

ALINE SCHMITT POLIDORO

**FENÓTIPOS DO CARCINOMA DE MAMA EM DOIS
GRUPOS ETÁRIOS DISTINTOS: UM OLHAR SOBRE O
BASAL**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
para a conclusão do Curso de Graduação
em Medicina.**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2007**

ALINE SCHMITT POLIDORO

**FENÓTIPOS DO CARCINOMA DE MAMA EM DOIS
GRUPOS ETÁRIOS DISTINTOS: UM OLHAR SOBRE O
BASAL**

**Trabalho apresentado à Universidade
Federal de Santa Catarina, como requisito
para a conclusão do Curso de Graduação
em Medicina.**

**Presidente do Colegiado: Prof. Dr. Maurício José Lopes Pereima
Professora Orientadora: Prof.^a Dr.^a Rozany Mucha Dufloth
Professor Co-orientador: Prof. MSc. Carlos Gilberto Crippa**

**Florianópolis
Universidade Federal de Santa Catarina
2007**

Polidoro, Aline Schmitt.

Fenótipos do carcinoma de mama em dois grupos etários distintos: um olhar sobre o basal / Aline Schmitt Polidoro - Florianópolis, 2007.

53p.

Monografia (Trabalho de Conclusão de Curso) – Universidade Federal de Santa Catarina -- Curso de Graduação em Medicina.

Palavras Chaves: 1. Carcinoma de mama. 2. Fenótipo basal. 3. Idade

Às mulheres que, corajosamente,
enfrentam o carcinoma de mama e
seguem suas vidas com dignidade.

Desejo que em breve possamos fazer
mais por vocês e evitar tanto sofrimento.

AGRADECIMENTOS

Sou profundamente grata à Prof.^a Dr.^a Rozany Mucha Dufloth, que me aceitou prontamente como orientanda e exerceu plenamente seu papel de orientadora, participando ativamente de cada etapa do estudo e compartilhando generosamente seu conhecimento. É um grande exemplo da paciência e da obstinação que devem ter um pesquisador, além de pessoa maravilhosa, doce e incrivelmente acessível.

Agradeço à Prof.^a Daniella Serafin Couto Vieira, que sempre depositou em mim confiança em todo esse tempo de convivência. Obrigada por me acolher calorosamente dentro do Serviço de Anatomia Patológica do HU e me incentivar sempre, tanto profissionalmente quanto pessoalmente. Agradeço também pela participação ativa em todas as etapas desse trabalho.

Agradeço ao Prof. Carlos Gilberto Crippa, por se colocar à disposição para colaborar em tudo que fosse possível dentro da área de ginecologia, principalmente às sugestões tão pertinentes.

Muito obrigada ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino. Apesar de não conhecê-lo pessoalmente, foi responsável por sugestões fundamentais à condução deste estudo.

Agradeço a todos os funcionários do Serviço de Anatomia Patológica do HU, especialmente ao Sr. Alvonir José de Souza e à Alessandra Heinz, além dos docentes e do grande amigo médico patologista Gianfranco Luigi Colombeli. Obrigada pela amizade de todos.

Muito obrigada à minha família, meu apoio de todas as horas. Ao meu pai, Pedro Polidoro, e à minha mãe, Lúcia Aurélio Schmitt Polidoro, agradeço pelo aconchego dos braços, pela paciência infinita, por me ouvirem e aconselharem, por me darem todo o carinho e apoio que precisei. Tenho muito orgulho de vocês! À minha irmã, Ana Paula Schmitt Polidoro, obrigada por confiar em mim e apostar em meu sucesso. Você é uma grande inspiração! Agradeço também ao noivo Diogo Braga Finelli pela paciência e amor, e pelo ânimo nas horas de cansaço.

Obrigada aos colegas mais próximos que me acompanharam nesses anos de curso, especialmente à minha dupla de internato e grande amiga, Jéssica Raquel Holz, por quem tenho muito carinho e admiração. Sou grata por todos os momentos de compreensão, pelas dicas, conselhos, companhia e por termos compartilhado tantas alegrias juntas.

Obrigada, meu Deus, por ter me abençoado durante toda a minha vida e me presenteado com essas pessoas maravilhosas que cruzaram meu caminho e caminharam ao meu lado.

RESUMO

INTRODUÇÃO: O carcinoma de mama é uma doença heterogênea. Pode ser classificado em fenótipos, com diferentes prognósticos, com base na expressão de determinadas proteínas. O fenótipo basal, muito estudado, deve ter sua frequência conhecida em diferentes grupos etários.

OBJETIVO: Avaliar se há diferença na expressão do fenótipo basal do carcinoma de mama em dois grupos etários distintos, utilizando o perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) e os marcadores basais (p63, CK5 e P-caderina).

MÉTODOS: Foram estudados carcinomas de mama invasores de dois grupos etários, através da técnica de *tissue microarray*, sendo classificados em fenótipos luminal A e B, superexpressão de HER2 e basal. Para o basal, usou-se o perfil duplo-negativo e p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo, ou apenas o perfil duplo-negativo.

RESULTADOS: As frequências do fenótipo basal (perfil duplo-negativo) e do grupo não-basal em mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos foram, respectivamente: basal (29,3% e 13,6%) e não-basal (70,7% e 86,4%). Houve diferença significativa. Quando os fenótipos foram analisados individualmente nos dois grupos etários: luminal A (50,8% *versus* 58,1%), luminal B (15,4% *versus* 14,5%), superexpressão de HER2 (15,4% *versus* 19,4%) e basal (perfil duplo-negativo e p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo) (18,5% *versus* 8,1%), não ocorreu diferença significativa.

CONCLUSÃO: O fenótipo basal (perfil duplo-negativo) foi mais frequente entre mulheres mais jovens quando comparado ao conjunto dos demais fenótipos (grupo não-basal). Será importante definir em estudos posteriores se o fenótipo basal caracterizado pelo perfil duplo-negativo se correlaciona com pior prognóstico nesses dois grupos etários.

