Brasil ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.....	06
Tabela 2	Estimativas para o Estado de Goiás e Goiânia ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.....	07
Quadro 1	Quadro comparativo entre a utilização da imunoistoquímica convencional (no fragmento inteiro) e com o auxílio de microarranjos de tecido (TMA), quando em trabalhos de pesquisa.....	24
Quadro 2	Resumo sobre os anticorpos empregados neste estudo.....	32
Quadro 3	Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.....	34

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BRCA1	Gene do câncer de mama tipo 1
BRCA2	Gene do câncer de mama tipo 2
CAP	Colégio Americano de Patologistas
cDNA	Ácido desoxirribonucleico complementar
c-erbB-2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
CK	Citoceratina ou citoqueratina
EGFR	Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico
FISH	Hibridização fluorescente “in situ”
FM/UFG	Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Goiás
HC/UFG	Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás
HER1	Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico
HER2	Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IIQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
Ki-67	Antígeno Ki-67 – marcador de proliferação celular
n	Número de casos
p	Valor-p
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> - Tampão fosfato salino
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SERM	Moduladores de receptores de estrógeno
TMA	Microarranjos de tecido (<i>tissue microarrays</i>)
TTN	Tumores triplo-negativos
UFG	Universidade Federal de Goiás
WHO	<i>World Health Organization</i>

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação de mestrado foi elaborada na modalidade de Artigos Científicos, um modelo alternativo, opcional e que está de acordo com as normas deste Programa de Pós-Graduação. No capítulo “Resultados” são apresentados dois artigos científicos.

O primeiro artigo apresentado foi intitulado “Subtipos Moleculares do Câncer de Mama”. É um artigo de revisão que comenta tópicos a respeito dos subtipos moleculares do câncer de mama e suas principais características, incluindo, os aspectos prognósticos, os fatores preditivos e os marcadores utilizados na classificação molecular por imunohistoquímica.

No segundo artigo, um artigo original intitulado “Subtipos Moleculares do Câncer de Mama: Influência do Ki-67 na Classificação”, nós avaliamos a influência da inclusão do Ki-67 no contexto da classificação molecular por imunohistoquímica.

RESUMO

Essa dissertação teve como objetivo estudar o câncer de mama com ênfase nos subtipos moleculares. No contexto teórico, aspectos importantes a respeito do tema foram revisados, incluindo, os aspectos prognósticos, os fatores preditivos e os marcadores moleculares utilizados na classificação por imunohistoquímica. No contexto prático, a prevalência dos subtipos moleculares foi avaliada em uma série de pacientes com carcinoma ductal invasor de mama, utilizando dois diferentes painéis de classificação por imunohistoquímica, com e sem o uso do marcador de proliferação Ki-67. Foi avaliada a concordância entre os resultados obtidos pelos dois modelos de classificação (reprodutibilidade entre os modelos), correlacionando os subtipos encontrados com as características clínico-patológicas dos tumores. Dois artigos científicos foram redigidos: um artigo de revisão, construído a partir das bases de dados MEDLINE/ PubMed, LILACS e SciELO, com tópicos relevantes a respeito dos subtipos moleculares do câncer de mama e sua classificação por imunohistoquímica; e um artigo original, onde um estudo com 234 casos de carcinoma ductal invasor de mama foi conduzido, conforme os objetivos já citados. Uma significativa mudança dos percentuais dos tumores luminais foi observada com o uso do Ki-67 e uma significativa correlação com o grau histológico.

ABSTRACT

This dissertation aimed to study the breast cancer with emphasis on the molecular subtypes. In the theoretical context, important aspects on the subject were reviewed, including prognostic aspects, predictive factors and molecular markers used in the classification by immunohistochemistry. In the practical context, the prevalence of the molecular subtypes was evaluated in a series of patients with invasive ductal breast carcinoma, using two different panels of classification by immunohistochemistry, with and without the use of proliferation marker Ki-67. We evaluated the agreement between the results obtained by the two classification models, correlating the subtypes found with the clinicopathological characteristics of tumors. Two papers were prepared, a review article, from the MEDLINE/ PubMed, LILACS and SciELO database with relevant topics about the molecular subtypes of the breast cancer and their classification by immunohistochemistry; and an original article, in which a study with 234 cases of invasive ductal carcinoma of the breast was conducted, according to the objectives previously mentioned. A significant change in the percentage of luminal tumors was observed with the use of the Ki-67, and a significant correlation with the histological grade.

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas (CIANFROCCA *et al.*, 2009; GEYER *et al.*, 2009; WEIGELT *et al.*, 2009). Essas diferenças podem ser justificadas pela existência de diversos subtipos moleculares de carcinoma de mama, os quais originam distintas entidades biológicas, a exigir terapêutica específica. Esta complexidade torna difícil a definição de condutas clínicas, podendo por vezes propiciar tratamentos inadequados (PEROU *et al.*, 2000; ROUZIER *et al.*, 2005).

Os avanços no campo da biologia molecular e a descoberta de proteínas especializadas tais como, os receptores hormonais e os fatores de crescimento epidérmicos, têm proporcionado um maior entendimento sobre a oncogênese (ZHANG *et al.*, 2003). O advento da tecnologia de microarranjos de DNA complementar (*cDNA microarrays*), com a análise paralela de milhares de genes, tem permitido correlacionar perfis moleculares de expressão gênica dos cânceres de mama com a evolução clínica das pacientes e com as respostas às terapias utilizadas (RAKHA *et al.*, 2008).

Diferentes subtipos moleculares foram determinados estratificando-se os tumores mamários através de seus perfis gênicos. Isso propiciou uma maior compreensão e uma melhor utilização de marcadores tumorais já existentes na anatomopatologia tradicional, permitindo o uso da imunohistoquímica na classificação dos tumores (ZHANG *et al.*, 2003). Essas descobertas têm

proporcionado importantes informações prognósticas e preditivas e uma melhor percepção sobre os complexos mecanismos biológicos da tumorigênese (GEYER *et al.*, 2009).

Painéis imunoistoquímicos têm sido propostos para a identificação dos subtipos moleculares, buscando reproduzir com certa aproximação os perfis de expressão gênica (NIELSEN *et al.*, 2004; BHARGAVA *et al.*, 2008). Uma das lacunas da classificação por imunoistoquímica é a ausência de uma avaliação do grau de proliferação dos tumores com um protocolo bem estabelecido. Isso faz com que sejam agrupados como luminal A tumores com alta e baixa expressão de genes de proliferação. Com isso, pacientes que iriam se beneficiar da quimioterapia, por vezes, podem não estar recebendo esse tratamento (CHEANG *et al.*, 2009).

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade, médicos e estudiosos têm tentado encontrar respostas para a origem do câncer de mama e seu manejo. A mais antiga descrição do câncer de mama foi encontrada no Egito e datada de cerca de 1600 a.C.. Através dos tempos, com os adventos da anestesia geral e do uso da antissepsia, foram viabilizados tratamentos cirúrgicos, como a mastectomia radical. Essa evolução passou pela radioterapia, que é outra forma de tratamento locorregional, até as formas de tratamento sistêmico, como, a quimioterapia e as atuais terapias alvo-dirigidas (EKMEKTZOGLOU *et al.*, 2009).

2.2. ASPECTOS GERAIS

2.2.1. Câncer de Mama

"Câncer" é o termo utilizado para designar as diversas entidades provindas do acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e mudanças epigenéticas. Essas alterações, em conjunto, facilitam o aumento da taxa de evolução e dano celular, e progressivamente prejudicam o detalhado e complexo sistema de regulação do crescimento e de morte das células. Fatores exógenos que podem promover mudanças nas atividades dos genes, como a dieta, combinados com as variações genéticas de cada indivíduo são alguns motivos para se esperar que os tumores se manifestem fenotipicamente diferentes (SØRLIE, 2004).

A mama é composta por estruturas glandulares (lóbulos e ductos), responsáveis pela produção de leite sob o controle hormonal. Essas estruturas são circundadas por tecidos fibrovascular e adiposo, que fornecem nutrição e proteção aos mesmos. Os lóbulos mamários são as unidades funcionais da mama que sintetizam o leite e que se encontram no final dos ductos. Os ductos são uma rede de canais cuja função é o transporte de leite dos ácinos até o mamilo (GUINEBRETIERE *et al.*, 2005). A vasta maioria dos tumores malignos de mama é iniciada no epitélio da unidade duto-lobular terminal, outros 5 a 10% são originários de linhagem não epitelial. Dentre os inúmeros tipos histológicos de câncer de mama identificados, um em especial, o carcinoma ductal invasor, é largamente predominante e representa mais de 75% dos casos (RAKHA *et al.*, 2010a).

2.2.2. Epidemiologia

Notadamente, os tumores de mama são um problema de saúde pública pela sua alta incidência e por ser a neoplasia responsável pela maior taxa de mortalidade feminina, por câncer, em vários países (MARTINS *et al.*, 2009; BRASIL, 2011). Dados mundiais revelam que o carcinoma de mama é o segundo tipo de câncer mais incidente entre as mulheres, além de demonstrar aumento crescente no número de casos. Anualmente, cerca de 22% dos casos novos de câncer, em mulheres, pertencem a esse tipo de neoplasia (PARKIN *et al.*, 2005; KAMANGAR *et al.*, 2006; FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2008; BRASIL, 2011).

Apesar de esses números serem em sua maioria observados em países desenvolvidos (figura 1), no Brasil encontram-se significativas taxas de incidência, onde em 2011 estimou-se um risco de 49 casos a cada 100 mil mulheres, perfazendo cerca de 49.240 casos novos (tabela 1). Na região Centro-Oeste do Brasil e em Goiânia (figura 3, tabela 2), é também o segundo tipo de câncer mais prevalente em mulheres, atrás apenas do câncer de pele do tipo não melanoma (BRASIL, 2011).

O câncer de mama, apesar de sua alta complexidade, tem um prognóstico relativamente bom quando diagnosticado e tratado em tempo oportuno. Porém, no Brasil, as taxas de mortalidade por essa patologia se mantêm altas (figura 2), muito provavelmente devido ao fato de a doença ainda ser diagnosticada em estágio clínico (extensão do tumor ao diagnóstico) avançado (FREITAS-JUNIOR *et al.*, 2010; BRASIL, 2011).

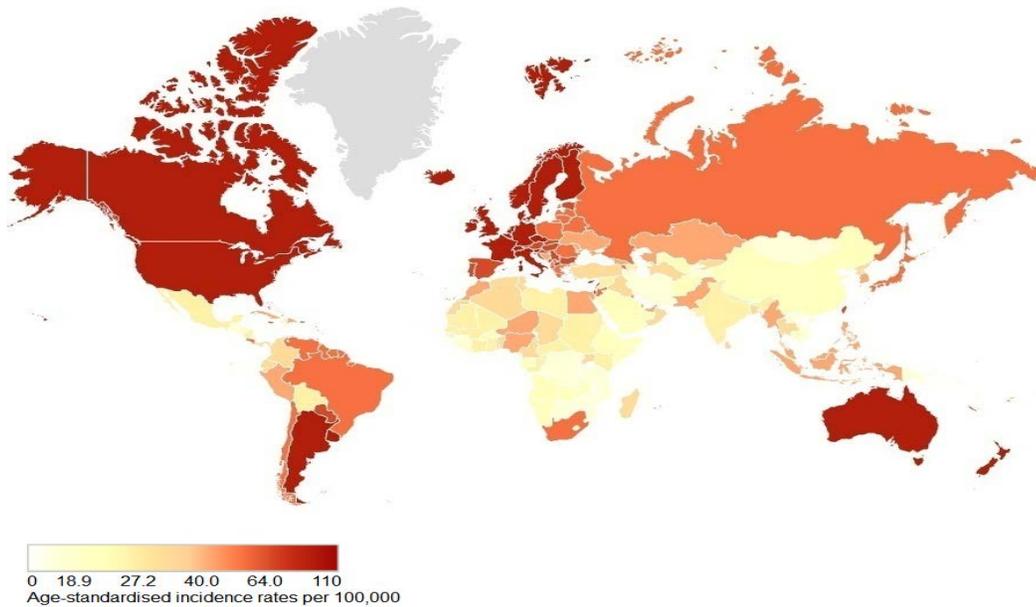


Figura 1. Incidência estimada de câncer de mama no mundo em 2008. (Fonte: GLOBOCAN 2008, *International Agency for Research on Cancer*. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>. Acessado em 02 de abr. 2011).

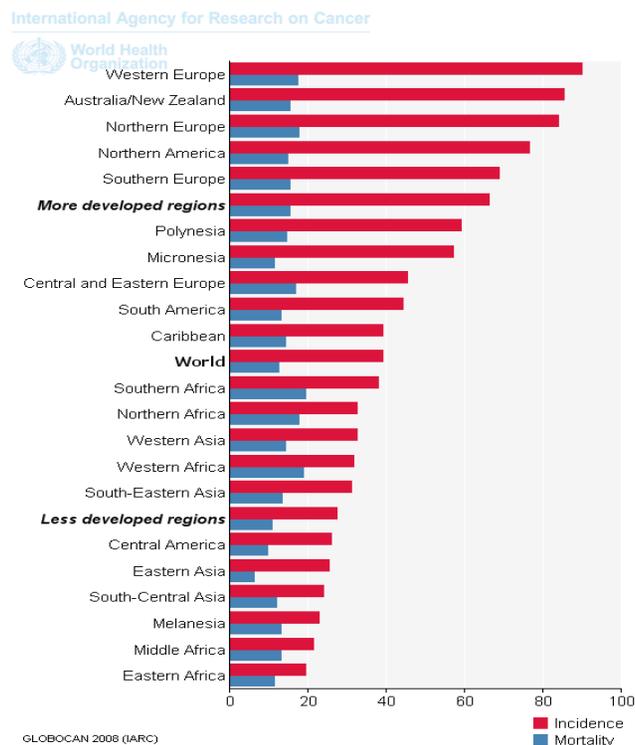


Figura 2. Incidência e mortalidade por câncer de mama no mundo em 2008. Taxas padronizadas por idade, estimadas (Mundial) por 100.000. (Fonte: GLOBOCAN 2008, *International Agency for Research on Cancer*. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr/factsheets/cancers/breast.asp>. Acessado em 02 de abr. 2011).

Mulheres

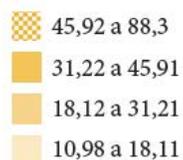


Figura 3. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2011, segundo a Unidade da Federação (neoplasia maligna da mama feminina). Fonte: INCA (BRASIL, 2011).

Tabela 1. Estimativas para o Brasil ano 2011 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária*. Fonte: INCA (BRASIL, 2011).

Brasil

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traqueia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
Subtotal	192.590	192,74	66.270	282,03
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
Todas as Neoplasias	253.030	253,23	79.070	336,52

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 10 de jan. 2011 (BRASIL, 2011).

Tabela 2. Estimativas para o Estado de Goiás e Goiânia ano 2011 das taxas brutas de incidência por 100 mil e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária. Fonte: INCA (BRASIL, 2011).

Goiás e Goiânia

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	1.070	34,44	360	51,87
Colo do Útero	540	17,58	160	22,41
Cólon e Reto	330	10,53	130	18,67
Traqueia, Brônquio e Pulmão	300	9,65	80	11,86
Estômago	170	5,39	50	7,16
Leucemias	120	3,81	40	5,83
Cavidade Oral	110	3,50	40	5,14
Pele Melanoma	40	1,30	**	2,01
Esôfago	50	1,79	**	1,98
Outras Localizações	1.110	35,90	610	86,60
Subtotal	3.840	124,19	1.490	211,54
Pele não Melanoma	2.550	82,59	390	55,64
Todas as Neoplasias	6.390	206,70	1.880	266,71

*Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

**Menor que 15 casos

Fonte: Instituto Nacional de Câncer do Ministério da Saúde. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 10 de jan. 2011 (BRASIL, 2011).

2.2.3. Fatores de Risco

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma mamário relacionados à vida reprodutiva da mulher estão bem estabelecidos, como: menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, uso de anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal. A exposição aos agentes cancerígenos e a história familiar da doença também são importantes fatores (KAMANGAR *et al.*, 2006). Acredita-se que outros fatores de risco, incluindo, obesidade, dietas ricas em gorduras e ingestão excessiva de álcool, possam aumentar o risco de desenvolvimento da doença. No entanto, o maior fator de risco é, de modo

geral, a idade. Com o envelhecimento, geralmente a partir dos 35 anos e até cerca dos 50 anos, tem-se um rápido aumento nas taxas de incidência de câncer de mama feminino. Após essa idade, correlacionando-se à provável ocorrência da menopausa, a taxa de crescimento acontece de forma mais lenta (BRASIL, 2011).