ABSTRACT

INTRODUÇÃO: Breast carcinoma is a heterogeneous disease. It can be classified into phenotypes based on the expression of certain proteins, with distinct differences in prognosis. The basal-like phenotype, very studied, needs to have its frequency known at distinct age groups.

AIM: To assess if exists difference in expression of basal-like breast carcinomas in two distinct age groups, using the double-negative surrogate (RE negative/HER2 negative) and the basal markers (p63, CK5 and P-cadherin).

METHODS: Invasive breast carcinomas of two distinct age groups were studied using the tissue microarray technique, being classified into phenotypes: luminal A and B, HER2 overexpression and basal-like. For the basal-like phenotype, double-negative surrogate and p63 and/or CK5 and/or P-cadherin positive, or just double-negative surrogate was used.

RESULTS: The frequencies of basal-like phenotype (double-negative surrogate) and of non basal-like group among women of age ≤ 45 years and women of age ≥ 65 years were, respectively: basal-like (29.3% versus 13.6%) and non basal-like (70.7% versus 86.4%). There was significant difference. When phenotypes were analysed individually among the two age groups: luminal A (50.8% versus 58.1%), luminal B (15.4% versus 14.5%), HER2 overexpression (15.4% versus 19.4%) and basal-like (double-negative surrogate and p63 and/or CK5 and/or P-cadherin positive) (18.5% versus 8.1%), there was no significant difference.

CONCLUSIONS: Basal-like phenotype (double-negative surrogate) was more frequent among younger women when compared to the other phenotypes all together (non basal-like group). It will be important define if the basal-like phenotype determined by double-negative surrogate is associated with poor prognosis in this age groups.

LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>BRCA1</i>	<i>Breast Cancer 1 Gene</i>
<i>BRCA2</i>	<i>Breast Cancer 2 Gene</i>
CAGIMA	Grupo de Pesquisa CNPq – câncer ginecológico e mamário
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
<i>c-DNA</i>	DNA complementar
CK	Citoqueratina
c-kit	Proteína CD117
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERBB	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
ERBB2	<i>Epidermal growth factor receptor 2</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HER1	<i>Human epithelial receptor 1</i>
HER2	<i>Human epithelial receptor 2</i>
HU	Hospital Universitário
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPATIMUP	Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto
µm	micra
<i>mRNA</i>	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
<i>P</i>	p valor
p63	Proteína do gene <i>P63</i>
P-caderina	<i>Placental caderina</i>
RE	Receptor de estrógeno
RH	Receptor hormonal
RP	Receptor de progesterona
SAP	Serviço de Anatomia Patológica
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
Teste de χ^2	Teste de qui-quadrado
TMA	<i>Tissue microarray</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

SUMÁRIO

RESUMO.....	vi
ABSTRACT.....	vii
LISTA DE SÍMBOLOS, ABREVIATURAS E SIGLAS.....	viii
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS.....	7
2.1 Objetivo Geral.....	7
2.2 Objetivos Específicos.....	7
3 SUJEITOS E MÉTODOS.....	8
3.1 Desenho do Estudo.....	8
3.2 Seleção de Sujeitos e Tamanho da Amostra.....	8
3.2.1 Critérios de inclusão.....	9
3.2.2 Critérios de exclusão.....	9
3.3 Variáveis e Conceitos.....	9
3.3.1 Variáveis.....	9
3.3.2 Conceitos.....	9
3.4 Descrição dos Procedimentos Técnicos.....	10
3.4.1 Construção dos <i>Tissue Microarrays</i> (TMA).....	10
3.4.1.1 Seleção dos Tecidos para a Construção dos TMA.....	11
3.4.1.2 Montagem dos TMA.....	11
3.4.1.3 Corte do Bloco de TMA.....	11
3.4.2 Método Imunoistoquímico.....	12
3.4.3 Controles.....	13
3.5 Coleta de Dados.....	13
3.6 Análise dos Dados.....	14
3.7 Aspectos Éticos.....	14
4 RESULTADOS.....	15
5 DISCUSSÃO.....	18
6 CONCLUSÕES.....	28

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	30
NORMAS ADOTADAS.....	36
ANEXOS	37

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama, excetuando-se os carcinomas de pele não-melanoma, é o mais freqüente entre as mulheres, constituindo 23% das neoplasias malignas que ocorrem nas mesmas¹. Esse dado se confirma entre as brasileiras, com 52,93 casos por 100.000 mulheres em 2005 e 48.930 novos casos previstos pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2006². Nos Estados Unidos da América, também ocupa a primeira posição entre as mulheres, estimando-se que ocorram 178.480 novos casos de carcinoma de mama invasor durante o ano de 2007³.

Em relação à mortalidade, o carcinoma de mama é a neoplasia maligna que mais leva as mulheres à morte (14% das mortes por neoplasias malignas)¹. A Organização Mundial da Saúde (OMS) mostra que essa também é a realidade entre as brasileiras⁴, sendo que em 2003 o INCA registrou 9.342 mortes por carcinoma de mama (10,27 mortes a cada 100.000 mulheres)². Já nos Estados Unidos da América, estima-se que ocorram 40.460 mortes por carcinoma de mama entre as mulheres no ano de 2007, ocupando o segundo lugar após o carcinoma de pulmão e brônquios³.

Esse cenário ainda sombrio, apesar dos esforços para a detecção precoce, poderia ser atribuído, pelo menos em parte, ao fato de o carcinoma de mama constituir um grupo muito heterogêneo de neoplasias, com diferentes prognósticos⁵⁻⁸. Assim, com o objetivo de descobrir tratamentos mais eficientes e racionais, vem-se estudando a biologia do carcinoma de mama com base no seu perfil de expressão gênica, o que origina uma assinatura molecular para cada tipo de neoplasia⁹⁻¹¹. Com o propósito de encontrar novos alvos terapêuticos, e acreditando que se possa atuar nos diversos níveis de diferenciação do carcinoma de mama, busca-se conhecer a hierarquia dos tipos celulares da mama e suas inter-relações no tecido mamário normal e na doença proliferativa¹².

Para atender a tais metas, é importante conhecer os produtos protéicos expressos pelos tipos celulares distintos que compõem o tecido mamário normal e o neoplásico, o que pode ser acessado através da técnica de imunistoquímica (IHQ)¹³. Isso ajuda a estabelecer correlações e entender de que tipos celulares se originam as neoplasias¹² e porque algumas são mais agressivas que outras. Assim, não há dúvida sobre a importância dos estudos do grupo de Stanford, que baseado em pesquisas de *cDNA microarrays*, impulsionou a classificação dos carcinomas de mama ao introduzir conhecimentos sobre o perfil molecular⁹.

Dessa forma, Perou *et al.*⁹ foram os primeiros a classificar as neoplasias de mama em fenótipos luminal, basal, superexpressão de HER2 e *normal breast-like*. Para isso, estudaram amostras de tecido mamário humano normal e maligno⁹. Observaram que as neoplasias que não expressavam receptor de estrógeno (RE negativo) representavam um grupo clinicamente distinto daquelas neoplasias que expressavam receptor de estrógeno (RE positivo)⁹. Através de expressões gênicas semelhantes dentro desses grupos gerais RE positivo e RE negativo, definiram os quatro fenótipos do carcinoma de mama⁹.

O fenótipo luminal foi denominado dessa forma porque as neoplasias RE positivo expressavam outros genes que são expressos por células luminais da mama e isso levava a supor que os carcinomas de mama RE positivo poderiam ter origem a partir desse tipo celular⁹. Já as neoplasias RE negativo foram divididas naquelas que superexpressavam o oncogene HER2 (fenótipo superexpressão de HER2) e naquelas que não expressavam altos níveis do oncogene HER2 (fenótipo basal)⁹.

O fenótipo superexpressão de HER2 (RE negativo/HER2 positivo) expressa um conjunto de genes específicos⁹. Já o fenótipo basal (RE negativo/HER2 negativo) foi suposto como tendo origem a partir das células basais da mama (também conhecidas como mioepiteliais¹²), pois expressava genes expressos por células basais do epitélio mamário⁹. E o quarto fenótipo foi aquele com expressão gênica semelhante ao tecido mamário normal, com alta expressão de genes característicos das células basais e células adiposas, e baixa expressão de genes característicos das células luminais, sendo denominado como *normal breast-like*⁹.

Com os estudos subseqüentes foi possível uma melhor caracterização dos fenótipos do carcinoma de mama^{5,10,11,13-18}. As neoplasias luminais passaram a ser distinguidas em luminal A (RE positivo/HER2 negativo) e luminal B (RE positivo/HER2 positivo)^{10,11,14}. Já Carey *et al.*¹⁹ afirmam que, apesar do perfil RE positivo/HER2 positivo ser frequentemente usado para identificar o fenótipo luminal B, e eles próprios o usaram em seu estudo, essa definição não identifica todas as neoplasias luminal B, porque apenas 30% a 50% dessas são HER2 positivo, mesma impressão de Perou *et al.*⁹, que diziam que o fenótipo luminal não expressava altos níveis do oncogene HER2. E o fenótipo *normal breast-like* passou a integrar o grupo de neoplasias RE negativo, junto com os fenótipos basal e superexpressão de HER2^{20,21}.

Outras descobertas foram que as neoplasias que superexpressam HER2 são em sua maioria esporádicas e que o fenótipo basal, em mais de 80% das vezes, consiste em uma neoplasia familiar⁵. Isso condiz com o conhecimento atual de que as neoplasias com mutações no gene *BRCA1* (hereditárias) apresentam um fenótipo basal^{11,13,22-25}. Já os carcinomas de

mama com mutações no gene *BRCA2*, apesar de apresentarem grau histológico elevado, demonstram mais frequentemente fenótipo luminal²⁶. Por fim, fica definido que o prognóstico de cada fenótipo difere bastante, estando os fenótipos basal e superexpressão de HER2 associados com tempo de sobrevida menor^{10,11,14-16,27}.

O fenótipo basal é particularmente enigmático, pois os genes que são responsáveis por sua agressividade não são bem entendidos, o que consiste na principal barreira ao desenvolvimento de terapias-alvo²⁸. A necessidade urgente de se encontrar novas opções terapêuticas se faz pelo fato de os carcinomas de mama de fenótipo basal serem RE negativo/HER2 negativo (perfil duplo-negativo) e, portanto, tipicamente refratários à terapia endócrina e ao *trastuzumab*, este último um anticorpo monoclonal humanizado que tem como alvo HER2^{21,22,28,29}.

Por isso, o fenótipo basal tem merecido especial atenção na literatura, inclusive do grupo de pesquisa do qual se origina a presente linha de pesquisa (ANEXO 1). Este fenótipo é caracterizado por um padrão específico de expressão de proteínas, sendo que é negativo para a expressão de RE e de HER2 e frequentemente expressa pelo menos um marcador basal, entre os quais citoqueratinas basais (por exemplo, CK5) ou o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1)^{5,6,9,16,18,20,22,24,30}. Dentre os diversos marcadores basais conhecidos, as proteínas p63, CK5 e P-caderina têm sido amplamente pesquisadas quando se quer caracterizar as neoplasias de mama como sendo de fenótipo basal^{5,6,16,18,22,24,30-40}.

Mesmo diante das várias proteínas com expressão relacionada ao fenótipo basal, não existe atualmente nenhum consenso internacional sobre um conjunto preciso de marcadores que defina esse fenótipo na imunoistoquímica⁴¹. Não há dúvida de que a maneira mais confiável de se identificar o fenótipo basal seria através da assinatura de expressão gênica das neoplasias, porém tal método não pode ser rotineiramente aplicado em tecidos fixados por formalina, embebidos em parafina, clinicamente disponíveis²⁸.