O câncer de mama esporádico (não hereditário) constitui mais de 90% de todos os carcinomas de mama, porém, características genéticas também estão associadas ao maior risco de desenvolvimento do tumor de mama (BRASIL, 2011). Mulheres com mutações nos genes *BRCA1* e *BRCA2* têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade e perfazem até 10% dos casos desta neoplasia em países desenvolvidos. Entretanto, a tumorigênese é cada vez mais reconhecida como um processo que envolve a ação coordenada de um grupo de genes, ao invés de genes únicos (ZHANG *et al.*, 2003; PARKIN *et al.*, 2005; BRASIL, 2011).

2.2.4. Fatores Prognósticos e Fatores Preditivos

Os diferentes tipos de câncer de mama são avaliados universalmente para o manejo clínico das pacientes segundo dois importantes fatores denominados prognósticos e preditivos. Fatores prognósticos são características mensuráveis que se correlacionam com a história natural da doença; são observados no momento do diagnóstico e visam estimar a evolução clínica, a sobrevida global e o tempo livre da doença (ABREU *et al.*, 2002). São consideradas variáveis independentes. Enquanto, os fatores

preditivos são características associadas à resposta esperada a uma determinada terapia. E neste contexto, fatores prognósticos devem ser distinguidos de fatores preditivos. Alguns fatores podem ser ao mesmo tempo prognósticos e preditivos, como os receptores hormonais e a amplificação e/ou superexpressão dos receptores tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2) (CIANFROCCA *et al.*, 2004).

As principais razões para a utilização dos fatores prognósticos e preditivos são: 1) identificar pacientes com um bom prognóstico, para as quais a terapia sistêmica adjuvante não fornece benefícios suficientes para justificar os riscos; 2) identificar pacientes cujo prognóstico é ruim o suficiente para justificar uma abordagem adjuvante mais agressiva; 3) selecionar pacientes cujos tumores são mais ou menos susceptíveis aos benefícios esperados das diferentes formas de terapia (CIANFROCCA *et al.*, 2004).

Até recentemente, os tumores de mama eram classificados utilizando-se de fatores prognósticos tradicionais, tais quais: envolvimento linfonodal regional, tamanho do tumor, tipo e grau histológicos, e estadiamento da doença, os quais isoladamente permitem uma previsão da evolução clínica da doença ou da sobrevida das pacientes no momento do diagnóstico inicial, mas que têm limitada capacidade preditiva (WEIGEL *et al.*, 2010).

Um dos fatores prognósticos independentes mais importantes no câncer de mama em estágio inicial é a presença ou ausência de comprometimento dos linfonodos axilares. Ele é determinante na avaliação de risco, sendo preditor de sobrevida livre da doença e de sobrevida global, e influenciando nas decisões terapêuticas (FITZGIBBONS *et al.*, 2000). Apenas 20% a 30 % das pacientes

sem envolvimento linfonodal irão desenvolver recorrência no período de 10 anos, comparados com cerca de 70% das pacientes com metástases axilares. O número absoluto de linfonodos envolvidos é também de importância prognóstica; pacientes com quatro ou mais linfonodos envolvidos têm um prognóstico pior do que aquelas com um número menor linfonodos positivos (GOLDHIRSCH *et al.*, 2005).

Quanto à recorrência axilar, acredita-se que esta possa ocorrer devido a metástases que não foram detectadas nos métodos de rotina em avaliações prévias. A literatura mostra que a taxa de linfonodos axilares falso-negativos varia de 5 a 10%, gerando assim um subestadiamento dessas pacientes (QUADROS *et al.*, 2007).

As condições dos receptores de estrogênio (RE) e dos receptores de progesterona (RP) começaram a ter sua significância prognóstica estabelecida na segunda metade dos anos 70. Eles eram determinados inicialmente através de teste bioquímico com carvão revestido por dextran, até que em meados dos anos 80, demonstrando maior poder discriminatório do que a bioquímica, foi validado o uso da imunistoquímica (IHQ) para a detecção nuclear desses receptores hormonais (BHARGAVA *et al.*, 2008b). A avaliação imunistoquímica do *status* hormonal tem demonstrado ter valor preditivo de sobrevida global e de sobrevida livre da doença (WEIGEL *et al.*, 2010).

Posteriormente introduziu-se a avaliação de fatores como o índice mitótico e a amplificação e/ou superexpressão de HER2 (REIS-FILHO *et al.*, 2008). Desde o advento de anticorpos aplicáveis a tecidos fixados em formol e embebidos em parafina, muitos marcadores moleculares prognósticos e

preditivos foram testados. No entanto, até então, apenas os receptores hormonais de estrogênio e de progesterona e o HER2 foram consolidados como marcadores clínicos de valor prognóstico para uso rotineiro no tratamento do câncer da mama. Com o desenvolvimento de terapias alvo-específicas para os marcadores moleculares, o RE e o HER2 tornaram-se ainda mais importantes, sendo os únicos fatores preditivos associados a essas terapias (REIS-FILHO *et al.*, 2006; CHEANG *et al.*, 2009). Entretanto, os indicadores citados são ainda insuficientes para individualizar biologicamente todos os casos, uma vez que, pacientes com indicadores semelhantes apresentam desfechos clínicos diferentes (REIS-FILHO *et al.*, 2008).

2.3. MARCADORES MOLECULARES

2.3.1. **Receptores** Hormonais

Os receptores hormonais são um dos mais valiosos marcadores prognósticos e preditivos para os tumores mamários (LAKHANI *et al.*, 2002). São habitualmente expressos em tecido de mama normal. Quando positivos em células neoplásicas, conferem melhor prognóstico, sendo inversamente relacionados ao grau tumoral, ao subtipo histológico e ao nível de proliferação celular (OSBORNE *et al.*, 2005). Isso se deve ao fato de que células tumorais que apresentam expressão dos receptores de estrógeno e de progesterona, potencialmente, se aproximam mais, biologicamente, das células mamárias normais (EIFEL *et al.*, 2001).

Os receptores hormonais têm seus resultados expressos a partir da quantificação do percentual aproximado de células neoplásicas com imunomarcações nucleares. Recomendações do Colégio Americano de Patologistas (CAP) em conjunto com a Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) foram publicadas com orientações a respeito dos testes imunohistoquímicos para a detecção dos receptores de estrogênio e de progesterona no câncer de mama. Segundo estas recomendações, devem ser considerados positivos os casos da amostra em teste que apresentarem pelo menos 1% das células tumorais com imunomarcação nuclear, com a presença de reatividade esperada dos controles internos (elementos epiteliais normais) e dos controles externos (HAMMOND *et al.*, 2010).

Pacientes positivos para receptores hormonais quando tratados com tamoxifeno, como terapia adjuvante, tiveram seus riscos de recorrência ou de morte reduzidos em 30%; entretanto, muitas pacientes com receptores estrogênicos positivos e linfonodos positivos tiveram benefício mínimo com a quimioterapia adjuvante (CHEANG *et al.*, 2009). Ressalta-se que os perfis luminais são os mais prevalentes entre os subtipos moleculares, e apresentam melhor prognóstico quando comparados aos dos demais subgrupos (SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE *et al.*, 2003).

2.3.2. Receptor do fator epidérmico tipo 2 (HER2)

A oncoproteína HER2 é uma proteína de membrana celular comum em células epiteliais. É também descrita na literatura como NEU, NGL, TKR1, HER2, c-erbB2, HER2/*neu*. É codificada pelo gene c-erbB-2, mesmo nome dado ao seu marcador imunistoquímico. Sua amplificação é encontrada em aproximadamente 20% dos tumores invasores de mama e está associada ao pior prognóstico (WOLFF *et al.*, 2007).

A verificação de positividade para HER2 é dada pela coloração imunistoquímica de 3+ (uniforme, de intensa coloração da membrana e em mais de 30% das células do tumor invasor) e/ou um resultado de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) com mais de seis cópias do gene HER2 por núcleo ou uma taxa de FISH maior que 2,2. São consideradas negativas colorações IHQ de 0 ou 1+, e resultados de FISH inferiores a quatro cópias, ou taxa de FISH inferior a 1,8. Colorações imunistoquímicas 2+, taxa de FISH entre 1,8 e 2,2, ou valores entre quatro a seis cópias do gene HER2 por núcleo são considerados duvidosos, exigindo uma intervenção adicional para diagnóstico final (HAMMOND *et al.*, 2011).

2.3.3. Antígeno Ki-67

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear que está associada à proliferação celular. Está presente em todas as fases ativas do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose), porém, ausente na fase de repouso (G_0) (SCHOLZEN *et al.*, 2000). Correlaciona-se com diversos outros fatores prognósticos (LEHR *et al.*, 1999) e é aceito como importante marcador imunohistoquímico de proliferação celular tumoral (URRUTICOECHEA *et al.*, 2005).

Células tumorais da mama podem expressar altos níveis de Ki-67 (SHOKER *et al.*, 1999), o que não acontece nos tecidos de mama normal, onde o Ki-67 é expresso em níveis bastante baixos (URRUTICOECHEA *et al.*, 2005). A alta positividade do Ki-67 evidencia assim a perda do padrão normal dessas células. A positividade para RE e Ki-67 é inversamente proporcional, observando-se alta positividade de Ki-67 em casos RE pouco positivos e vice-versa (BOTTINI *et al.*, 2001).

Os níveis de positividade desse marcador tendem a diminuir no decorrer de terapias adjuvantes, já na segunda semana de tratamento, demonstrando assim, evidente queda no índice proliferativo do tumor (BAUM *et al.*, 2003).

Tumores podem ser classificados como sendo de alto ou de baixo índice proliferativo; isso de acordo com a porcentagem de células imunomarcadas (KESHGEGIAN *et al.*, 1995). Os tumores de alto índice possuem uma marcação imunohistoquímica positiva para o Ki-67 superior ou igual a 14% de células neoplásicas, e os de baixo índice aqueles com o índice inferior a 14% (CHEANG *et al.*, 2009).

2.3.4. Citoceratina 5

As células mamárias normais, assim como as demais células epiteliais, possuem moléculas que conferem estabilidade mecânica aos tecidos. Essas moléculas são conhecidas como citoceratinas (CKs), ou citoqueratinas. Células luminiais habitualmente expressam citoceratinas de baixo peso molecular dos tipos: 7, 8, 18 e 19 (RAKHA *et al.*, 2008).

Células justapostas à membrana basal, chamadas basais/ mioepiteliais, usualmente expressam citoceratinas basais e de alto peso molecular tais quais: 5, 6, 14 e 17 (RAKHA *et al.*, 2008). As citoceratinas 5 e 5/6 estão no grupo de citoceratinas do tipo II, onde estão as citoceratinas neutras ou básicas. Elas caracterizam, na imunoistoquímica, um fenótipo basal (PEROU *et al.*, 2000) pelo fato de serem normalmente expressas em células adjacentes à membrana basal e ao mioepitélio. Possuem alta especificidade, porém nem sempre são positivas nos subtipos basaloides. Vários estudos citam a sua utilização nesta subtipagem (LIVASY *et al.*, 2006; RAKHA *et al.*, 2007; BHARGAVA *et al.*, 2008a).

Estudo recente relata que a CK5 é mais sensível que a combinação de citoceratinas CK5/6 na identificação imunofenotípica dos carcinomas mamários de subtipo basaloide. Foi identificada uma sensibilidade da CK5 para identificar tumores basaloides de 97 % em comparação com 59% para a CK5/6. Ambos os anticorpos tinham especificidade comparável e de mais de 95%. Para os casos positivos, o percentual e a intensidade de coloração têm sido muito maiores para a CK5 do que para a CK5/6 (BHARGAVA *et al.*, 2008a).

2.3.5. Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR)

O EGFR, também descrito como HER1, foi o primeiro receptor tirosina-quinase a ser diretamente relacionado com o câncer em humanos. Ele participa da regulação do crescimento e da diferenciação celular, sendo específico para o fator de crescimento epidérmico (REIS-FILHO *et al.*, 2005).

O EGFR, também é um marcador que pode ajudar na caracterização do subtipo basalóide. Ele é mais facilmente identificado e quantificado que a citoceratina 5/6, porém, possui menor especificidade que a mesma (NIELSEN *et al.*, 2004). A positividade do EGFR e/ou da CK5/6, somada aos achados de RE e de HER2 negativos, chegam a conferir 76% de sensibilidade e 100% de especificidade à detecção dos subtipos basalóides através da imunistoquímica (NIELSEN *et al.*, 2004).

O EGFR foi relatado ser superexpresso em tumores de mama agressivos e está atualmente sendo avaliado em ensaios clínicos como um potencial alvo terapêutico (REIS-FILHO *et al.*, 2005).

2.4. SUBTIPOS MOLECULARES

A partir do sequenciamento do genoma humano, formalmente iniciado em 1990, diferentes perspectivas foram introduzidas no campo da investigação molecular e da análise de padrões de expressão gênica (VENTER *et al.*, 2001). No ano 2000, Perou *et al.*, através da utilização da técnica de microarranjos de DNA complementar, “*cDNA microarrays*”, analisando mais de 8.000 genes, caracterizaram diferentes perfis de expressão gênica dos tumores mamários. Dois grupos moleculares maiores foram determinados conforme a sua origem epitelial, sendo eles: os basaloides e os luminais. E em seguida, cinco subtipos moleculares foram identificados: o luminal A, o luminal B, o superexpressão de HER2, o basaloide e o mama-normal símile (PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE, 2004).

Apesar do perfil de expressão gênica ser considerado o teste padrão-ouro para a subtipagem molecular do câncer de mama, a imunistoquímica mantém a vantagem de avaliar a expressão de proteínas no contexto da morfologia do tumor, podendo ser aplicada a pequenas amostras como biópsias extraídas por agulha fina, em laboratórios clínicos ou de pesquisa, com menores custos e com um rápido tempo de execução (CHEANG *et al.*, 2009).

2.4.1. Subtipo Luminal A

Os subtipos luminais têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas destes grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais. Análises em microarranjos de DNA complementar têm mostrado que os subtipos de tumores luminais expressam grandes quantidades de citoceratinas luminais e marcadores genéticos de células epiteliais luminais do tecido mamário normal (SOTIRIOU *et al.*, 2003).

O subtipo molecular **luminal A**, que pela classificação usual perfaz cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama, apresenta em relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores RE positivos e histologicamente de baixo grau. Classificaram-se como luminais A os tumores de padrão positivo para receptores hormonais, padrão negativo para amplificação e/ou superexpressão de HER2 (PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE *et al.*, 2003; SOTIRIOU *et al.*, 2003). Estudos recentes trazem que este subtipo deve ainda apresentar um índice de Ki-67 inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas e a utilização desse novo parâmetro de classificação provavelmente mudará a percentagem de casos classificados com luminal A (CHEANG *et al.*, 2009; KENNECKE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010).

2.4.2. Subtipo Luminal B

Os tumores do subtipo **luminal B** exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67), CCNB1 e MYBL2. Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE *et al.*, 2003). A expressão de RE, RP, HER2 e mais recentemente a utilização do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B (CHEANG *et al.*, 2009).

Uma nova estratificação foi proposta para esse subgrupo em: **luminal B** e **luminal HER2**. O subtipo luminal B mais recentemente tem sido caracterizado pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais, ser HER2 positivo (luminal HER2), e quando o HER2 é negativo, ter um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (CHEANG *et al.*, 2009; VODUC *et al.*, 2010). Essa nova subclassificação, com a utilização do índice de Ki-67, tem alterado significativamente os valores de prevalência até então encontrados para os subtipos luminais, uma vez que tumores com alto índice proliferativo, até então classificados como luminais A, segundo os novos parâmetros, são classificados luminais B (CHEANG *et al.*, 2009; KENNECKE *et al.*, 2010).

O subtipo luminal B foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença específica em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico (CHEANG *et al.*, 2009). E ainda, associado à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno, demonstrando se beneficiar mais do que o subtipo luminal A de quimioterapia associada a antiestrogênicos (KENNECKE *et al.*, 2010).

2.4.3. Superexpressão de HER2

O subtipo **superexpressão de HER2**, como o próprio nome indica, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais (CIANFROCCA *et al.*, 2004). Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais (SØRLIE *et al.*, 2001). Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam esta amplificação gênica. Assim sendo, justifica-se a incorporação do *status* de HER2, juntamente com o status de outros fatores prognósticos, a uma decisão clínica sobre a prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica (WOLFF *et al.*, 2007; VODUC *et al.*, 2010); entretanto, a utilização de terapia alvo-específica (trastuzumabe), melhora acentuadamente o prognóstico dessas pacientes (RAKHA *et al.*, 2010b).

A positividade de HER2 parece estar associada relativamente, mas não em absoluto, à resistência às terapias endócrinas. Esse efeito pode ser específico para as terapias moduladoras seletivas do receptor de estrógeno,

como o tamoxifeno, e talvez não para terapias de depleção de estrogênio, como os inibidores de aromatase, utilizados em mulheres após a menopausa (WOLFF *et al.*, 2007).

As terapias-alvo contra HER2 são muito eficazes, tanto na forma adjuvante, como no contexto metastático. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que melhora as taxas de resposta, reduz a progressão da doença e melhora a sobrevida quando utilizado isoladamente ou adicionado à quimioterapia em câncer de mama metastático (CONSTANTINIDOU *et al.*, 2011). O tratamento combinado com o paclitaxel é indicado para as pacientes que não receberam tratamento prévio para o tumor. O trastuzumabe adjuvante reduz o risco de recorrência à metade e a mortalidade em um terço em pacientes com câncer de mama em estágio primário (WOLFF *et al.*, 2007). O uso do lapatinibe, outro inibidor da tirosina quinase, que bloqueia tanto o HER2 quanto o HER1, beneficia as pacientes nas quais o uso do trastuzumabe foi ineficaz, controlando sua doença metastática (GEYER *et al.*, 2006).

2.4.4. Basaloide

O subtipo **basaloide**, caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/ mioepiteliais, demonstra padrão prognóstico mais reservado, associado à menor sobrevida livre da doença e à menor sobrevida global. Morfologicamente, é caracterizado por alto grau histológico, por elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pelo destacado infiltrado linfocitário (CHEANG *et al.*, 2008). Apresenta negatividade tanto para

os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER2. Espera-se assim, que pacientes com este perfil, não se beneficiem do uso do trastuzumabe, nem de terapias hormonais, como o tamoxifeno, e nem dos inibidores de aromatase (IRVIN JR *et al.*, 2008).

Os tumores basaloide têm baixa expressão do gene BRCA1 causada por metilação de seu gene - promotor, por inativação de transcrição de BRCA1, ou por ambos. Na verdade, quase todos os tumores de mama associados a uma mutação BRCA1, seja esporádica ou hereditária, têm um fenótipo basaloide triplo-negativo (SOTIRIOU *et al.*, 2003). Demonstra-se forte relação entre a disfunção da via BRCA1 e a expressão de CK5 (RIBEIRO-SILVA *et al.*, 2005).

Devido à ausência de imunomarcagem de RE, RP e HER2, tumores basaloide são ainda chamados por alguns autores de “**tumores triplo-negativos**” (TTN), no entanto, sabe-se que parte dos tumores triplo-negativos não se equivalem aos basaloide, podendo ser mais bem descritos como “**tumores triplo-negativos não basaloide**” (KENNECKE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010). A partir da adição de marcadores imunoistoquímicos aos perfis “triplo-negativos” como a citoceratina 5 ou 5/6 e o EGFR, segundo alguns autores, pode-se fenotipicamente se estimar um perfil gênico do subtipo basaloide (NIELSEN *et al.*, 2004; LIVASY *et al.*, 2006; BHARGAVA *et al.*, 2008a; CHEANG *et al.*, 2008).

2.4.5. Mama-Normal Símile

O subtipo “**normal-like**” ou “mama-normal símile” demonstra elevação na expressão de genes comuns às células epiteliais normais da mama, às células adiposas e a outras células do estroma (PEROU *et al.*, 2000). Esse subgrupo habitualmente apresenta negatividade para os marcadores tumorais usuais, possivelmente representam uma contaminação com o tecido mamário normal durante a realização das análises de perfil de expressão gênica (PARKER *et al.*, 2009; WEIGELT *et al.*, 2010).

2.4.6. Claudin-low

O subtipo **claudin-low** é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7; as ocludinas e a E-caderina (HERSCHKOWITZ *et al.*, 2007). Apresenta aumento na expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima, de marcadores endoteliais e linfocíticos e de marcadores relacionados a células tronco tumorais, com fenótipo CD44⁺/CD24⁻. Apresenta uma baixa ou ausente expressão de marcadores de diferenciação luminal e moderada expressão de genes de proliferação. É normalmente um carcinoma do tipo ductal invasor com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular. Demonstra um padrão imunofenotípico triplo-negativo não basaloide e não possui ainda marcadores imunohistoquímicos protocolados para a sua caracterização (PRAT *et al.*, 2010).

2.5. MICROARRANJO DE TECIDOS

Esta é uma técnica de concentração de amostras que se constitui da construção de matrizes de tecidos. Um bloco de parafina denominado “receptor” recebe de forma ordenada e pré-determinada dezenas ou centenas de fragmentos cilíndricos que são extraídos de blocos teciduais “doadores”, formando assim um microarranjo de tecidos (KONONEN *et al.*, 1998). Essa metodologia vem sendo crescentemente utilizada em pesquisas de perfis de expressão molecular e proteica (ZHANG *et al.*, 2003). Optou-se pelo seu uso devido à sua característica de analisar simultaneamente várias amostras, conferindo aos estudos que a utilizam: maior acurácia, menor tempo e menores custos, conforme sintetizado no quadro 1.

Quadro 1 – Comparativo entre a utilização da imunistoquímica convencional (no fragmento inteiro) e com o auxílio de microarranjos de tecido (TMA), quando em trabalhos de pesquisa.		
	Imunistoquímica Convencional	Imunistoquímica em TMA
Consumo de reagentes ¹	↑	↓
Tempo de execução dos testes ¹	↑	↓
Tempo de análise ¹	↑	↓
Custos financeiros^{1,2}	↑	↓
Espaço para arquivo de lâminas	↑	↓
Representatividade tumoral	↑	↓
Homogeneidade entre reações	↓	↑
Complexidade no preparo da amostra	↓	↑

¹ A economia é proporcional à quantidade de casos avaliados.
² Não contabilizados os custos da aquisição de equipamentos no momento da implantação do método.
Referências: (KONONEN *et al.*, 1998; ZHANG *et al.*, 2003)

JUSTIFICATIVA

A escolha do tema proposto justifica-se pela constatação que, apesar de todos os conhecimentos expostos, existe uma busca por um maior entendimento do tema, procurando entender evoluções não esperadas para certas pacientes, cujos subtipos moleculares foram identificados pelas classificações imunoistoquímicas usuais. Isso pode ser em parte justificado pela existência de diferentes padrões de expressão de genes de proliferação em tumores luminais, até então não avaliados pela imunoistoquímica.

O estudo do perfil de expressão gênica, apesar de ser o padrão-ouro de classificação, é bastante complexo e oneroso. Em países com recursos limitados, como o Brasil, tornam-se útil e necessária a utilização e o aprimoramento de técnicas para a identificação dos subtipos moleculares que sejam menos complexas e financeiramente mais viáveis, como a imunoistoquímica.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

- Avaliar por imunoistoquímica os subtipos moleculares do câncer de mama em uma série de carcinomas ductais invasores, diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de 2003 a 2007.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Verificar a frequência dos subtipos moleculares: luminal A, luminal B, superexpressão de HER2, basaloide e triplo-negativo não basaloide; utilizando dois modelos de classificação por imunoistoquímica: com e sem o uso do marcador Ki-67;
- Avaliar o grau de concordância entre os resultados obtidos pelos dois modelos de classificação;
- Correlacionar os subtipos encontrados conforme os dois modelos de classificação com outros fatores prognósticos.

4. METODOLOGIA

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (protocolo nº 175/09). Como a pesquisa não envolveu a abordagem direta às pacientes, não foi necessário à aplicação do termo consentimento livre e esclarecido.

4.2. CASUÍSTICA

Um estudo retrospectivo, observacional e descritivo foi conduzido e incluiu, a partir do banco de dados do Serviço, todos os casos de carcinomas ductais invasores de mama registrados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de 2003 a 2007. Optou-se por esse período pelos blocos estarem mais facilmente acessíveis à sua recuperação; ao fato de a imunohistoquímica ter-se iniciado oficialmente no Serviço em 2002; e por possibilitar um período razoável de seguimento em trabalhos futuros. Ao final, foram incluídos na pesquisa 234 casos.

Foram levantados: lâminas, blocos e laudos histopatológicos de todos os casos incluídos no estudo. A partir dos laudos foram obtidos: idade ao diagnóstico, tipo e grau histológicos do tumor; tamanho do tumor e estado linfonodal. As lâminas foram revisadas por uma patologista especialista em patologia mamária (MARM) para seleção dos blocos tumorais mais representativos.

4.3. TAMANHO DA AMOSTRA

Não houve cálculo do tamanho amostral, foram analisados todos os casos, com diagnóstico original de carcinoma ductal invasor de mama, no sexo feminino, diagnosticados no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de 2003 a 2007, totalizando 315 casos, que após a utilização dos critérios de exclusão, passaram a 234 casos. O período de cinco anos foi escolhido para que os dados desta pesquisa pudessem ser aproveitados em possíveis estudos de sobrevida futuros.

4.4. PACIENTES E MÉTODOS

4.4.1. Critérios de inclusão

- Pacientes do sexo feminino
- Diagnóstico original de carcinoma ductal invasor de mama;
- Entrada no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás no período entre 2003 a 2007;
- Disponibilidade de blocos para a reavaliação histológica, observando-se a representatividade da amostra para o estudo imunoistoquímico em lâminas obtidas de microarranjo de tecidos.

4.4.2. Critérios de exclusão

- Casos cuja amostra do tumor fosse insuficiente para o processamento do microarranjo de tecidos;
- Casos que durante a análise não permitiram o estudo imunoistoquímico de todos os marcadores pela falta de células tumorais;
- Casos cujos cortes histológicos se descolaram da lâmina durante a reação imunoistoquímica;
- Casos HER2 duvidosos, pela impossibilidade de realização da hibridização fluorescente *in situ* (FISH), que é o exame padrão ouro nesses casos.

4.4.3. Construção dos microarranjos de tecidos

Os blocos tumorais mais representativos foram dispostos de maneira ordenada e pré-determinada. O bloco único de TMA foi construído, seguindo a técnica descrita por Kononen *et al.* (KONONEN *et al.*, 1998). Foi utilizado o equipamento manual *Beecher Instruments*[®], modelo *MTA-I* (Silver Spring, MD, USA). Um fragmento cilíndrico de 1 mm de diâmetro foi extraído da área tumoral, previamente marcada no bloco doador, para a construção de um bloco receptor contendo 278 amostras (figura 4).

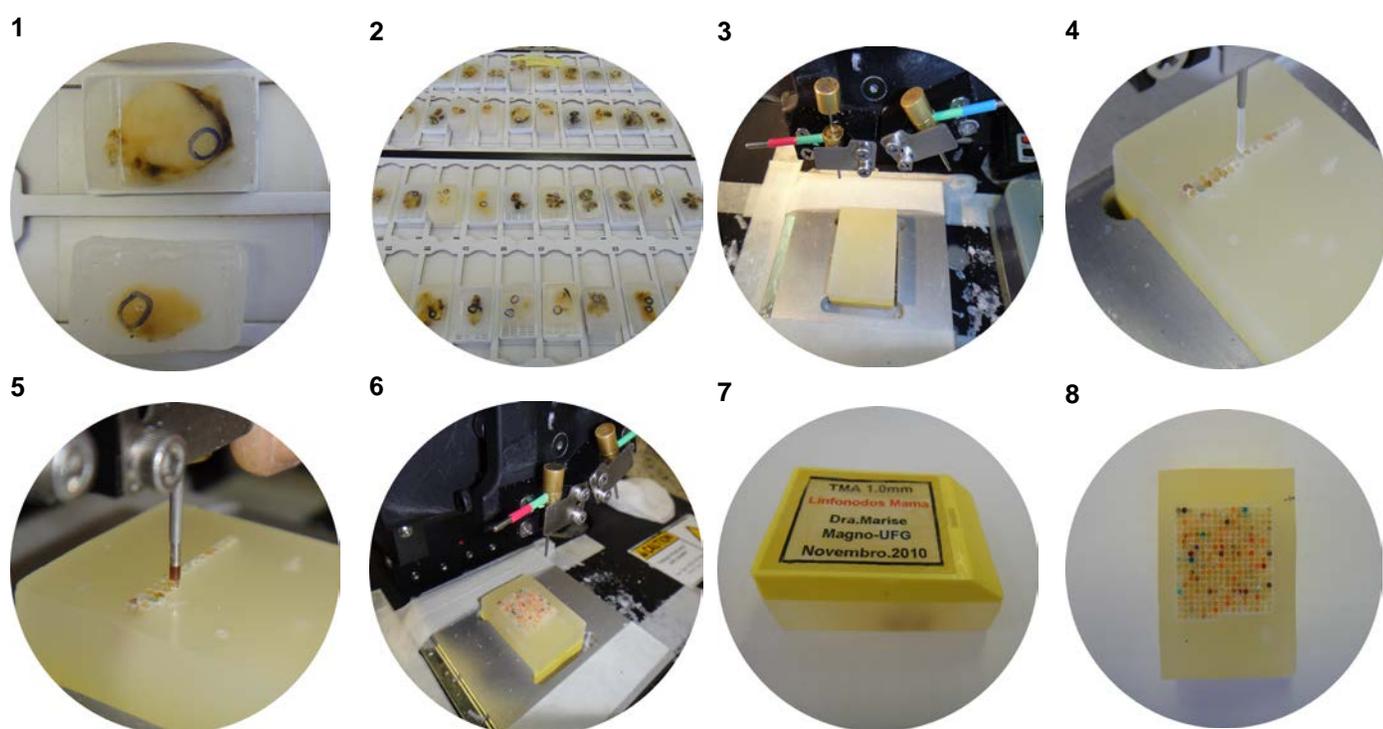


Figura 4 – Construção do bloco de microarranjos de tecido contendo 278 amostras de carcinoma ductal invasor de mama. (Fonte: Arquivo pessoal de CIRQUEIRA, 2010).

4.4.4. Imunoistoquímica

Cortes histológicos sequenciais com a espessura de 4 µm foram obtidos por microtomia seriada, os quais foram colocados em lâminas eletricamente carregadas (*Starfrost*[®]) e com a utilização de adesivos (*Instrumedics Inc*[®]). Para a análise imunoistoquímica foi empregado o kit de detecção à base de polímeros Mach1 HPR-Polímero Kit[®] (Biocare Medical, EUA), utilizando-se anticorpos primários para imunodeteção de: receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), oncoproteína HER2, fator de crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR), citoceratina (CK) 5 e fator de proliferação Ki-67. Clones, fabricantes, diluições e período de incubação estão discriminados no quadro 2.

Quadro 2 – Resumo sobre os anticorpos empregados neste estudo.					
Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Imunomarcação	Valores de Corte (positividade)
RE	SP1	1: 500	Biocare, EUA	Nuclear	≥ 1%
RP	16	1: 500	Novocastra, RU	Nuclear	≥ 1%
HER2 *	5A2	1: 2000	Novocastra, RU	Membrana citoplasmática	3+
Ki-67	MM1	1: 200	Biocare, EUA	Nuclear	Baixo <14%; Alto ≥14%
CK5	XM26	1: 400	Novocastra, RU	Citoplasmática	≥ 10%
EGFR	111.6	1: 250	Biocare, EUA	Membranar/ Citoplasmática	≥ 10%

* HER2 exibindo marcação intensa e uniforme da membrana citoplasmática em mais de 30% das células tumorais.
Abreviações: HER2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR, receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; CK5, citoceratina 5.

Os cortes histológicos foram fixados a 60° Celsius, desparafinizados em solução de xileno e hidratados em uma série graduada de álcoois até a água. A recuperação antigênica foi realizada por calor induzido, utilizando tampão combinado de citrato e EDTA Diva® (Biocare Medical, EUA) sob temperatura e pressão ideais, controlados automaticamente em panela de pressão elétrica digital. Foi utilizado o peróxido de hidrogênio a 3% para o bloqueio da peroxidase endógena. Nas lavagens foram utilizados: água destilada e tampão fosfato salino (PBS) com “*tween 20*” a 0,1%. Foram aplicados os anticorpos primários específicos com tempo de incubação de 12 horas (*overnight*).

No dia seguinte, após lavagens com tampão PBS, os cortes foram submetidos à incubação com o reagente pós-primário e com os anticorpos secundários polimerizados, respectivamente, Mach1 Probe® e Mach1 Polímero-HRP Universal® (Biocare Medical, EUA). A revelação da reação foi feita com o cromógeno tetra-hidroclorato de 3-3' diaminobenzidina (DAB). Os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados em uma série graduada de álcoois, reidratados em xileno, recobertos com meio de montagem e lamínula para posterior análise em microscópio óptico.

As secções submetidas à imunistoquímica foram examinadas em microscópio óptico, marca Olympus® de cinco cabeças, modelo U-MDOB3 (Olympus, JP), e avaliadas para a classificação segundo os perfis de imunomarcacão descritos no quadro 3 e na figura 5.

Quadro 3 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunistoquímica dos tumores de mama.