Por esse motivo, linhas de pesquisa estão contribuindo para elucidar o melhor perfil imunoistoquímico (IHQ), a partir da expressão de proteínas, que identifique o fenótipo basal do carcinoma de mama, incluindo o perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo), o perfil triplo-negativo (RE negativo/receptor de progesterona negativo/HER negativo), e o perfil em que se associa o duplo ou o triplo-negativo com a expressão de pelo menos um marcador basal/mioepitelial (p63, P-caderina, CK5/6, CK14, CK17, vimentina, EGFR ou HER1, entre outros)^{5,6,9,16,18,19,21,28,30}.

Cabe destacar que as citoqueratinas (CK), proteínas dos filamentos intermediários, são amplamente usadas como marcadores para definir os tipos celulares epiteliais^{12,22,24}. Perou *et*

*al.*⁹ já haviam observado que as neoplasias de fenótipo basal expressavam *mRNA* de citoqueratina 5 (CK5) e de citoqueratina 17 (CK17). Os estudos de Fadare *et al.*⁴¹ encontraram que as CK5/6 e CK14 são expressas em células mioepiteliais do epitélio mamário normal.

Além das citoqueratinas, existem outros marcadores que têm sido usados para diferenciar os tipos celulares epiteliais, como a proteína do gene *P63* (p63), que é expressa pelas células mioepiteliais³⁵. Yang *et al.*³⁶ já sugeriam isso quando estudaram diferentes tipos de tecidos epiteliais e a técnica de imunistoquímica mostrou forte marcação nuclear para p63 concentrada nas células basais do epitélio. A expressão de p63, ao apresentar correlação com grau histológico elevado e RE negativo³⁵, confirma esta proteína como um bom marcador basal⁵, pois estas são características compatíveis com aquelas apresentadas por neoplasias de fenótipo basal.

Outro marcador usado para identificar os tipos celulares que compõem o tecido mamário é a P-caderina, uma glicoproteína implicada na adesão celular, que foi identificada inicialmente como uma molécula abundante na placenta de camundongos e denominada, portanto, *Placental Cadherin*⁴². No tecido mamário normal, a P-caderina é um marcador altamente sensível de células mioepiteliais³⁷. O estudo de Kovács *et al.*³⁸ mostrou uma associação clara, em carcinomas de mama invasores, entre a expressão de P-caderina e neoplasias com grau histológico elevado e RE negativo, além da presença de EGFR (ou HER1). Os autores sugeriram que tais carcinomas apresentavam graus variáveis de diferenciação mioepitelial, já que a presença de P-caderina e de EGFR é uma característica das células mioepiteliais³⁸. Além dessas associações, Arnes *et al.*³⁹ encontraram relação entre P-caderina e expressão de CK5/6 e mutações em *BRCAl*, apontando que a P-caderina é mais frequentemente expressa em neoplasias que apresentam um fenótipo basal.

O gene *ERBB2* (ou HER2), que não é expresso por neoplasias de fenótipo basal, é amplificado em aproximadamente 20% das neoplasias de mama²². Ele codifica um receptor tirosina quinase da família *ERBB*, que desempenha um importante papel na biologia da glândula mamária⁴³. Parece que quando HER2 é ativado em neoplasias da mama, ele impede a diferenciação terminal de células na linhagem luminal e sustenta a proliferação celular²².

Esse conhecimento sobre os marcadores moleculares relacionados ao carcinoma de mama deve ser associado a fatores epidemiológicos conhecidos, como idade ao diagnóstico, que também influencia a apresentação e o comportamento do carcinoma de mama⁴⁴⁻⁵⁰. Apesar de até hoje não se ter conseguido estabelecer definitivamente se a idade jovem é um

fator independente de pior prognóstico, sabe-se que as mulheres mais jovens apresentam um conjunto de características que as distinguem das mulheres mais velhas⁴⁴⁻⁵⁰.

Os carcinomas de mama que ocorrem em mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos representam dois grupos etários hormonalmente distintos, até mesmo opostos⁵¹. O interesse pelo estudo desses dois grupos etários específicos, não selecionados por etnia, pode ser justificado também pelos resultados encontrados por Ihemelandu *et al.*⁷, que avaliaram mulheres afro-americanas com carcinoma de mama e mostraram que nesta etnia a distribuição da idade ao diagnóstico revelou um padrão bimodal, com picos de incidência próximos às idades de 42 anos e 72 anos. Especificamente em relação ao fenótipo basal do carcinoma de mama entre mulheres afro-americanas, caracterizado pelo perfil triplo-negativo, encontrou-se uma distribuição em idade jovem com pico de incidência perto dos 30 anos e uma distribuição em idade mais velha com pico de incidência em torno dos 58 anos⁷.

As mulheres mais jovens apresentam neoplasias com características de maior agressividade⁴⁴⁻⁴⁹ e mais frequentemente exibem grau histológico elevado e RE negativo^{52,53,55}. Mesmo quando se compara mulheres de mesmo grau histológico em dois grupos etários, aquelas com 45 anos ou menos apresentam maior proporção de neoplasias RE negativo quando comparadas àquelas com 65 anos ou mais⁵³. Ainda, as mais jovens apresentam maior frequência de mutações gênicas^{52,54}, sendo a idade jovem à apresentação um dos indicadores de susceptibilidade genética ao carcinoma de mama^{52,54}. A rigor, isso leva a pensar que poderia haver maior número de casos de fenótipo basal entre o grupo etário mais jovem.

O estudo recente de Fulford *et al.*⁵⁶ encontrou que o fenótipo basal, definido por casos CK14 positivos, ocorreu em idade média discretamente mais jovem do que outras neoplasias de grau elevado, mas com diferença estatisticamente significativa. Houve uma média de idade de 49,9 anos para a ocorrência do fenótipo basal *versus* 53,9 anos para a ocorrência dos demais fenótipos agrupados como não-basal (casos CK14 negativos)⁵⁶.