	Classificação Usual	Classificação com o índice de Ki-67 de 14%
Subtipo Molecular	Padrão de Imunomarcção	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2-	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2+	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14% RE+ e/ou RP+, HER2+ (<i>Luminal HER2</i>)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+	RE-, RP- e HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

Abreviações: HER2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR, receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; CK5, citoceratina 5.
Referências: (CHEANG *et al.*, 2006; PAREDES *et al.*, 2007; RAKHA *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2007; CHEANG *et al.*, 2009; BHARGAVA *et al.*, 2010; HAMMOND *et al.*, 2010)

Foram avaliadas todas as células presentes nos cortes, utilizando-se duas lâminas de microarranjos para cada marcador imunistoquímico, com níveis diferentes de cortes. Para o marcador Ki-67, uma avaliação consensual com três observadores foi realizada, onde foram avaliadas as reações imunistoquímicas realizadas no TMA e na peça original. Para a peça, foi calculada uma média de positividade observada em dois ou mais campos, de diferentes intensidades. Não foi possível a utilização de duas plataformas de TMA por ser grande o número de casos, o que tornaria oneroso a sua realização.

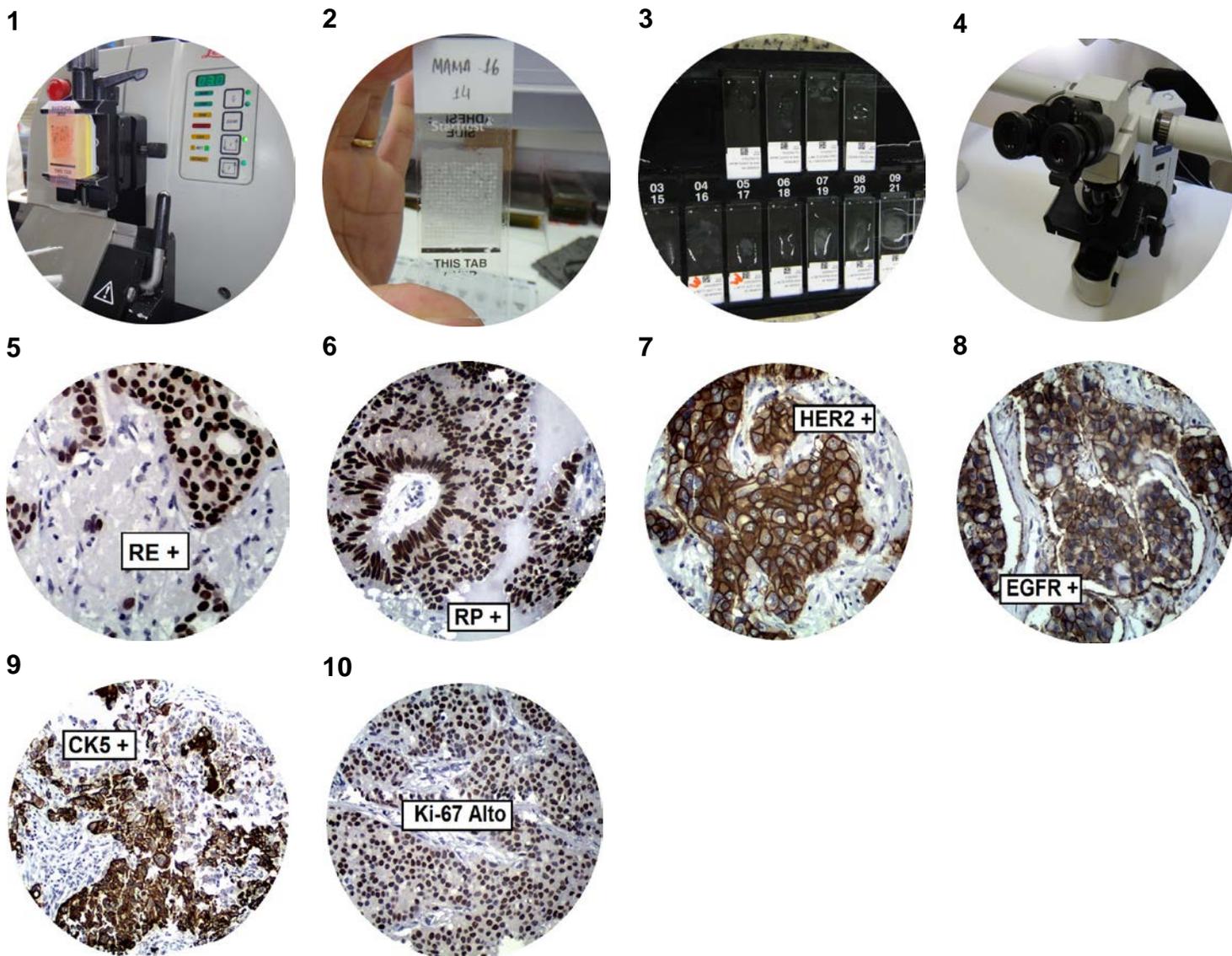


Figura 5 – Microtomia, imunohistoquímica e visualização ao microscópio óptico dos marcadores quando positivos. (Fonte: Arquivo pessoal de CIRQUEIRA, 2010).

4.4.5. Análise dos dados

O programa Microsoft Office Excel[®] versão 2010 (Microsoft, EUA) foi utilizado para a criação, para o gerenciamento do banco de dados e para a criação de gráficos e de tabelas.

A amostra foi caracterizada por meio da estatística descritiva. Para a análise estatística, o teste Kappa de Cohen (coeficiente κ de Cohen) foi aplicado para avaliar a concordância entre os resultados das classificações dos subtipos moleculares. Julgamos os valores de concordância: de 0,01 a 0,20, ligeira; 0,21 - 0,40, regular; 0,41 - 0,60, moderada; 0,61 - 0,80, substancial, e 0,81 - 0,99, concordância quase perfeita (LANDIS *et al.*, 1977). Utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para correlacionar os subtipos encontrados segundo os dois modelos com os parâmetros clínico-patológicos. Foi considerado o valor de 5% ($p < 0,05$) como limite de significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS versão 17.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA).

5. PUBLICAÇÕES

ARTIGO 1 – SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA

**ARTIGO 2 – SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA:
INFLUÊNCIA DO KI-67 NA CLASSIFICAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA**

ARTIGO 1

Revisão da Literatura

Subtipos moleculares do câncer de mama

Molecular subtypes of breast cancer

Magno Belém Cirqueira¹

Marise Amaral Rebouças Moreira¹

Leonardo Ribeiro Soares²

Ruffo Freitas-Júnior³

¹Departamento de Patologia e Imagenologia do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia (GO), Brasil.

²Faculdade de Medicina da UFG – Goiânia (GO), Brasil.

³Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da UFG; Serviço de Ginecologia e Mama do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (ACCG) – Goiânia (GO), Brasil.

Endereço para correspondência: Magno Belém Cirqueira – Rua 215, qd. 49 – It. 07 – Setor Leste – Vila Nova – CEP 74645-140 – Goiânia (GO), Brasil – E-mail: magnocirqueira@gmail.com

Conflito de interesses: não há.

Artigo submetido à **Revista Femina**, em 07/11/2011 (Normas de publicação - Anexo 2).

Resumo O câncer de mama apresenta alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica, fato esse justificado pela existência de diversas formas moleculares. Diferentes perfis de expressão gênica foram caracterizados, possibilitando a identificação de subtipos moleculares distintos, com fatores prognósticos e alvos terapêuticos específicos. Esta revisão foi conduzida utilizando artigos científicos das bases de dados MEDLINE/ PubMed, LILACS e SciELO e teve como objetivo discutir os subtipos moleculares do câncer de mama e suas principais características. O subtipo luminal A apresenta, com relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores histologicamente de baixo grau e apresentam resposta inferior à quimioterapia, enquanto, tumores luminais B apresentam maior proliferação e são, muitas vezes, de alto grau histológico. O subtipo superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), sem a terapia adjuvante sistêmica, tem menor sobrevida livre de doença e elevada taxa de recorrência, porém se beneficia de terapias alvoespecíficas. O subtipo basaloide demonstra prognóstico mais reservado, associado à menor sobrevida livre de doença e à menor sobrevida global. A anatomia patológica e o teste de imunoistoquímica, através da classificação tumoral, são de fundamental relevância na abordagem terapêutica do carcinoma mamário. Para a atual classificação molecular por imunoistoquímica, recomenda-se a adoção do painel de fatores preditivos receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e HER2 para todos os casos, adicionando-se outros marcadores, como o receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico (EGFR), a citoceratina 5 e o Ki-67.

Palavras-chave:

Neoplasias da mama

Classificação

Imunoistoquímica

Prognóstico

Abstract Breast cancer has highly heterogeneous clinical, morphological and biological features, a fact that is justified by the existence of several molecular forms. Different gene expression profiles were characterized, enabling the identification of different molecular subtypes with specific prognostic factors and therapeutic targets. This review was conducted using scientific articles of the databases MEDLINE, SciELO, LILACS and PubMed, and aimed to discuss the molecular subtypes of breast cancer and their main characteristics. The luminal A subtype, when compared with the others, features the best prognosis. Most tumors are histologically low grade and have less response to chemotherapy, while luminal B tumors have high cell proliferation rate and are most often high grade. The enriched subtype to receptor 2 human epidermal growth factor (HER2), without adjuvant systemic therapy, has a lower disease-free survival and higher recurrence rate, but it benefits from target-specific therapies. The basal-like subtype pattern shows poor prognosis associated with lower disease-free survival and shorter overall survival. The pathology and immunohistochemistry test, by tumor classification, are of fundamental importance in the therapeutic management of breast cancer. For the current molecular classification by immunohistochemistry, the adoption of the panel of the predictive factors estrogen receptors (ER), receptors progesterone (PR) and HER2 is recommended for all cases of breast cancer, adding other markers such as epidermal growth factor receptor type 1 (EGFR), the cytokeratin 5 and the Ki-67.

Keywords:

Breast neoplasms

Classification

Immunohistochemistry

Prognosis

Introdução

O câncer de mama é uma doença complexa, de alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica. Tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas¹⁻³ (B). Essas diferenças podem ser em parte justificadas pela existência de diversos subtipos moleculares do carcinoma de mama, a exigir terapêutica específica. Esta complexidade torna difícil a definição de condutas clínicas, podendo por vezes propiciar tratamentos inadequados^{4,5} (B).

O advento da tecnologia de microarranjos de DNA complementar, com a análise paralela de milhares de genes, tem permitido correlacionar perfis de expressão gênica dos cânceres de mama com a evolução clínica das pacientes e com as respostas às terapias utilizadas⁶ (B). Pesquisadores analisaram mais de 8.000 genes e identificaram cinco subtipos moleculares inicialmente: luminal A, luminal B, superexpressão de HER2, basaloide e mama-normal símile^{4, 7, 8} (B). Mais recentemente, outro subtipo foi descoberto, denominado Claudin-low⁹ (B).

Painéis imunoistoquímicos têm sido propostos para a identificação desses subtipos, buscando reproduzir com certa aproximação os perfis de expressão gênica^{10, 11} (B). Essas descobertas têm proporcionado importantes informações prognósticas e preditivas e uma melhor percepção sobre os complexos mecanismos biológicos da tumorigênese² (B).

Esta revisão objetiva discutir os subtipos moleculares do câncer de mama e suas principais características, destacando os marcadores imunoistoquímicos utilizados para a caracterização dos mesmos. O conhecimento mais detalhado desses subtipos, além de

potencialmente melhorar a determinação do prognóstico em pacientes com câncer de mama, é de fundamental relevância na abordagem terapêutica.

Métodos

A pesquisa foi realizada nas bases de dados eletrônicas MEDLINE, SciELO, LILACS e PubMed, por artigos publicados até o ano de 2011. As palavras-chave utilizadas para a pesquisa dos artigos foram: “Neoplasias da mama”, “Classificação”, “Imunoistoquímica”, “Prognóstico” e suas traduções para o inglês, “*Breast neoplasms*”, “*Classification*”, “*Immunohistochemistry*”, “*Prognosis*”. A pesquisa foi limitada aos idiomas português, inglês e espanhol, e aos estudos realizados com seres humanos.

Foram encontrados 198 artigos, publicados entre 1983 e 2011, dos quais 117 na base de dados MEDLINE, 03 na base de dados LILACS, 78 encontrados no PubMed. Não foram encontrados registro na base SciELO. Além disso, uma busca manual foi executada na lista de referência dos artigos de interesse para selecionar estudos adicionais relevantes, não identificados pela pesquisa eletrônica. Após análise cuidadosa dos artigos, os mesmos foram avaliados segundo os critérios: ano de publicação, resultados encontrados e conclusões do estudo.

Os artigos foram classificados utilizando-se a classificação proposta pela Associação Médica Brasileira, de acordo de acordo com o grau de evidência: A) estudos experimentais ou observacionais de melhor consistência; B) estudos experimentais ou observacionais de menos consistência; C) relato ou série de casos; D) opinião desprovida de avaliação crítica, baseada em consensos, estudos fisiológicos ou modelos animais.

Discussão

Até recentemente, os tumores de mama eram classificados utilizando-se de fatores prognósticos tradicionais, como, estado linfonodal regional, tamanho do tumor, tipo e grau histológico, e estadiamento da doença, os quais isoladamente têm limitada capacidade preditiva¹² (B).

Fatores prognósticos são características mensuráveis observadas no momento do diagnóstico e visam estimar a evolução clínica, a sobrevida global e o tempo livre da doença¹³ (B). Enquanto, os fatores preditivos são características associadas à resposta esperada a uma determinada terapia. Alguns fatores podem ser ao mesmo tempo prognósticos e preditivos, como os receptores hormonais e a amplificação e/ou superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2)¹⁴ (B).

Imunoistoquímica na Classificação dos Subtipos

Apesar do perfil de expressão gênica ser considerado o teste padrão-ouro para a subtipagem molecular do câncer de mama, em países com recursos limitados, como o Brasil, torna-se necessária a utilização de técnicas menos complexas e financeiramente mais viáveis que possam identificar os subtipos moleculares. Para tal finalidade, a anatomia patológica conta com a imunoistoquímica, técnica tecidual *in situ*, utilizada na determinação do perfil de expressão proteica e que é de bastante valia para a patologia mamária atual¹⁵ (B).

A imunoistoquímica mantém a vantagem de avaliar a expressão de proteínas no contexto da morfologia do tumor, podendo ser aplicada a pequenas amostras como

biópsias extraídas por agulha fina, em laboratórios clínicos ou de pesquisa, com menores custos e com um rápido tempo de execução¹⁶ (B) (Tabela 1).

Tabela 1 - Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunistoquímica dos tumores de mama¹⁶⁻²²

	Classificação com o índice de Ki-67 de 14%
Subtipo molecular	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14% RE+ e/ou RP+, HER2+ (luminal HER2)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

HER2: receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR: receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE: receptor de estrogênio; RP: receptor de progesterona; CK5: citoceratina 5.

Subtipos Moleculares do Câncer de Mama

Luminal A

Os subtipos luminais têm denominação advinda da similaridade que as células neoplásicas desses grupos possuem com as células mamárias normais, que ficam em contato direto com o lúmen dos ductos mamários, as chamadas células luminais²³ (B).

O subtipo molecular luminal A, que representa cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama, apresenta, em relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores que apresentam receptor de estrogênio positivo e baixo grau histológico. Os antiestrogênicos, tamoxifeno e inibidores de aromatase, são as terapias alvo-específicas utilizadas para o seu tratamento sistêmico¹² (B).

Classificam-se como luminais A os tumores positivos para receptor de estrogênio (RE) e/ou receptor de progesterona (RP), e negativos para amplificação e/ou superexpressão de HER2^{4,7,23,24} (B). Estudos recentes trazem que esse subtipo deve ainda apresentar um índice de Ki-67, avaliado por imunistoquímica, inferior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas (Tabela 1)^{16,25,26} (B).

Luminal B

Os tumores do subtipo luminal B exibem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67), CCNB1 e MYBL2. Seu maior índice de proliferação celular traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A^{7,24} (B). A expressão de RE, RP, HER2 e mais recentemente a utilização do índice do Ki-67, distinguem o subtipo luminal A do luminal B¹⁶ (B).

Uma nova estratificação foi proposta para esse subgrupo em: luminal B e luminal HER2. O subtipo luminal B, mais recentemente, tem sido caracterizado pela positividade de pelo menos um dos receptores hormonais, ser HER2 positivo (luminal HER2), e quando o HER2 é negativo, por ter um índice de Ki-67 igual ou superior a

14% de células neoplásicas imunomarcadas^{16,26} (B). Essa nova subclassificação, com a utilização do índice de Ki-67, tem alterado significativamente os valores de prevalência até então encontrados para os subtipos luminais, uma vez que tumores com alto índice proliferativo, até então classificados como luminais A, segundo os novos parâmetros, são classificados como luminais B^{16,25} (B).

O subtipo luminal B foi significativamente associado a um maior risco de recorrência e a uma menor sobrevida livre da doença específica em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico¹⁶ (B); e, ainda, associado à maior possibilidade de resistência ao tamoxifeno, demonstrando se beneficiar mais do que o subtipo luminal A de quimioterapia associada a antiestrogênicos²⁵ (B).