Entre mulheres afro-americanas, a prevalência dos fenótipos do carcinoma de mama foi significativamente influenciada por grupos etários específicos, com a maior prevalência do fenótipo basal, definido pelo perfil triplo-negativo, ocorrendo no grupo abaixo de 35 anos^{7,8}. Entre mulheres não selecionadas por etnia, os carcinomas também definidos pelo perfil triplo-negativo tiveram maior probabilidade de serem diagnosticados abaixo dos 40 anos⁵⁷.

O grupo de mulheres com 65 anos ou mais, apesar de pequeno, deve ser olhado com atenção. Um dos motivos seria o aumento progressivo da expectativa de vida, principalmente entre a população feminina. Outro seria a constatação que entre mulheres norte-americanas

mais velhas (≥ 70 anos) não se observa declínio significativo na mortalidade para as neoplasias RE negativo, enquanto isso ocorre naquelas RE positivo⁵⁸. Portanto, é importante conhecer a frequência do fenótipo basal, que é RE negativo, também nestas mulheres mais velhas.

Por fim, o estudo recente de Fulford *et al.*⁵⁶ com carcinomas ductais invasores de grau histológico elevado encontrou sobrevida global e sobrevida livre de doença menores em mulheres com menos de 35 anos ou com mais de 65 anos de idade ao diagnóstico, o que reforça o interesse por esclarecer a frequência do fenótipo basal em grupos etários como o de mulheres ≤ 45 anos e ≥ 65 anos. Ainda, são poucos os estudos comparando a ocorrência dos fenótipos do carcinoma de mama nesses dois grupos etários, especialmente o fenótipo basal, sem selecionar por etnia.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar se há diferença na expressão do fenótipo basal do carcinoma de mama em dois grupos etários distintos, utilizando o perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) e os marcadores basais (p63, CK5 e P-caderina).

2.2 Objetivos Específicos

1. Calcular as frequências dos fenótipos luminal A, luminal B, superexpressão de HER2 e basal em dois grupos etários distintos (mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos), comparando a presença ou ausência de marcador basal junto ao perfil duplo-negativo para caracterizar o fenótipo basal.
2. Calcular as frequências dos grupos basal e não-basal em dois grupos etários distintos (mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos), comparando a presença ou ausência de marcador basal junto ao perfil duplo-negativo para caracterizar o fenótipo basal.
3. Analisar a associação do fenótipo basal com os dois grupos etários distintos (mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos), comparando a presença ou ausência de marcador basal junto ao perfil duplo-negativo para caracterizar o fenótipo basal.

3 SUJEITOS E MÉTODOS

3.1 Desenho do Estudo

Este foi um estudo observacional, analítico, do tipo corte transversal, o qual faz parte da linha de pesquisa “Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese e na progressão do câncer ginecológico e mamário” do grupo CAGIMA, cadastrado no CNPq* (ANEXO 1).

3.2 Seleção de Sujeitos e Tamanho da Amostra

A amostra consistiu de 165 mulheres que tiveram diagnóstico de carcinoma de mama, selecionadas consecutivamente em três centros: 1) Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de janeiro de 1994 a dezembro de 2004, 2) Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher (CAISM) da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), São Paulo, e 3) Hospital São João, Universidade do Porto, Portugal, os dois últimos no período de 2002 a 2004.

Todos os registros médicos das mulheres que foram submetidas a procedimentos cirúrgicos na mama e cujo material foi enviado aos serviços de anatomia patológica dos centros envolvidos no estudo foram vistos por pesquisadoras que fazem parte da linha de pesquisa “Mecanismos celulares e moleculares envolvidos na patogênese e na progressão do câncer ginecológico e mamário” do grupo CAGIMA, em sua tese de doutorado (RMD)⁵⁹ e em sua dissertação de mestrado (DSCV)⁴⁰. Essas mesmas pesquisadoras também revisaram e separaram os laudos anátomo-patológicos, lâminas e respectivos blocos de parafina contendo material de carcinoma de mama e que estavam arquivados nos serviços de anatomia patológica de cada centro, bem como revisaram os prontuários médicos das mulheres que foram incluídas no estudo.

* O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq – Brasil (ANEXO 2).

3.2.1 Critérios de inclusão

- Mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma de mama invasor.
- Mulheres com idade ≤ 45 anos e mulheres com idade ≥ 65 anos.

3.2.2 Critérios de exclusão

- Casos que não apresentaram condições para a avaliação da expressão das proteínas através do método imunoistoquímico.

Assim, foram obtidos inicialmente 165 casos para este estudo, sendo 14 excluídos, restando 151 casos que preencheram os critérios propostos.

3.3 Variáveis e Conceitos

3.3.1 Variáveis

- 1) Idade.
- 2) Fenótipos do carcinoma de mama (fenótipo luminal A, fenótipo luminal B, fenótipo superexpressão de HER2, fenótipo basal).
- 3) Casos indeterminados.

3.3.2 Conceitos

- Idade

Idade da mulher, em anos completos, quando do diagnóstico histológico de carcinoma de mama invasor.

- Fenótipos do carcinoma de mama

Os fenótipos do carcinoma de mama seguiram a classificação de Perou *et al.*⁹, modificada por Sorlie *et al.*^{10,11}, e a caracterização do fenótipo basal foi segundo critérios de Matos *et al.*⁵ e Perou *et al.*⁹.

- **Fenótipo luminal A** quando houve positividade para RE e negatividade para HER2 (RE positivo/HER2 negativo)^{10,11}.
- **Fenótipo luminal B** quando houve positividade para RE e positividade para HER2 (RE positivo/HER2 positivo)^{10,11}.
- **Fenótipo superexpressão de HER2** quando houve negatividade para RE e positividade para HER2 (RE negativo/HER2 positivo)^{9,10,11}.
- **Fenótipo basal** quando houve perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) e positividade para pelo menos um dos marcadores basais (p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina), em uma análise inicial⁵, ou apenas perfil duplo-negativo, em uma segunda análise, como proposto por Perou *et al.*⁹.

- Casos indeterminados

Quando não houve marcação para nenhuma das proteínas (RE negativo/HER2 negativo/p63, CK5 e P-caderina negativos)¹⁶ ou quando a leitura de uma ou mais proteínas resultou inconclusiva^{5,9,16}.

Para fins de análise estatística, os fenótipos luminal A, luminal B e superexpressão de HER2 foram reunidos em um grupo denominado não-basal que foi comparado com o fenótipo basal⁵⁶.

3.4 Descrição dos Procedimentos Técnicos

Os procedimentos técnicos foram realizados no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), durante o desenvolvimento da tese de doutorado da Prof.^a Dr.^a Rozany Mucha Dufloth⁵⁹ e da dissertação de mestrado da Prof.^a Daniella Serafin Couto Vieira⁴⁰, seguindo protocolos específicos da referida instituição, divulgados em artigos do grupo de pesquisa^{5,6,30,34,59-62}.

3.4.1 Construção dos *Tissue Microarrays* (TMA)

3.4.1.1 Seleção dos Tecidos para a Construção dos TMA

A partir dos blocos de tecidos doadores, foram realizados cortes histológicos de 4µm para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). As novas lâminas foram sequencialmente analisadas ao microscópio óptico por uma patologista (R.M.D. ou D.S.C.V., cada pesquisadora avaliou os casos de seu próprio estudo, sob os mesmos critérios), e duas áreas morfológicamente significativas do componente neoplásico foram selecionadas na lâmina de vidro. Posteriormente, foram delimitados dois círculos (correspondentes às áreas significativas) em cada bloco doador sobrepondo as lâminas marcadas, para assim marcar a área de extração do material dos blocos doadores.

3.4.1.2 Montagem dos TMA

A partir do número de áreas selecionadas em cada bloco doador, foram construídos mapas com as coordenadas de localização de cada caso nos blocos receptores, que foram seguidos criteriosamente durante a confecção dos TMA.

Os blocos receptores dos *tissue microarrays* (TMA) foram construídos no *Tissue MicroArray builder ab1802* (Abcam®, Cambridge, UK), composto por um molde de 24 cilindros e por uma “seringa extratora” (*punch-extractor*). De cada bloco doador foram extraídos dois cilindros de 2mm de diâmetro e depositados nos blocos receptores, previamente preparados. A seringa extratora apresenta uma marcação de 5mm, de acordo com o tamanho dos cilindros do molde do bloco receptor, para que os cilindros de tecido extraídos tenham todos a mesma altura.

Depois de depositados todos os cilindros, os blocos receptores, agora TMA, foram colocados na estufa a 37°C durante 1 hora com a face de corte virada para baixo e sobre uma lâmina de vidro. A cada intervalo de uma hora os blocos foram pressionados para promover a homogeneização dos mesmos. Deste modo, os cilindros de tecido ficaram aderidos às paredes do bloco receptor e a superfície de corte ficou homogênea através do contato com a lâmina.

3.4.1.3 Corte do Bloco de TMA

Antes de realizar os cortes histológicos, os TMA foram esfriados a -10°C durante 30 minutos. Após o corte seqüencial de $2\mu\text{m}$ (micra) de espessura, as lâminas foram envolvidas em uma camada de parafina até a sua utilização no processo de imunoistoquímica (IHQ). Foi feita a coloração HE do primeiro corte de cada TMA para controle morfológico da presença de neoplasia.

Foram utilizados uma placa fria (Leica EG1130, Germany) e um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Germany) para a realização dos cortes histológicos.

Usaram-se dois tipos de lâminas, conforme os cortes histológicos eram destinados para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) (Marienfeld, Germany) ou para imunoistoquímica (Superfrost®Plus, Germany), apresentando estas um maior poder de adesão.

3.4.2 Método Imunoistoquímico

A técnica foi realizada segundo um protocolo estabelecido e padronizado pelo laboratório de imunoistoquímica do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP) (ANEXO 3).

Em resumo, os cortes de TMA foram desparafinados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica induzida pelo calor em banho a 98°C . Utilizou-se solução *Retrieval* (pH=6) e EDTA (pH=8) durante 30 minutos, onde foram aplicados cinco anticorpos primários monoclonais (Quadro 1). A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3%, seguindo-se o bloqueio protéico com soro específico. Os cortes foram incubados com os diferentes anticorpos monoclonais nas condições previamente otimizadas (Quadro 1). Seguiu-se a incubação do anticorpo secundário e do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase foi revelada pelo DAB e o corte contrastado com Hematoxilina de Mayer.

A expressão imunoistoquímica para os marcadores moleculares p63 e RE foi observada pela marcação nuclear, e a expressão de CK5 foi observada por marcação citoplasmática, independentemente da intensidade da marcação. Considerou-se um caso positivo se mais de 10% das células marcaram para p63, RE e CK5⁵. Para a avaliação da marcação do HER2, levou-se em consideração a percentagem de células com marcação membranar^{5,59,60}. A positividade do HER2 foi avaliada de acordo com o método recomendado pelo kit Hercepteste (DAKO) das quatro categorias (0, +, ++, +++), sendo considerado positivo

quando os resultados englobaram a categoria +++^{5,63,64}. P-caderina foi considerada positiva quando mais de 10% das células neoplásicas apresentaram marcação citoplasmática ou membranar⁶⁵.

Todas as lâminas foram analisadas por dois observadores (R.M.D. ou D.S.C.V. e F.C.L.S.) no microscópio de multiobservação (Leica MDL, Germany).