Superexpressão de HER2

O subtipo superexpressão de HER2, como o próprio nome indica, possui elevada expressão da oncoproteína HER2, porém apresenta negatividade para receptores hormonais¹⁴ (B). Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais⁷ (B). Pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com superexpressão de HER2 possuem um pior prognóstico em relação aos pacientes que não apresentam essa amplificação gênica. Assim sendo, justifica-se a incorporação do *status* de HER2, juntamente com o *status* de outros fatores prognósticos, a uma decisão clínica sobre a prescrição de qualquer terapia adjuvante sistêmica^{21,26} (D,B); entretanto, a utilização de terapia alvo-específica (trastuzumabe), melhora acentuadamente o prognóstico dessas pacientes²⁷ (B).

A positividade de HER2 parece estar associada relativamente, mas não em absoluto, à resistência às terapias endócrinas. Esse efeito pode ser específico para as

terapias moduladoras seletivas do receptor de estrógeno, como o tamoxifeno, e talvez não para terapias de depleção de estrogênio, como os inibidores de aromatase, utilizados em mulheres após a menopausa²¹ (D).

As terapias-alvo contra HER2 são muito eficazes, tanto na forma adjuvante, quanto no contexto metastático. O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que melhora as taxas de resposta, reduz a progressão da doença e melhora a sobrevida quando utilizado isoladamente ou adicionado à quimioterapia em câncer de mama metastático²⁸ (B). O tratamento combinado com o paclitaxel é indicado para as pacientes que não receberam tratamento prévio para o tumor. O trastuzumabe adjuvante reduz o risco de recorrência à metade e a mortalidade em um terço em pacientes com câncer de mama em estágio primário²¹ (D). O uso do lapatinibe, outro inibidor da tirosina quinase, que bloqueia tanto o HER2 quanto o HER1, beneficia as pacientes nas quais o uso do trastuzumabe foi ineficaz, controlando sua doença metastática²⁹ (B).

Basaloide

O subtipo basaloide, caracterizado pela expressão de vários genes expressos em células basais/mioepiteliais, demonstra padrão prognóstico mais reservado, associado a menor sobrevida livre da doença e a menor sobrevida global. Morfologicamente, é caracterizado por alto grau histológico, por elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pelo destacado infiltrado linfocitário³⁰ (B). Apresenta negatividade tanto para os receptores hormonais, quanto para a superexpressão de HER2. Espera-se assim, que pacientes com esse perfil, não se beneficiem do uso do trastuzumabe, nem de terapias hormonais, como o tamoxifeno, e nem dos inibidores de aromatase³¹ (B).

Os tumores basaloídes têm baixa expressão do gene BRCA1, causada por metilação de seu gene – promotor, por inativação de transcrição de BRCA1, ou por ambos. Na verdade, quase todos os tumores de mama associados a uma mutação BRCA1, seja esporádica ou hereditária, têm um fenótipo basaloíde triplo-negativo²³ (B). Demonstra-se forte relação entre a disfunção da via BRCA1 e a expressão de CK5³² (B). Devido à ausência de imunomarcagem de RE, RP e HER2, tumores basaloídes são ainda chamados por alguns autores de “tumores triplo-negativos” (TTN), no entanto, sabe-se que parte dos tumores triplo-negativos não se equivalem aos basaloídes, podendo ser mais bem descritos como “tumores triplo-negativos não basaloídes”^{25,26} (B). A partir da adição de marcadores imunoistoquímicos aos perfis “triplo-negativos” como a citoceratina 5 ou 5/6 e o EGFR, segundo alguns autores, pode-se fenotipicamente se estimar um perfil gênico do subtipo basaloíde^{10,11,30,33} (B).

Mama-normal símile

O subtipo “*normal-like*” ou “mama-normal símile” demonstra elevação na expressão de genes comuns às células epiteliais normais da mama, às células adiposas e a outras células do estroma⁴ (B). Esse subgrupo habitualmente apresenta negatividade para os marcadores tumorais usuais e possivelmente representam apenas uma contaminação com o tecido mamário normal durante a realização das análises de perfil de expressão gênica^{34,35} (B).

Claudin-low

O subtipo *claudin-low*, recentemente identificado, é caracterizado por uma baixa expressão de genes envolvidos com junções celulares ocludentes e glicoproteínas de adesão célula-célula, incluindo as claudinas 3, 4 e 7; as ocludinas e a E-caderina⁹ (B). Apresenta aumento na expressão de marcadores de transição epitélio-mesênquima, de

marcadores endoteliais e linfocíticos e de marcadores relacionados a células tronco tumorais, com fenótipo CD44+/CD24-. Apresenta uma baixa ou ausente expressão de marcadores de diferenciação luminal e moderada expressão de genes de proliferação. É normalmente um carcinoma do tipo ductal invasor, com alta frequência de diferenciação metaplásica e medular. Demonstra um padrão imunofenotípico triplo-negativo não basaloide e não possui ainda marcadores imunoistoquímicos protocolados para a sua caracterização e nem terapêutica específica³⁶ (B).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Várias dificuldades são encontradas no diagnóstico dos tumores mamários, e conhecimentos provenientes de ensaios clínicos já são suficientes para compreender que o câncer de mama é uma doença altamente heterogênea, e que a identificação de alvos terapêuticos individuais dentro dos tumores é um passo para aperfeiçoar suas terapias. Portanto é cada vez mais evidente a necessidade de se encontrar uma classificação que possa guiar a tomada de decisão terapêutica.

Conforme estabelecido pelo Consenso de Saint Gallen em 2011, recomenda-se a adoção do painel de fatores preditivos RE, RP e HER2 para todos os casos de câncer mamário, incluindo a pesquisa do Ki-67, o qual avalia a atividade proliferativa e melhor caracteriza os tumores luminiais³⁷ (D). Para a identificação dos subtipos basaloides através da imunoistoquímica, recomenda-se a avaliação da citoceratina 5 e do EGFR^{10,11,38} (B).

6. LEITURAS SUPLEMENTARES

1 Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(5):303-13.

2 Geyer FC, Marchiò C, Reis-Filho JS. The role of molecular analysis in breast cancer. *Pathology.* 2009;41(1):77-88.

3 Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol.* 2009;6(12):718-30.

4 Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.

5 Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2005;11(16):5678-85.

6 Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho JS, Ellis IO. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. *Histopathology.* 2008;52(1):67-81.

7 Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98(19):10869-74.

8 Sørli T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer.* 2004;40(18):2667-75.

9 Herschkowitz J, Simin K, Weigman V, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology.* 2007;8(5):R76.

10 Bhargava R, Beriwal S, McManus K, Dabbs DJ. CK5 Is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2008;130(5):724-30.

11 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;10(16):5367-74.

12 Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer*. 2010;17(4):245-62.

13 Abreu Ed, Koifman S. Fatores prognósticos no cancer de mama femina. *Rev Bras Cancerol. INCA*. 2002;48(1):113-31.

14 Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606-16.

15 Marquez A, Wu R, Zhao J, Tao J, Shi Z. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by chromogenic *in situ*: Hybridization [CISH (TM)] and Immunohistochemistry (IHC) in archival gliomas using bright-field microscopy. *Diagn Mol Pathol*. 2004;13(1):1-8.

16 Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.

17 Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ, Ozbek U, Soran A, Johnson RR, et al. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy. *Cancer*. 2010;116(6):1431-9.

18 Cheang MCU, Treaba DO, Speers CH, Olivotto IA, Bajdik CD, Chia SK, et al. Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody sp1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. *J Clin Oncol.* 2006;24(36):5637-44.

19 Hammond MEH, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology. College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28(16):2784-95.

20 Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt F. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch.* 2007;450(1):73-80.

21 Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology. College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(1):118-45.

22 Rakha E, Tan D, Foulkes W, Ellis I, Tutt A, Nielsen T, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res.* 2007;9(6):404.

23 Sotiriou C, Neo S-Y, 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 USA.* 2003;100(18):10393-8.

- 24 Sørli 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 USA*. 2003;100(14):8418-23.
- 25 Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;28(20):3271-7.
- 26 Voduc KD, Cheang MCU, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010;28(10):1684-91.
- 27 Rakha E, Reis-Filho J, Ellis I. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010;120(2):293-308.
- 28 Constantinidou A, Smith I. Is there a case for anti-HER2 therapy without chemotherapy in early breast cancer? *Breast*. 2011;20(Suppl 3):S158-S61.
- 29 Geyer CE, Forster J, Lindquist D, Chan S, Romieu CG, Pienkowski T, et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive advanced breast cancer. *N Engl J Med*. 2006;355(26):2733-43.
- 30 Cheang MCU, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14(5):1368-76.
- 31 Irvin Jr. WJ, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008;44(18):2799-805.
- 32 Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandão DF, Chahud F, Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further

evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology*. 2005;47(5):458-66.

33 Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19(2):264-71.

34 Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.

35 Weigelt B, Mackay A, A'Hern R, Natrajan R, Tan DSP, Dowsett M, et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. *Lancet Oncol*. 2010;11(4):339-49.

36 Prat A, Parker J, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz J, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68.

37 Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011;22(8):1736-47.

38 Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2005;19(2):264-71.

ARTIGO 2

SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA: INFLUÊNCIA DO KI-67 NA CLASSIFICAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA

Magno Belém Cirqueira¹, Marise Amaral Rebouças Moreira¹, Leonardo Ribeiro Soares², Maria Auxiliadora de Paula Carneiro Cysneiros¹, Maria Helena Tavares Vilela¹, Régis Resende Paulinelli³, Ruffo Freitas-Júnior³

¹ Departamento de Patologia e Imagenologia da Universidade Federal de Goiás – Goiânia (GO) – Brasil.

² Faculdade de Medicina de Medicina da Universidade Federal de Goiás – Goiânia (GO) – Brasil.

³ Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Universidade Federal de Goiás – Goiânia (GO) – Brasil.

Instituição: Departamento de Patologia e Imagenologia - Hospital das Clínicas/ Universidade Federal de Goiás (UFG) – Goiânia (GO) – Brasil.

Autor para Correspondência: Marise Amaral Rebouças Moreira; Alameda das Rosas n.829 Ap. 300 - Setor Oeste CEP: 74 110-060 - Goiânia (GO) – Brasil – Fone/Fax: (62) 3213-5545.

E-mail: marisemoreira7@gmail.com

Artigo não submetido.

SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA:
INFLUÊNCIA DO KI-67 NA CLASSIFICAÇÃO POR IMUNOISTOQUÍMICA

RESUMO

Objetivos: Avaliar a influência da introdução do marcador Ki-67 na classificação molecular por imunohistoquímica dos cânceres de mama e correlacionar os subtipos luminais encontrados, antes e depois dessa introdução, com outros fatores prognósticos. **Métodos e resultados:** Duzentos e trinta e quatro casos de carcinoma ductal invasor de mama foram submetidos a dois painéis imunohistoquímicos de classificação, um sem e o outro com o Ki-67. Os dados obtidos nas duas classificações foram correlacionados a fatores prognósticos bem estabelecidos, como: o grau histológico, o número de linfonodos comprometidos e o tamanho do tumor. Na classificação molecular sem o Ki-67 foram identificados: 136 (58,1%) casos de luminal A; 19 (8,1%) de luminal B; 27 (11,5%) de superexpressão de HER2; 27 (11,5%) de basaloide e 25 (10,7%) de triplo-negativo não basaloide. Com a inclusão do Ki-67, houve significativa mudança para: 72 (30,8%) de luminal A e 83 (35,5%) de luminal B, com um Kappa de 0.216, mantendo-se os percentuais dos demais subtipos. Os subtipos luminal A e luminal B mostraram diferença quanto ao grau histológico após a inclusão do Ki-67 ($p < 0,001$). **Conclusões:** A nova classificação, com o Ki-67, trouxe uma mudança significativa na prevalência dos subtipos luminal A e luminal B, e uma maior correlação com o grau histológico.

Palavras-chave: Neoplasias da mama, Diagnóstico, Classificação, Neoplasias da mama/ terapia, Imunohistoquímica, Prognóstico.

BREAST CANCER MOLECULAR SUBTYPES: INFLUENCE OF KI-67 IN THE CLASSIFICATION BY IMMUNOHISTOCHEMISTRY

ABSTRACT:

Aims: To evaluate the influence of the introduction of the marker Ki-67 in the molecular classification of breast cancers by immunohistochemistry and correlate the luminal subtypes found, before and after this introduction, with other prognostic factors. **Methods and results:** Two hundred, thirty-four cases of invasive ductal breast carcinoma were submitted to two panels of immunohistochemical classification, one without and one with the Ki-67. The data obtained in these two evaluations were correlated with well-established prognostic factors, such as histological grade, lymph nodes status and tumor size. Molecular classification without the Ki-67 identified: 136 (58.1%) cases of luminal A, 19 (8.1%) luminal B, 27 (11.5%) of HER2 overexpression, 27 (11.5%) of basal-like and 25 (10.7%) of triple-negative non-basal. With the inclusion of Ki-67, there was a significant variation to: 72 (30.8%) of luminal A and 83 (35.5%) of luminal B, with a Kappa of 0.216, maintaining the percentage of other subtypes. The subtypes luminal A and luminal B showed differences according to histological grade after the inclusion of Ki-67 ($p < 0.001$). **Conclusions:** The new classification, with Ki-67, brought about a significant change in the prevalence of subtypes luminal A and luminal B, and a higher correlation with the histological grade.

Keywords: Breast neoplasms, Diagnosis, Classification, Breast neoplasms/therapy, Immunohistochemistry, Prognosis.

Introdução

O câncer de mama já há algum tempo não é tratado como uma doença única, devido à sua alta heterogeneidade clínica, morfológica e biológica (CIANFROCCA *et al.*, 2009). Através de técnicas de microarranjos de DNA complementar tem sido possível caracterizar diferentes perfis de expressão gênica do câncer de mama. Cinco subtipos moleculares foram identificados inicialmente: luminal A, luminal B, superexpressão do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), basaloide e mama-normal símile (PEROU *et al.*, 2000).

Painéis imunoistoquímicos têm sido propostos para a identificação desses subtipos, buscando reproduzir com certa aproximação os perfis de expressão gênica (NIELSEN *et al.*, 2004; BHARGAVA *et al.*, 2008). Uma das lacunas da classificação por imunoistoquímica é a ausência de uma avaliação do grau de proliferação dos tumores com um protocolo bem estabelecido. Isso faz com que sejam agrupados como luminal A tumores com alta e baixa atividade proliferativa. Com isso, pacientes que iriam se beneficiar da quimioterapia, por vezes, podem não estar recebendo esse tratamento (CHEANG *et al.*, 2009).

A inclusão de um marcador imunoistoquímico, o Ki-67, foi recentemente proposta como elemento classificador da proliferação celular. Um protocolo foi estabelecido para a sua utilização, originando novos parâmetros de classificação para os tumores luminais (CHEANG *et al.*, 2009; GOLDHIRSCH *et al.*, 2011). Nosso estudo teve como objetivo avaliar a influência da introdução

do Ki-67 na classificação molecular por imunohistoquímica do câncer de mama e correlacionar os subtipos luminais encontrados, antes e depois dessa introdução, com outros fatores prognósticos.

Materiais e Métodos

O estudo incluiu todos os casos de carcinoma ductal invasor de mama de pacientes atendidas no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de 2003 a 2007. Foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana local (protocolo 175/2009). Uma reavaliação histológica dos casos foi feita, observando-se a representatividade da amostra para o estudo imunohistoquímico através da técnica de microarranjo de tecidos (TMA). Foram excluídos os casos cuja amostra do tumor fosse insuficiente para o processamento do TMA ou para o estudo imunohistoquímico e os casos com resultados HER2 duvidosos.

Lâminas, blocos e laudos histopatológicos foram levantados de todos os casos incluídos no estudo. A idade ao diagnóstico, o tamanho do tumor, o grau histológico e o *status* linfonodal foram obtidos a partir dos laudos. O grau histológico foi determinado de acordo com os critérios de Scarff- Bloom-Richardson, modificados por Elston-Ellis (ELSTON *et al.*, 1991).

Imunohistoquímica

Para a construção do TMA, um patologista especialista em patologia mamária identificou, a partir de seções coradas por hematoxilina e eosina (H&E), as áreas melhor preservadas de cada tumor e as marcou no bloco de parafina doador. Um núcleo de 1,0 mm de diâmetro foi retirado do bloco doador

e transferido para o bloco receptor, utilizando um arranizador de tecidos manual (Beecher Instruments[®], Silver Spring, MD, EUA).

Cortes histológicos sequenciais com a espessura de 4 µm foram obtidos por microtomia seriada, desparafinados e hidratados. A recuperação antigênica foi realizada por calor induzido em panela de pressão elétrica digital com tampão combinado de citrato e EDTA (Biocare Medical, EUA) e, após inativação da peroxidase endógena, os anticorpos primários específicos foram aplicados com tempo de incubação de 12 horas. Duas lâminas foram avaliadas em níveis diferentes de corte para cada anticorpo. Os anticorpos primários, clones, diluições, fabricantes, padrões de marcação e pontos de corte utilizados estão listados no quadro 1. Foi empregado o kit de detecção à base de polímeros MACH1 HPR-Polímero Kit[®] (Biocare Medical, EUA). A reação foi revelada com o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB), os cortes foram contracorados com hematoxilina, desidratados e montados com meio de montagem permanente.