QUADRO 1: Anticorpos monoclonais utilizados no método imunoistoquímico:

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Tempo de Incubação (min)	Antígeno de recuperação (min)
p63	A4A	LabVision	1:150	60	30-tampão citrato (1:100)
CK5	XM26	LabVision	1:50	60	30-Tris EDTA (1:10)
P-caderina	56	BD Transduction	1:50	60	30- Tris EDTA (1:10)
RE	SP1	LabVision	1:150	30	30-tampão citrato (1:100)
HER2	SP3	LabVision	1:80	30	30-tampão citrato (1:100)

3.4.3 Controles

Em cada bloco receptor foram colocados casos que serviram de controle interno (1 fragmento de tecido testicular e 3 fragmentos de tecido mamário normal). Estas amostras foram processadas da mesma forma, uma vez que pertenciam ao TMA e não apresentavam expressão relevante do antígeno.

3.5 Coleta de Dados

A coleta de dados foi realizada pela pesquisadora do presente estudo através do preenchimento de ficha especialmente desenhada para este estudo (ANEXO 4). Para cada caso foi atribuído um número de identificação.

Os dados de marcadores moleculares foram obtidos a partir da técnica de *tissue microarray* (TMA), que foi realizada no IPATIMUP pelas duas pesquisadoras que coletaram os dados primários.

3.6 Análise dos Dados

Foi elaborado um banco de dados com codificação das variáveis utilizando Excel®. A digitação do banco foi realizada com conferência manual através de listagem dos dados, na ordem em que foram incluídos. A revisão da consistência dos dados foi feita mediante tabelas descritivas, e em seguida, o arquivo gerado foi transportado para o programa *Epi Info* 3.3.2 (www.cdc.gov).

Para a realização da análise estatística, os dados foram descritos por meio de frequências absolutas (n) e relativas (%).

Para avaliar a associação entre os fenótipos do carcinoma de mama e os grupos etários distintos foi utilizado o teste de qui-quadrado (χ^2). Não foi necessário o teste exato de Fisher, pois nenhuma das frequências absolutas avaliadas em cada associação foi inferior a $n = 5^{66}$.

O nível de significância assumido foi de 5% e o software utilizado para análise foi o *SAS* versão 8.2.

3.7 Aspectos Éticos

O projeto deste trabalho foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com a Resolução n°. 196/96, 251/97 e 292/99, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, com parecer consubstanciado – Projeto n° 129/2007, aprovado em reunião do dia 25 de junho de 2007 (ANEXO 5).

4 RESULTADOS

As frequências dos fenótipos do carcinoma de mama entre as mulheres ≤ 45 anos e as mulheres ≥ 65 anos foram, respectivamente (Tabela 1): luminal A (50,8% e 58,1%), luminal B (15,4% e 14,5%), superexpressão de HER2 (15,4% e 19,4%) e basal (perfil duplo-negativo mais algum marcador basal positivo) (18,5% e 8,1%). Os grupos etários distintos não foram estatisticamente diferentes em relação à frequência dos fenótipos do carcinoma de mama (perfil duplo-negativo mais algum marcador basal positivo para definir o fenótipo basal) ($P=0,3650$).

Tabela 1. Frequência dos fenótipos do carcinoma de mama de acordo com grupos etários

Classificação do fenótipo	Idade		P
	≤ 45 n (%)	≥ 65 n (%)	
Luminal A	33 (50,8)	36 (58,1)	0,3650
Luminal B	10 (15,4)	9 (14,5)	
Superexpressão de HER2	10 (15,4)	12 (19,4)	
Basal*	12 (18,5)	5 (8,1)	
Indeterminados	14	10	
TOTAL	79	72	

* RE negativo/HER2 negativo e p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo
Teste de χ^2

Observa-se que 24 casos foram considerados indeterminados, porém dentre estes, 14 foram RE negativo/HER2 negativo sem expressar nenhum dos três marcadores basais propostos (p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina) (Tabela 1). Quando incluídos como fenótipo basal (perfil duplo-negativo apenas), a distribuição dos casos se altera dentro dos grupos etários como mostrado na Tabela 2. As frequências dos fenótipos luminal B e superexpressão de HER2 em mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos foram semelhantes (13,3% *versus* 13,6% e 13,3% *versus* 18,2%). As mulheres ≥ 65 anos tiveram maior proporção de carcinomas de fenótipo luminal A em relação ao grupo mais jovem (54,5% *versus* 44,0%), enquanto as mais jovens tiveram maior proporção de carcinomas de fenótipo basal em relação às mulheres ≥ 65 anos (29,3% *versus* 13,6%). Contudo, as diferenças de frequências entre os fenótipos nos dois

grupos etários distintos não foram estatisticamente significativas (perfil duplo-negativo para definir o fenótipo basal) ($P=0,1535$).

Tabela 2. Frequência dos fenótipos do carcinoma de mama de acordo com grupos etários

Classificação do fenótipo	Idade		P
	≤ 45 n (%)	≥ 65 n (%)	
Luminal A	33 (44,0)	36 (54,5)	0,1535
Luminal B	10 (13,3)	9 (13,6)	
Superexpressão de HER2	10 (13,3)	12 (18,2)	
Basal*	22 (29,3)	9 (13,6)	
Indeterminados	4	6	
TOTAL	79	72	

* RE negativo/HER2 negativo, independente da expressão de marcador basal
 Teste de χ^2

Agrupando-se os fenótipos luminal A, luminal B e superexpressão de HER2 em um grupo denominado não-basal e comparando com o fenótipo basal (perfil duplo-negativo mais algum marcador basal positivo) (Tabela 3), não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,0854$).

Tabela 3. Distribuição dos grupos não-basal e basal de acordo com grupos etários

Agrupamento dos fenótipos	Idade		P
	≤ 45 n (%)	≥ 65 n (%)	
Não Basal*	53 (81,5)	57 (91,9)	0,0854
Basal†	12 (18,5)	5 (8,1)	
Indeterminados	14	10	
TOTAL	79	72	

* Luminal A, luminal B e superexpressão de HER2

† RE negativo/HER2 negativo e p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo

Teste de χ^2

Quando os marcadores basais propostos deixaram de ser considerados como de expressão obrigatória para qualificar o fenótipo basal, e usou-se apenas o perfil duplo-negativo, a diferença entre os grupos não-basal e basal tornou-se estatisticamente significativa

($P=0,0247$) (Tabela 4). Assim, houve diferença entre o fenótipo basal nos dois grupos etários distintos quando analisado com o conjunto dos demais fenótipos de carcinoma de mama.