As reações foram avaliadas ao microscópio óptico de cinco cabeças, marca Olympus[®], modelo U-MDOB3 (Olympus, JP). Os tumores foram classificados em cinco subtipos, segundo dois painéis imunoistoquímicos, um sem e o outro com o Ki-67 (quadro 2). Os dados obtidos foram correlacionados quanto à concordância entre os subtipos encontrados nas duas classificações. Os subtipos luminal A e luminal B, os únicos cujos parâmetros de classificação foram modificados pela inclusão do Ki-67, foram correlacionados com fatores prognósticos bem estabelecidos, como: o grau histológico, o número de linfonodos comprometidos e o tamanho do tumor.

Análise estatística

A amostra foi caracterizada por meio da estatística descritiva. Para a análise estatística, o teste Kappa de Cohen (coeficiente κ de Cohen) foi aplicado para avaliar a concordância entre os resultados das classificações dos subtipos moleculares. Julgamos os valores de concordância: de 0,01 a 0,20, ligeira; 0,21 - 0,40, regular; 0,41 - 0,60, moderada; 0,61 - 0,80, substancial, e 0,81 - 0,99, concordância quase perfeita (LANDIS *et al.*, 1977). Utilizou-se o teste U de Mann-Whitney para correlacionar os subtipos encontrados segundo os dois modelos com os parâmetros clínico-patológicos. Foi considerado o valor de 5% ($p < 0,05$) como limite de significância estatística. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software SPSS versão 17.0 para Windows (SPSS, Chicago, IL, EUA).

Resultados

A média de idade das pacientes foi de 52,0 anos (DP=), variando entre 27 e 100 anos, sendo que 129 (55,1%) dos casos tinham idade igual ou superior a 50 anos. Quanto ao grau histológico, 111 (67,3%) dos casos, era de grau 2. A dimensão tumoral variou de 0,3 a 20 cm, sendo que 67 (40,1%) dos tumores eram menores que dois centímetros, 69/167 (41,3%) entre 2 e 5 cm e 31 (18,6%) maiores que 5 cm. Apresentaram *status* linfonodal positivo 85 das 133 pacientes submetidas à dissecação axilar (63,9%), conforme a tabela 1.

Dentre os 234 cânceres de mama, quando foi utilizada a classificação sem o marcador Ki-67, foram identificados: 136 casos (58,1%) como luminal A; 19 (8,1%) como luminal B; 27 (11,5%) como superexpressores de HER2; 27

(11,5%) como basaloides e 25 (10,7%) como triplo-negativos não basaloides. Com a inclusão do Ki-67, houve significativa mudança para: 72 (30,8%) casos como luminal A e 83 (35,5%) como luminal B, mantendo-se os percentuais dos demais subtipos (tabela 2). O escore de Kappa entre os painéis imunohistoquímicos para a identificação dos subtipos luminais foi de 0.216 (intervalo de confiança de 95%, de 0.169 a 0.263 ($p < 0.001$)).

Os subtipos luminal A e luminal B quando correlacionados com os fatores prognósticos: grau histológico, tamanho do tumor e o envolvimento linfonodal, mostraram diferença significativa somente após a inclusão do Ki-67 e apenas quanto ao grau histológico ($p < 0,001$).

Discussão

Desde a identificação inicial dos subtipos moleculares do câncer de mama (PEROU *et al.*, 2000), diversas perspectivas têm surgido no campo oncogenômico (WEIGELT *et al.*, 2009). Mudanças são constantemente propostas para uma melhor caracterização dos tumores no campo da biologia molecular, buscando responder às questões clinicamente importantes sobre a evolução clínica, sobre quais pacientes necessitam ou não de terapia sistêmica e que tipo de droga deve ser empregado (SØRLIE, 2004; CIANFROCCA *et al.*, 2009).

Após a descoberta dos subtipos moleculares a partir dos perfis de expressão gênica, diversos estudos têm surgido buscando correlações com os perfis de expressão proteica através da imunohistoquímica (WALKER, 2008). Atualmente, apenas o receptor de estrogênio, o receptor de progesterona e o

HER2 estão consolidados como marcadores clínicos de valor prognóstico e preditivo para uso rotineiro no tratamento do câncer da mama (CHEANG *et al.*, 2009; RAKHA *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010).

Para que haja reprodutibilidade entre os diversos serviços, os critérios de avaliação dos marcadores moleculares devem ser bem estabelecidos, baseados em evidências e padronizados. Adotamos em nosso estudo as diretrizes da Sociedade Americana de Oncologia Clínica (ASCO) e do Colégio Americano de Patologistas (CAP) para os receptores hormonais e para o HER2, os únicos marcadores com recomendações expressas nesses *guidelines* (WOLFF *et al.*, 2007; HAMMOND *et al.*, 2010; HAMMOND *et al.*, 2011). Pela falta de um *guideline* da ASCO e do CAP para o marcador Ki-67, foi adotado o ponto de corte proposto por *Cheang et al.* (recomendado pelo Consenso de St Gallen) (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011) e uma avaliação consensual foi realizada com três observadores experientes, onde as reações imunoistoquímicas realizadas no TMA e na peça original foram avaliadas e uma média de positividade observada em dois ou mais campos, de diferentes intensidades, foi calculada (CHEANG *et al.*, 2009).

Os estudos gênicos associados a estudos de evolução clínica mostraram que o subtipo luminal A apresenta o melhor prognóstico em relação aos demais (PEROU *et al.*, 2000; SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE *et al.*, 2003; SOTIRIOU *et al.*, 2003). Esse subtipo representa cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama na classificação imunoistoquímica usual (CAREY, 2006; MUÑOZ *et al.*, 2009; SALLES *et al.*, 2009; WIECHMANN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009; ABDELKRIM *et al.*, 2010), número semelhante ao

encontrado em nossa casuística (58,1%). O modelo usual de classificação por imunohistoquímica identifica como luminal A os tumores positivos para receptores hormonais (RE e/ou RP) e negativos para superexpressão de HER2. Recentemente, o índice de Ki-67 foi incorporado à classificação, sendo considerados luminais A apenas os tumores com baixo índice proliferativo (<14%) (CHEANG *et al.*, 2009). A prevalência desse subtipo em nossa casuística passou de 58,1% para 30,8% dos casos a partir da adição desse novo parâmetro (tabela 2). Estudos recentes encontraram um percentual aproximado de 44.0% (KENNECKE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010).

O subtipo luminal B é caracterizado por expressar genes associados ao HER2 e a um maior número de genes de proliferação celular, que incluem a expressão de genes MKI67 (Ki-67), CCNB1 e MYBL2 (SØRLIE *et al.*, 2001; SØRLIE *et al.*, 2003). O modelo de classificação atualmente utilizado identifica como luminal B tumores HER2, RE e/ou RP positivos. Proporcionalmente ao subtipo luminal A, houve expressiva mudança do percentual do subtipo luminal B com o uso do Ki-67, de 8,1% para 35,5% dos casos. Dados da literatura trazem uma prevalência do subtipo luminal B de aproximadamente 12% quando avaliado pela classificação usual (CAREY, 2006; MUÑOZ *et al.*, 2009; SALLES *et al.*, 2009; WIECHMANN *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2009; ZHAO *et al.*, 2009; ABDELKRIM *et al.*, 2010) e de 30,5% pela classificação com o uso do Ki-67 (KENNECKE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010).

Pesquisadores trazem uma nova estratificação desse subgrupo em: *luminal B* e *luminal HER2* (KENNECKE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010). O subtipo luminal B mais recentemente tem sido caracterizado pela positividade

de pelo menos um dos receptores hormonais, ser HER2 positivo (*luminal HER2*), e quando o HER2 é negativo, ter um índice de Ki-67 igual ou superior a 14% de células neoplásicas imunomarcadas. Do percentual de tumores luminal B (35,5%), 8,1% correspondem ao subtipo luminal HER2 e o restante, 27,4%, aos tumores luminais de alto índice proliferativo. De 30,5% encontrados por pesquisadores, 6,5% foram luminal HER2 e 24,0% foram luminal com alto índice de Ki-67 (KENNECKE *et al.*, 2010; VODUC *et al.*, 2010).

A nova classificação, com a utilização do índice de Ki-67, iniciada em 2009 (CHEANG *et al.*, 2009) e recomendada pelos painelistas do Consenso de St Gallen de 2011 (GOLDHIRSCH *et al.*, 2011), tem alterado significativamente os valores de prevalência até então encontrados para os subtipos luminais, uma vez que tumores com alto índice proliferativo, até então classificados como luminais A, segundo os novos parâmetros, são classificados como luminais B. A utilização desse novo parâmetro de classificação provavelmente mudará a prevalência até então encontrada para esses tumores nos diversos serviços.

O grau de concordância entre os painéis imunoistoquímicos para a identificação dos subtipos luminais foi baixo, com um escore de Kappa de 0.216 (intervalo de confiança de 95%, de 0.169 a 0.263 ($p < 0.001$)). Isso indica que houve fraca reprodutibilidade entre os modelos de classificação, mostrando que a identificação dos tumores luminais muda significativamente diante a introdução do Ki-67.

Os subtipos luminal A e luminal B, os únicos cujos parâmetros de classificação foram modificados pela inclusão do Ki-67, quando correlacionados com os fatores prognósticos: grau histológico, tamanho do tumor e o envolvimento linfonodal, mostraram diferenças quanto a todos os fatores, com tendência a uma maior correlação com os mesmos no modelo com o Ki-67.

O subtipo luminal A classificado no modelo com o Ki-67 apresentou menor grau histológico, menor comprometimento dos linfonodos e menor tamanho tumoral em relação ao luminal B, dados concordantes com a literatura, que mostra que o maior índice de proliferação celular observado no luminal B traz consigo um pior prognóstico em relação aos tumores luminais A (CHEANG *et al.*, 2009). Porém, somente para o grau histológico, o valor de p obtido foi estatisticamente significativo ($p < 0,001$).

A mudança dos percentuais dos tumores luminais segundo a classificação com o marcador Ki-67 poderá ajudar a elucidar padrões de evolução anteriormente não esperados e auxiliar na melhor definição de quais pacientes seriam mais beneficiadas com a adição da quimioterapia e aquelas em que a quimioterapia não teria benefícios.

Conclusões

Quando utilizada a classificação por imunohistoquímica usual, houve um predomínio do subtipo luminal A. Quando se incluiu o marcador Ki-67 na classificação, houve um predomínio do subtipo luminal B e uma significativa correlação desse subtipo com o grau histológico.

Referências

ABDELKRIM, S.B.; TRABELSI, A.; MISSAOUI, N.; BEIZIG, N.; BDIQUI, A.; ANJORIN, A. *et al.* Distribution of molecular breast cancer subtypes among Tunisian women and correlation with histopathological parameters: A study of 194 patients. **Pathology - Research and Practice**, v.206, n.11, p.772-775, 2010.

BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; DABBS, D.J.; OZBEK, U.; SORAN, A.; JOHNSON, R.R. *et al.* Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy. **Cancer**, v. 116, n. 6, p. 1431-1439, 2010.

BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; MCMANUS, K.; DABBS, D.J. CK5 Is More Sensitive Than CK5/6 in Identifying the “Basal-like” Phenotype of Breast Carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 5, p. 724-730, Nov 1, 2008.

CAREY, L.A. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 21, p. 2492-2502, 2006.

CHEANG, M.C.U.; CHIA, S.K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, May 20, 2009.

CHEANG, M.C.U.; TREABA, D.O.; SPEERS, C.H.; OLIVOTTO, I.A.; BAJDIK, C.D.; CHIA, S.K. *et al.* Immunohistochemical Detection Using the New Rabbit Monoclonal Antibody SP1 of Estrogen Receptor in Breast Cancer Is Superior to Mouse Monoclonal Antibody 1D5 in Predicting Survival. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, p. 5637-5644, 2006.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 59, n. 5, p. 303-313, Sep 1, 2009.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; COATES, A.S.; GELBER, R.D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H.-J. *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, June 27, 2011.

HAMMOND, M.E.; HAYES, D.F.; WOLFF, A.C. Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists Guideline

Recommendations on ER/PgR and HER2 Testing in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. e458, May 20, 2011.

HAMMOND, M.E.H.; HAYES, D.F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D.C.; HAGERTY, K.L.; BADVE, S. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2784-2795, June 1, 2010.

KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M.C.U.; VODUC, D.; SPEERS, C.H. *et al.* Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, May 24, 2010.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

MUÑOZ, M.; FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M.; MARTÍN, S.; SCHNEIDER, J. Prognostic significance of molecular classification of breast invasive ductal carcinoma. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v.280, n.1, p. 43-48, 2009.

NIELSEN, T.O.; HSU, F.D.; 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**, v. 10, n. 16, p. 5367-74, Aug 15 2004.

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

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

RAKHA, E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010.

RAKHA, E.; TAN, D.; FOULKES, W.; ELLIS, I.; TUTT, A.; NIELSEN, T. *et al.* Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 404, 2007.

SALLES, M.D.A.; CÚRCIO, V.S.; PEREZ, A.A.; GOMES, D.S.; GOBBI, H. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 213-222, 2009.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-2675, 2004.

SØRLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, Sep 11, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, Jul 8, 2003.

SOTIRIOU, C.; NEO, S.-Y.; MCSHANE, L.M.; KORN, E.L.; LONG, P.M. *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.100, n.18, p.10393-10398, 2003.

VODUC, K.D.; CHEANG, M.C.U.; TYLDESLEY, S.; GELMON, K.; NIELSEN, T.O.; KENNECKE, H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684-1691, Apr 1, 2010.

WALKER, R.A. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 6, p. 689-696, June 1, 2008.

WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J.S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nat Rev Clin Oncol**, v. 6, n. 12, p. 718-730, 2009.

WIECHMANN, L.; SAMPSON, M.; STEMPEL, M.; JACKS, L.; PATIL, S.; KING, T. *et al.* Presenting Features of Breast Cancer Differ by Molecular Subtype. **Annals of Surgical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 2705-2710, 2009.

WOLFF, A.C.; HAMMOND, M.E.; SCHWARTZ, J.N.; HAGERTY, K.L.; ALLRED, D.C.; COTE, R.J. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol**, v25, n1, p118-45, 2007.

ZHANG, H.M.; ZHANG, B.N.; XUAN, L.X.; ZHAO, P. Clinical characteristics and survival in the operable breast cancer patients with different molecular subtypes. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 31, n. 6, p. 447-51, Jun 2009.

ZHAO, J.; LIU, H.; WANG, M.; GU, L.; GUO, X.; GU, F. *et al.* Characteristics and prognosis for molecular breast cancer subtypes in Chinese women. **Journal of Surgical Oncology**, v. 100, n. 2, p. 89-94, 2009.

Quadros e Tabelas

Quadro 1 – Resumo sobre os anticorpos empregados neste estudo.					
Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Imunomarcção	Valores de Corte (positividade)
RE	SP1	1: 500	Biocare, EUA	Nuclear	≥ 1%
RP	16	1: 500	Novocastra, RU	Nuclear	≥ 1%
HER2*	5A2	1: 2000	Novocastra, RU	Membrana citoplasmática	3+
Ki-67	MM1	1: 200	Biocare, EUA	Nuclear	Baixo <14%; Alto ≥14%
CK5	XM26	1: 400	Novocastra, RU	Citoplasmática	≥ 10%
EGFR	111.6	1: 250	Biocare, EUA	Membranar/ Citoplasmática	≥ 10%

* HER2 exibindo marcação intensa e uniforme da membrana citoplasmática em mais de 30% das células tumorais.

Abreviações: HER2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR, receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; CK5, citoceratina 5.

Quadro 2 – Perfis imunofenotípicos para a classificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.		
	Classificação Usual	Classificação com o índice de Ki-67 de 14%
Subtipo Molecular	Padrão de Imunomarcção	Padrão de Imunomarcção
Luminal A	RE+ e/ou RP+, HER2-	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
Luminal B	RE+ e/ou RP+, HER2+	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14% RE+ e/ou RP+, HER2+ (<i>Luminal HER2</i>)
Superexpressão de HER2	RE-, RP- e HER2+	RE-, RP- e HER2+
Basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
Triplo-negativo não basaloide	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

Abreviações: HER2, receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano; EGFR, receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico; RE, receptor de estrogênio; RP, receptor de progesterona; CK5, citoceratina 5.

Referências: (CHEANG *et al.*, 2006; PAREDES *et al.*, 2007; RAKHA *et al.*, 2007; WOLFF *et al.*, 2007; CHEANG *et al.*, 2009; BHARGAVA *et al.*, 2010; HAMMOND *et al.*, 2010)

Tabela 1: Características da população de 234 casos de carcinoma ductal invasor de mama.

Características da população	n (%)
Idade ao diagnóstico (anos)	
Média (\pm DP)	52.0 (\pm 13.25)
< 50	105 (44.87%)
50 — 60	68 (29.06%)
\geq 60	61 (26.07%)
Grau histológico †	
1	26 (15.76%)
2	111 (67.27%)
3	28 (16.97%)
Tamanho do tumor (cm)	
Mediana (IIQ)	3.00 (2.50)
\leq 2	67 (40.12%)
2 — 5	69 (41.32%)
> 5	31 (18.56%)
Status Linfonodal	
Mediana (IIQ)	1.00 (7.00)
Negativo	48 (36.09%)
Positivo	
1 — 3	36 (27.07%)
4 — 9	22 (16.54%)
\geq 10	27 (20.30%)

† Sistema de graduação de Scarff–Bloom–Richardson modificado por Elston e Ellis.

DP – desvio padrão; IIQ – intervalo interquartil.

Tabela 2 – Reprodutibilidade entre dois diferentes painéis de classificação por imunohistoquímica dos subtipos moleculares do câncer de mama de acordo com as prevalências encontradas.

Subtipo	Classificação Usual	Classificação com o índice de Ki-67 de 14%
	n (%)	n (%)
Luminal A	136 (58.1%)	72 (30.8%)
Luminal B	19 (8.1%)	83 (35.5%)
Superexpressão de HER2	27 (11.5%)	27 (11.5%)
Basaloide	27 (11.5%)	27 (11.5%)
Triplo-negativo não basaloide	25 (10.7%)	25 (10.7%)
Total	234 (100.0%)	234 (100.0%)

O coeficiente de reprodutibilidade *Kappa* entre os subtipos luminal A e B é de 0.216 ($p < 0.001$), e de 0.637 ($p < 0.001$) entre todos os subtipos.

Tabela 3 – Distribuição das características clínico-patológicas entre os subtipos moleculares do câncer de mama.

		Luminal A ¹	Luminal B ¹	<i>p</i>	Luminal A ²	Luminal B ²	<i>p</i>
Grau histológico † n (%)	I	25 (26.00%)	0 (-)		23 (41.10%)	2 (4.00%)	
	II	63 (65.60%)	10 (100.00%)	0.258	31 (55.40%)	42 (84.00%)	<0.001
	III	8 (8.30%)	0 (-)		2 (3.60%)	6 (12.00%)	
Status linfonodal positivo	Mediana (IIQ)	1.00 (6.00)	0.00 (7.00)	0.640	1.00 (4.00)	2.00 (12.00)	0.235
Tamanho do tumor (cm)	Mediana (IIQ)	2.50 (2.00)	3.50 (1.80)	0.174	2.10 (1.20)	3.15 (2.90)	0.092

1. Classificação Usual, sem o índice Ki-67. 2. Classificação utilizando o ponto de corte de 14% de Ki-67.

Valor de *p* calculado pelo teste de *Mann-Whitney* considerado estatisticamente significativo se $p < 0.05$.

† Sistema de graduação de Scarff–Bloom–Richardson modificado por Elston e Ellis.

IIQ – intervalo interquartil.

7. CONCLUSÕES DA DISSERTAÇÃO

Atualmente, além das classificações histopatológicas usuais empregadas no estudo dos cânceres de mama, novos parâmetros de subclassificação têm surgido baseadas em estudos moleculares e que tem permitido entender certas evoluções que não são explicadas com as classificações atuais. Entretanto, a associação dos marcadores moleculares e a classificação biológica dos tumores ainda não têm definições sólidas, necessitando de um maior número de estudos que possa propiciar um entendimento maduro e robusto sobre os tipos biológicos dos tumores de mama.

Quando utilizada a subclassificação usual, houve predomínio do subtipo luminal A. Quando incluído o Ki-67, houve predomínio do subtipo luminal B, evidenciando alteração na distribuição percentual dos subtipos de câncer de mama de acordo com a classificação utilizada. Isso poderá explicar padrões de evolução anteriormente não esperados. Acreditamos que a subclassificação, com o uso do Ki-67, possa trazer uma melhor correlação com as evoluções das pacientes atendidas em nosso serviço.

O tratamento individualizado é cada vez mais aplicado, tendo por base os novos conhecimentos moleculares que permitem a seleção de doentes e de terapias efetivas com menores efeitos adversos. O uso de Ki-67 como um marcador preditivo e prognóstico do câncer de mama tem sido amplamente investigado. Todavia, mais estudos e ensaios clínicos são necessários para determinar os seus reais benefícios e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente, além das classificações histopatológicas usuais empregadas no estudo dos cânceres de mama, novos parâmetros de subclassificação têm surgido baseadas em estudos moleculares e que tem permitido entender certas evoluções que não são explicadas com as classificações atuais. Entretanto, a associação dos marcadores moleculares e a classificação biológica dos tumores ainda não têm definições sólidas, necessitando de um maior número de estudos que possa propiciar um entendimento maduro e robusto sobre os tipos biológicos dos tumores de mama.

Quando utilizada a subclassificação usual, houve predomínio do subtipo luminal A. Quando incluído o Ki-67, houve predomínio do subtipo luminal B, evidenciando alteração na distribuição percentual dos subtipos de câncer de mama de acordo com a classificação utilizada. Isso poderá explicar padrões de evolução anteriormente não esperados. Acreditamos que a subclassificação, com o uso do Ki-67, possa trazer uma melhor correlação com as evoluções das pacientes atendidas em nosso serviço.

O tratamento individualizado é cada vez mais aplicado, tendo por base os novos conhecimentos moleculares que permitem a seleção de doentes e de terapias efetivas com menores efeitos adversos. O uso de Ki-67 como um marcador preditivo e prognóstico do câncer de mama tem sido amplamente investigado. Todavia, mais estudos e ensaios clínicos são necessários para determinar os seus reais benefícios e para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas.

REFERÊNCIAS

ABDELKRIM, S.B.; TRABELSI, A.; MISSAOUI, N.; BEIZIG, N.; BDIQUI, A.; ANJORIN, A. *et al.* Distribution of molecular breast cancer subtypes among Tunisian women and correlation with histopathological parameters: A study of 194 patients. **Pathology - Research and Practice**, v. 206, n. 11, p. 772-775, 2010.

ABREU, E.D.; KOIFMAN, S. Fatores Prognósticos no Cancer de Mama Femina. **Revista brasileira de cancerologia / Instituto Nacional do Cancer**, v. 48, n. 1, p. 113-131, Jan - Mar 2002.

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**, v. 98, n. 9, p. 1802-10, Nov 1 2003.

BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; DABBS, D.J.; OZBEK, U.; SORAN, A.; JOHNSON, R.R. *et al.* Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy. **Cancer**, v. 116, n. 6, p. 1431-1439, 2010.

BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; MCMANUS, K.; DABBS, D.J. CK5 Is More Sensitive Than CK5/6 in Identifying the "Basal-like" Phenotype of Breast Carcinoma. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 130, n. 5, p. 724-730, Nov 1, 2008a.

BHARGAVA, R.; CHIVUKULA, M.; BERIWAL, S.; DABBS, D.J. Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Carcinoma: Quantitation is Therapeutically Important. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 15, n. 5, p. 304-305 10.1097/PAP.0b013e3181832381, 2008b.

BOTTINI, A.; BERRUTI, A.; BERSIGA, A.; BRIZZI, M.P.; 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**, v. 85, n. 8, p. 1106-12, Oct 19 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil / Instituto Nacional do Câncer (INCA). Rio de Janeiro, RJ, 2011. ISSN 978-85-7318-161-6. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br> >. Acesso em: 15 mar. 2011.

CAREY, L.A. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA: The Journal of the American Medical Association**, v. 295, n. 21, p. 2492-2502, 2006.

CHEANG, M.C.U.; CHIA, S.K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J. *et al.* Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, May 20, 2009.

CHEANG, M.C.U.; TREABA, D.O.; SPEERS, C.H.; OLIVOTTO, I.A.; BAJDIK, C.D.; CHIA, S.K. *et al.* Immunohistochemical Detection Using the New Rabbit Monoclonal Antibody SP1 of Estrogen Receptor in Breast Cancer Is Superior to Mouse Monoclonal Antibody 1D5 in Predicting Survival. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, p. 5637-5644, 2006.

CHEANG, M.C.U.; VODUC, D.; BAJDIK, C.; LEUNG, S.; MCKINNEY, S.; CHIA, S.K. *et al.* Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. **Clinical Cancer Research**, v. 14, n. 5, p. 1368-1376, Mar 1, 2008.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L.J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **Oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606-616, Nov 1, 2004.

CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 59, n. 5, p. 303-313, Sep 1 2009.

CONSTANTINIDOU, A.; SMITH, I. Is there a case for anti-HER2 therapy without chemotherapy in early breast cancer? **The Breast**, v. 20, Supplement 3, n. 0, p. S158-S161, 2011.

EIFEL, P.; AXELSON, J.A.; COSTA, J.; CROWLEY, J.; CURRAN, W.J.; DESHLER, A. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, November 1–3, 2000. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 93, n. 13, p. 979-989, Jul 4, 2001.

EKMEKTZOGLOU, K.A.; XANTHOS, T.; GERMAN, V.; ZOGRAFOS, G.C. Breast cancer: From the earliest times through to the end of the 20th century. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, v. 145, n. 1, p. 3-8, 2009.

ELSTON, C.W.; ELLIS, I.O. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410, 1991.

FITZGIBBONS, P.L.; PAGE, D.L.; WEAVER, D.; THOR, A.D.; ALLRED, D.C.; CLARK, G.M. *et al.* Prognostic Factors in Breast Cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 124, n. 7, p. 966-978, 2000.

FREITAS-JUNIOR, R.; FREITAS, N.; CURADO, M.; MARTINS, E.; MOREIRA, M.; E SILVA, C. Variations in breast cancer incidence per decade of life (Goiânia, GO, Brazil): 16-year analysis. **Cancer Causes and Control**, v. 19, n. 7, p. 681-687, 2008.

FREITAS-JUNIOR, R.; FREITAS, N.M.A.; CURADO, M.P.; MARTINS, E.; SILVA, C.M.B.; RAHAL, R.M.S. *et al.* Incidence trend for breast cancer among young women in Goiânia, Brazil. **Sao Paulo Medical Journal**, v. 128, p. 81-84, 2010.

GEYER, C.E.; FORSTER, J.; LINDQUIST, D.; CHAN, S.; ROMIEU, C.G.; PIENKOWSKI, T. *et al.* Lapatinib plus Capecitabine for HER2-Positive Advanced Breast Cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 355, n. 26, p. 2733-2743, 2006.

GEYER, F.C.; MARCHIÒ, C.; REIS-FILHO, J.S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**, v. 41, n. 1, p. 77-88, 2009.

GOLDHIRSCH, A.; GLICK, J.H.; GELBER, R.D.; COATES, A.S.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H.-J. Meeting Highlights: International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2005. **Annals of Oncology**, v. 16, n. 10, p. 1569-1583, Oct, 2005.

GOLDHIRSCH, A.; WOOD, W.C.; COATES, A.S.; GELBER, R.D.; THÜRLIMANN, B.; SENN, H.-J. *et al.* Strategies for subtypes—dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Annals of Oncology**, Jun 27, 2011.

GUINEBRETIERE, J.M.; MENET, E.; TARDIVON, A.; CHEREL, P.; VANEL, D. Normal and pathological breast, the histological basis. **European Journal of Radiology**, v. 54, n. 1, p. 6-14, 2005.

HAMMOND, M.E.; HAYES, D.F.; WOLFF, A.C. Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists Guideline Recommendations on ER/PgR and HER2 Testing in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 15, p. e458, May 20, 2011.

HAMMOND, M.E.H.; HAYES, D.F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D.C.; HAGERTY, K.L.; BADVE, S. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 16, p. 2784-2795, Jun 1, 2010.

HERSCHKOWITZ, J.; SIMIN, K.; WEIGMAN, V.; MIKAELIAN, I.; USARY, J.; HU, Z. *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biology**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007.

IRVIN JR, W.J.; CAREY, L.A. What is triple-negative breast cancer? **European Journal of Cancer**, v. 44, n. 18, p. 2799-2805, 2008.

KAMANGAR, F.; DORES, G.M.; ANDERSON, W.F. Patterns of Cancer Incidence, Mortality, and Prevalence Across Five Continents: Defining Priorities to Reduce Cancer Disparities in Different Geographic Regions of the World. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 14, p. 2137-2150, May 10, 2006.

KENNECKE, H.; YERUSHALMI, R.; WOODS, R.; CHEANG, M.C.U.; VODUC, D.; SPEERS, C.H. *et al.* Metastatic Behavior of Breast Cancer Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, May 24, 2010.

KESHGEGIAN, A.A.; CNAAN, A. Proliferation markers in breast carcinoma. Mitotic figure count, S-phase fraction, proliferating cell nuclear antigen, Ki-67 and MIB-1. **Am J Clin Pathol**, v. 104, n. 1, p. 42-9, Jul 1995.

KONONEN, J.; BUBENDORF, L.; KALLIONIMENI, A.; BARLUND, M.; SCHRAML, P.; LEIGHTON, S. *et al.* Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. **Nat Med**, v. 4, n. 7, p. 844-847, 1998.

LAKHANI, S.R.; VAN DE VIJVER, M.J.; JACQUEMIER, J.; ANDERSON, T.J.; OSIN, P.P.; 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. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 9, p. 2310-2318, 2002.

LANDIS, J.R.; KOCH, G.G. The Measurement of Observer Agreement for Categorical Data. **Biometrics**, v. 33, n. 1, p. 159-174, 1977.

LEHR, H.A.; HANSEN, D.A.; 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**, v. 30, n. 11, p. 1314-20, Nov 1999.

LIVASY, C.A.; KARACA, G.; NANDA, R.; TRETIAKOVA, M.S.; OLOPADE, O.I.; MOORE, D.T. *et al.* Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol**, v. 19, n. 2, p. 264-271, 2005.

MARQUEZ, A.; WU, R.; ZHAO, J.; TAO, J.; SHI, Z. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic In Situ: Hybridization (CISH(TM)) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. **Diagnostic Molecular Pathology**, v. 13, n. 1, p. 1-8, 2004.

MARTINS, E.; FREITAS-JUNIOR, R.; CURADO, M.P.; FREITAS, N.M.; DE OLIVEIRA, J.C.; SILVA, C.M. Evolucao temporal dos estadios do cancer de mama ao diagnostico em um registro de base populacional no Brasil central. **Rev Bras Ginecol Obstet**, v. 31, n. 5, p. 219-23, May 2009.

MUÑOZ, M.; FERNÁNDEZ-ACEÑERO, M.; MARTÍN, S.; SCHNEIDER, J. Prognostic significance of molecular classification of breast invasive ductal carcinoma. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 280, n. 1, p. 43-48, 2009.

NIELSEN, T.O.; HSU, F.D.; 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**, v. 10, n. 16, p. 5367-74, 2004.

OSBORNE, C.K.; SCHIFF, R.; ARPINO, G.; LEE, A.S.; HILSENBECK, V.G. Endocrine responsiveness: Understanding how progesterone receptor can be used to select endocrine therapy. **The Breast**, v. 14, n. 6, p. 458-465, 2005.

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

PARKER, J.S.; MULLINS, M.; CHEANG, M.C.U.; LEUNG, S.; VODUC, D.; VICKERY, T. *et al.* Supervised Risk Predictor of Breast Cancer Based on Intrinsic Subtypes. **Journal of Clinical Oncology**, v. 27, n. 8, p. 1160-1167, Mar 10, 2009.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global Cancer Statistics, 2002. **CA Cancer J Clin**, v. 55, n. 2, p. 74-108, Mar 1, 2005.

PEROU, C.M.; SORLIE, T.; EISEN, M.B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S.S.; REES, C.A. *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000.

PRAT, A.; PARKER, J.; KARGINOVA, O.; FAN, C.; LIVASY, C.; HERSCHKOWITZ, J. *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010.

QUADROS, L.G.D.A.; GEBRIM, L.H. A pesquisa do linfonodo sentinela para o câncer de mama na prática clínica do ginecologista brasileiro. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, p. 158-164, 2007.

RAKHA, E.; REIS-FILHO, J.; BAEHNER, F.; DABBS, D.; DECKER, T.; EUSEBI, V. *et al.* Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Research**, v. 12, n. 4, p. 207, 2010a.

RAKHA, E.; REIS-FILHO, J.; ELLIS, I. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 120, n. 2, p. 293-308, 2010b.

RAKHA, E.; TAN, D.; FOULKES, W.; ELLIS, I.; TUTT, A.; NIELSEN, T. *et al.* Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? **Breast Cancer Research**, v. 9, n. 6, p. 404, 2007.

RAKHA, E.A.; EL-SAYED, M.E.; REIS-FILHO, J.S.; ELLIS, I.O. Expression profiling technology: its contribution to our understanding of breast cancer. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 67-81, 2008.

REIS-FILHO, J.; MILANEZI, F.; CARVALHO, S.; SIMPSON, P.; STEELE, D.; SAVAGE, K. *et al.* Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic in situ hybridization analysis. **Breast Cancer Research**, v. 7, n. 6, p. R1028 - R1035, 2005.

REIS-FILHO, J.S.; TUTT, A.N.J. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology**, v. 52, n. 1, p. 108-118, 2008.

REIS-FILHO, J.S.; WESTBURY, C.; PIERGA, J.-Y. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 3, p. 225-231, Mar 1, 2006.

RIBEIRO-SILVA, A.; RAMALHO, L.N.Z.; GARCIA, S.B.; BRANDÃO, D.F.; CHAHUD, F.; ZUCOLOTO, S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. **Histopathology**, v. 47, n. 5, p. 458-466, 2005.

ROUZIER, R.; PEROU, C.M.; SYMMANS, W.F.; IBRAHIM, N.; CRISTOFANILLI, M.; ANDERSON, K. *et al.* Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 16, p. 5678-85, Aug 15 2005.

SALLES, M.D.A.; CÚRCIO, V.S.; PEREZ, A.A.; GOMES, D.S.; GOBBI, H. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 45, p. 213-222, 2009.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. **Journal of Cellular Physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SHOKER, B.S.; JARVIS, C.; CLARKE, R.B.; ANDERSON, E.; HEWLETT, J.; DAVIES, M.P.A. *et al.* Estrogen Receptor-Positive Proliferating Cells in the Normal and Precancerous Breast. **The American Journal of Pathology**, v. 155, n. 6, p. 1811-1815, 1999.

SØRLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-2675, 2004.

SØRLIE, T.; PEROU, C.M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H. *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, Sep 11, 2001.

SØRLIE, T.; TIBSHIRANI, R.; PARKER, J.; HASTIE, T.; MARRON, J.S.; NOBEL, A. *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 14, p. 8418-8423, Jul 8, 2003.

SOTIRIOU, C.; NEO, S.-Y.; MCSHANE, L.M.; KORN, E.L.; LONG, P.M.; JAZAERI, A. *et al.* Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 18, p. 10393-10398, Sep 2, 2003.

URRUTICOECHEA, A.; SMITH, I.E.; DOWSETT, M. Proliferation Marker Ki-67 in Early Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 23, n. 28, p. 7212-7220, Oct 1, 2005.

VENTER, J.C.; ADAMS, M.D.; MYERS, E.W.; LI, P.W.; MURAL, R.J.; SUTTON, G.G. *et al.* The Sequence of the Human Genome. **Science**, v. 291, n. 5507, p. 1304-1351, Feb 16, 2001.

VODUC, K.D.; CHEANG, M.C.U.; TYLDESLEY, S.; GELMON, K.; NIELSEN, T.O.; KENNECKE, H. Breast Cancer Subtypes and the Risk of Local and Regional Relapse. **Journal of Clinical Oncology**, v. 28, n. 10, p. 1684-1691, Apr 1, 2010.

WALKER, R.A. Immunohistochemical markers as predictive tools for breast cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 61, n. 6, p. 689-696, 2008.

WEIGEL, M.T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocrine-Related Cancer**, v. 17, n. 4, p. R245-R262, Dec 1, 2010.

WEIGELT, B.; MACKAY, A.; A'HERN, R.; NATRAJAN, R.; TAN, D.S.P.; DOWSETT, M. *et al.* Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 4, p. 339-349, 2010.

WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J.S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nat Rev Clin Oncol**, v. 6, n. 12, p. 718-730, 2009.

WIECHMANN, L.; SAMPSON, M.; STEMPEL, M.; JACKS, L.; PATIL, S.; KING, T. *et al.* Presenting Features of Breast Cancer Differ by Molecular Subtype. **Annals of Surgical Oncology**, v. 16, n. 10, p. 2705-2710, 2009.

WOLFF, A.C.; HAMMOND, M.E.; SCHWARTZ, J.N.; HAGERTY, K.L.; ALLRED, D.C.; COTE, R.J. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 1, p. 118-45, Jan 1, 2007.

ZHANG, D.-H.; SALTO-TELLEZ, M.; CHIU, L.-L.; SHEN, L.; KOAY, E.S.-C. Tissue microarray study for classification of breast tumors. **Life Sciences**, v. 73, n. 25, p. 3189-3199, 2003.

ZHANG, H.M.; ZHANG, B.N.; XUAN, L.X.; ZHAO, P. Clinical characteristics and survival in the operable breast cancer patients with different molecular subtypes. **Zhonghua Zhong Liu Za Zhi**, v. 31, n. 6, p. 447-51, Jun 2009.

ZHAO, J.; LIU, H.; WANG, M.; GU, L.; GUO, X.; GU, F. *et al.* Characteristics and prognosis for molecular breast cancer subtypes in Chinese women. **Journal of Surgical Oncology**, v. 100, n. 2, p. 89-94, 2009.

ANEXOS

ANEXO 1 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

ANEXO 2 – Normas para publicação da Revista Femina

ANEXO 1. Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E DO DESPORTO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
HOSPITAL DAS CLÍNICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA MÉDICA HUMANA E ANIMAL



PROTOCOLO CEPMHA/HC/UFG Nº 175/09

Goiânia, 10/12/2009

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL: *Biomédico: Magno Belém Cirqueira*

Orientadora: *Prof.^a Marise Amaral Rebouças Moreira*

TÍTULO: *“Subclassificação por imunohistoquímica de carcinomas ductais de mama do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás no período de 2003 a 2008”*

Área Temática: *Grupo III*

Local de realização: *Hospital Das Clínicas?UFG – Departamento de Anatomia Patológica*

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, analisou e aprovou o projeto de pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e o mesmo foi considerado em acordo com os princípios éticos vigentes.

Informamos que não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP- Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

Após início do estudo, o pesquisador responsável **deverá encaminhar ao CEPMHA/HC/UFG, relatórios semestrais** do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

O CEPMHA/HC/UFG pode, a qualquer momento, fazer escolha aleatória de estudo em desenvolvimento para avaliação e verificação do cumprimento das normas da Resolução 196/96 (*Manual Operacional Para Comitês de Ética em Pesquisa – Item 13*)


Farm. José Mário Coelho Moraes
Coordenador do CEPMHA/HC/UFG

ANEXO 2. Normas para publicação da Revista Femina

AOS AUTORES

Informações gerais

Femina é uma publicação mensal da Federação Brasileira das Associações de Ginecologia e Obstetrícia (FEBRASGO) que tem como principal objetivo divulgar artigos de revisão sistemática, além de artigos relacionados a tópicos específicos de Ginecologia ou Obstetrícia.

Os autores podem colaborar com a Femina com os seguintes tipos de manuscritos:

- Cartas ao Editor, que devem ser sucintas e apresentar um ponto de vista a respeito de artigo publicado na revista – não se deve ter como propósito primeiro polemizar com o colega;
- Artigos de Revisões Sistemáticas ou Meta-análise; sugere-se a leitura dos editoriais das edições de maio, junho e agosto de 2008 da Femina;
- Recomendações das Comissões Nacionais Especializadas da FEBRASGO;
- Normas das Comissões Nacionais Especializadas, para divulgação de normas e condutas aprovadas pelas Comissões Nacionais Especializadas da FEBRASGO.

Submissão do manuscrito

A submissão dos artigos ocorre pelo sistema cego (sem identificação de autores e instituições). O manuscrito é, então, analisado por conselheiros da revista, que geram pareceres, os quais são examinados, também de maneira cega, pelo editor científico e pelos editores associados, que decidem sobre a conveniência da publicação. O Corpo Editorial seleciona, a cada edição, os artigos que serão publicados imediatamente.

O recebimento do artigo pela editoria da revista Femina não assegura sua publicação; os autores são devidamente comunicados acerca dos pareceres.

Preparação do original

O número máximo de autores para cada manuscrito é 7 e o número máximo de referências é 25 – exceto para artigos de revisão, que podem contar com até 50 referências.

O tamanho dos artigos deverá respeitar os limites da seção a que se destina:

- Artigo de Revisão Sistemática ou Meta-análise: 10 a 20 páginas – por volta de 10.000 a 35.000 caracteres;
- Cartas ao Editor: até 2 páginas – até 3.500 caracteres;
- Normas das Comissões Nacionais Especializadas: número de páginas/caracteres a critério da diretoria da FEBRASGO;
- Resumo dos dois melhores trabalhos apresentados em congressos ou encontros anuais regionais de cada federada: as normas para composição do texto são enviadas para os presidentes das federadas.

O original deve ser digitado em papel A4 e com espaçamento de 2 cm entre linhas (inclusive nas tabelas) e margens de 3 cm. O processador de texto aceito é o Word for Windows, de qualquer versão. As afirmações feitas nos artigos são de responsabilidade integral dos autores. Pede-se atenção à correção do português e do inglês.

Caixas-altas (letras maiúsculas) e sublinhados devem ser evitados; se julgar conveniente, expressá-los em itálico. O itálico deve ser reservado também para termos estrangeiros.

Não usar pontos em sigla (INSS e não I.N.S.S.). Evitar siglas ou abreviaturas que não sejam oficiais ou clássicas e sempre explicá-las ao serem usadas pela vez primeira.

Para a apresentação do manuscrito, pede-se que:

- notas de rodapé não sejam utilizadas;

- na página de rosto, seja inserido um título em português e sua versão em inglês;
- ainda na página de rosto, constem nome completo e titulação do(s) autor(es), nome da instituição onde os autores atuam, endereço completo, telefone, fax e e-mail do autor correspondente – com exceção dos Artigos de Revisão que dispensam este item;
- na segunda página, seja apresentado o resumo do trabalho, com o mínimo de 100 e máximo de 200 palavras. O texto deve ser corrido (sem parágrafo) e sem títulos ou subtítulos das partes. O resumo deve ainda apresentar de três a cinco palavras-chave selecionadas entre os termos que constam no Descritores em Ciência da Saúde (DeCS), disponíveis no endereço eletrônico <http://decs.bvs.br>. Para as seções Carta ao Editor e Normas das Comissões Especializadas, não é necessário resumo e palavras-chave.
- na página seguinte, apresentar o *Abstract*, uma versão fiel do Resumo, e as *key words*, correspondentes aos termos em português encontrados no DeCS;
- na quarta página e subsequentes, deve ter início o corpo do trabalho.

Em geral, trabalhos de revisão sistemática ou meta-análise devem dispor de:

- introdução, que deve ser breve e comunicar a relevância do tema. Deve conter ainda o objetivo do trabalho;
- metodologia, item que deve mencionar as palavras-chave empregadas nos sites de busca; o período em que a busca foi realizada; os sites de busca utilizados; o número de trabalhos encontrados; os critérios de seleção para inclusão/exclusão dos trabalhos encontrados;
- discussão ou comentário, que se destine a uma análise crítica dos trabalhos selecionados. Mencionar no texto o grau de evidência científica (A, B, C e D), seguida da referência. Por exemplo: "Evidências atuais demonstram que a prescrição profilática de progesterona é uma importante estratégia na prevenção do nascimento prematuro em grupos específicos de gestantes¹⁻⁴ (A). No entanto, alguns estudos não apresentaram resultados satisfatórios^{5,6} (A).";
- conclusão ou recomendações finais, para trazer ao leitor a resposta ao objetivo do trabalho.

Resalta-se a necessidade do uso da medicina baseada em evidência para categorização dos trabalhos citados na revisão, utilizando-se a classificação proposta pela Associação Médica Brasileira (AMB, <http://www.amb.org.br>):

Grau de recomendação e força de evidência

A: Estudos experimentais ou observacionais de melhor consistência (meta-análises ou ensaios clínicos randomizados)

B: Estudos experimentais ou observacionais de menos consistência (outros ensaios clínicos não-randomizados ou estudos observacionais ou estudos caso-controle)

C: Relatos ou séries de casos (estudos não-controlados)

D: Opinião desprovida de avaliação crítica, baseada em consensos, estudos fisiológicos ou modelos animais

Citações e referências

As citações e as referências deverão ser apresentadas de acordo com os requisitos do *International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE) Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals* –

consultar links: <http://www.icmje.org>; http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html e <http://www.bu.ufsc.br/bccsm/vancouver.html> (em português).

São aceitas até 25 referências – exceto para artigos de revisão, que podem apresentar até 50 referências, com ênfase para as mais recentes ou de maior relevância. Em trabalhos de revisão sistemática ou meta-análise, é indispensável, nas referências, a menção do seu nível de evidência científica. A Editoria Científica se reserva o direito, em casos especiais e selecionados, de permitir a inserção de mais de 25 referências.

Como o tema é de revisão sistemática ou meta-análise, não se justifica – e não é aceita – a inexistência de referências recentes – publicada nos três últimos anos.

Exemplos de referências

Artigos de revistas

- Até seis autores:
Halpern SD, Ubel PA, Caplan AL. Solid-organ transplantation in HIV-infected patients. *N Engl J Med*. 2002;347(4):284-7.
Mais de 6 autores:
- Rose ME, Huerbin MB, Melick J, Marion DW, Palmer AM, Schiding JK, et al. Regulation of interstitial excitatory amino acid concentrations after cortical contusion injury. *Brain Res*. 2002;935(1-2):40-6.

Livros

FEBRASGO. Tratado de Ginecologia. Rio de Janeiro: Revinter; 2000.
Eisen HN. Immunology: an introduction to molecular and cellular principles of the immune response. New York: Harper and Row; 1976.
Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical microbiology. 4th ed. St. Louis: Mosby; 2002.
Gilstrap LC 3rd, Cunningham FG, VanDorsten JP, editors. Operative obstetrics. 2nd ed. New York: McGraw-Hill; 2002.

Capítulos de livros

Meltzer PS, Kallioniemi A, Trent JM. Chromosome alterations in human solid tumors. In: Vogelstein B, Kinzler KW, editors. The genetic basis of human cancer. New York: McGraw-Hill; 2002. p. 93-113.

Teses e dissertações

Borkowski MM. Infant sleep and feeding: a telephone survey of Hispanic Americans [dissertation]. Mount Pleasant (MD): Central Michigan University; 2002.

Trabalhos em eventos

Christensen S, Oppacher F. An analysis of Koza's computational effort statistic for genetic programming. In: Foster JA, Lutton E, Miller J, Ryan C, Tettamanzi AG, editors. Genetic programming. EuroGP 2002: Proceedings of the 5th European Conference on Genetic Programming; 2002 Apr 3-5; Kinsdale, Ireland. Berlin: Springer; 2002. p. 182-91.

Artigos de revistas na Internet

Abood S. Quality improvement initiative in nursing homes: the ANA acts in an advisory role. *Am J Nurs [serial on the Internet]*. 2002 Jun [cited 2002 Aug 12];102(6):[about 3 p.]. Available from: <http://www.nursingworld.org/AJN/2002/june/Wawatch.htm>

Monografias na Internet

Foley KM, Gelband H, editors [Internet]. Improving palliative care for cancer. Washington: National Academy Press; 2001 [cited 2002 Jul. 9]. Available from: <http://www.nap.edu/books/0309074029/html/>

Homepage/Website

Cancer-Pain.org [Internet]. New York: Association of Cancer Online Resources, Inc.; c2000-01 [updated 2002 May 16; cited 2002 Jul. 9]. Available from: <http://www.cancer-pain.org>.
American Medical Association [Internet]. Chicago: The Association; c1995-2002 [updated 2001 Aug. 23; cited 2002 Aug. 12]. AMA Office of Group Practice Liaison; [about 2 screens]. Available from: <http://www.ama-assn.org/ama/pub/category/1736.html>

Elementos não-textuais

Gráficos, gravuras, fotografias, esquemas, desenhos, tabelas, quadros, fórmulas etc. constituem os elementos não-textuais. Eles servem à elucidação, explicação e simplificação do entendimento do texto, devendo ser autoexplicativos.

Os elementos devem ser mencionados no texto como Figura, Tabela, Gráfico ou Quadro, e numerados sequencialmente com algarismos arábicos, devendo possuir, além de identificação e número, título e fonte no rodapé. As tabelas deverão ser elaboradas em conformidade com a Norma de Apresentação Tabular do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), de 1993. Desenhos, gráficos, figuras ou outras ilustrações não-originais já publicados por outros autores devem ser submetidos à autorização para publicação na Femina.

Envio do original

Os manuscritos devem ser enviados exclusivamente por meio eletrônico, para o e-mail femina.febrasgo@gmail.com ou pelo endereço <http://www.febrasgo.org.br>, juntamente de carta de submissão (escaneada) assinada por todos os autores e com a declaração de que:

1. o manuscrito não foi submetido e/ou publicado por outra revista anteriormente;
2. a versão final foi lida e aprovada por todos os autores;
3. os direitos autorais serão repassado à FEBRASGO caso o artigo seja publicado.

O cadastro (login e senha) no endereço <http://www.febrasgo.org.br> permite o acompanhamento de todo o processo de avaliação e publicação do artigo.