Tabela 4. Distribuição dos grupos não-basal e basal de acordo com grupos etários

Agrupamento dos fenótipos	Idade		P
	≤ 45 n (%)	≥ 65 n (%)	
Não Basal*	53 (70,7)	57 (86,4)	0,0247
Basal†	22 (29,3)	9 (13,6)	
Indeterminados	4	6	
TOTAL	79	72	

* Luminal A, luminal B e superexpressão de HER2

† RE negativo/HER2 negativo, independente da expressão de marcador basal

Teste de χ^2

Nessa condição, o grupo não-basal predominou em mulheres ≥ 65 anos (86,4% dos casos *versus* 70,7%) e o fenótipo basal (perfil duplo-negativo) destacou-se nas mulheres ≤ 45 anos (29,3% dos casos *versus* 13,6%) ($P=0,0247$). Portanto, a frequência de neoplasias de perfil duplo-negativo foi duas vezes maior nas mulheres com idade ≤ 45 anos do que nas mulheres com 65 anos ou mais.

5 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que carcinomas de mama diagnosticados em idade mais jovem (≤ 45 anos) foram mais frequentemente RE negativo/HER2 negativo do que quando diagnosticados em idade mais velha (≥ 65 anos). E quando foi usado o perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) para caracterizar o fenótipo basal e este foi comparado com o conjunto dos demais fenótipos agrupados sob a denominação de não-basal (fenótipos luminal A, luminal B e superexpressão de HER2), houve maior frequência do fenótipo basal em mulheres ≤ 45 anos (29,3%) do que em mulheres ≥ 65 anos (13,6%) ($P=0,0247$).

Tal resultado é compatível com aquele apontado por Bauer *et al.*⁵⁷ entre mulheres não selecionadas por etnia, sendo que os carcinomas definidos pelo perfil triplo-negativo tiveram maior probabilidade de serem diagnosticados abaixo dos 40 anos. Fulford *et al.*⁵⁶ também chegaram a resultado que aponta para idade mais jovem para o fenótipo basal, porém avaliaram apenas carcinomas ductais invasores de grau histológico elevado e usaram a expressão de CK14 para definir este fenótipo. Tal estudo mostrou que o fenótipo basal ocorreu em mulheres com uma idade média mais jovem comparativamente aos demais fenótipos agrupados (casos CK14 negativos) (49,9 anos *versus* 53,9 anos) e, apesar da diferença discreta, isso foi significativo⁵⁶. Contudo, o estudo de Fulford *et al.*⁵⁶ não avaliou a frequência do fenótipo basal nos diferentes grupos etários.

Tal avaliação foi feita por Ihemelandu *et al.*⁷ entre mulheres afro-americanas, sendo que a prevalência dos fenótipos do carcinoma de mama neste grupo étnico foi significativamente influenciada por grupos etários específicos, com a maior frequência do fenótipo basal, definido pelo perfil triplo-negativo, ocorrendo no grupo abaixo de 35 anos (57,1% dos casos), enquanto o fenótipo luminal A foi o mais frequente em todos os outros grupos etários específicos, inclusive acima de 65 anos.

Em outro estudo de Ihemelandu *et al.*⁸, que avaliou também mulheres afro-americanas, mas apenas abaixo dos 50 anos, houve diferença significativa na média de idade de ocorrência do fenótipo basal (perfil triplo-negativo) (37,2 anos) comparado com os outros fenótipos, sendo o mais frequente entre todos os fenótipos (55,6% dos casos) nas mulheres afro-americanas pré-menopausa que tinham idade ≤ 35 anos. Porém, ambos os estudos não avaliaram outra etnia que não a afro-americana.

Já o estudo de base populacional de Carey *et al.*¹⁹ deu enfoque a isso, avaliando 496 mulheres com carcinoma de mama invasor. Observaram que o fenótipo basal, identificado pelo perfil triplo-negativo mais expressão de CK5/6 e/ou HER1 (ou EGFR), foi mais freqüente entre mulheres pré-menopausa afro-americanas (39% dos casos) comparado com mulheres pós-menopausa afro-americanas (14% dos casos), mas sem diferença estatisticamente significativa entre mulheres pré-menopausa e pós-menopausa não afro-americanas¹⁹. Ou seja, de acordo com a etnia, é possível encontrar ou não maior freqüência do fenótipo basal em mulheres mais jovens. Além disso, em contraposição ao achado de Carey *et al.*¹⁹, Ihemelandu *et al.*⁷ não encontraram diferença na freqüência dos fenótipos do carcinoma de mama de acordo com o *status* menopausal em mulheres afro-americanas.

Essa questão da variabilidade de ocorrência do fenótipo basal de acordo com grupos étnicos específicos é levantada também por Kurebayashi *et al.*⁶⁷, que percebendo a necessidade de se determinar a freqüência do fenótipo basal em outros grupos étnicos, estudaram 793 mulheres japonesas. Estas tiveram apenas 8% de carcinomas de mama com fenótipo basal com características biológicas agressivas⁶⁷, mas não houve menção se existiriam freqüências maiores ou menores de acordo com diferentes grupos etários.

Em relação aos fenótipos luminal A, luminal B, superexpressão de HER2 e basal comparados individualmente entre mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos, o presente estudo não encontrou diferença estatisticamente significativa quando se usou o perfil duplo-negativo e pelo menos um marcador basal positivo (p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina) para identificar o fenótipo basal ($P=0,3650$). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre as freqüências dos fenótipos do carcinoma de mama nos dois grupos etários quando se usou apenas o perfil duplo-negativo ($P=0,1535$).

Observa-se que as freqüências dos fenótipos do carcinoma de mama encontradas neste estudo em mulheres ≤ 45 anos (perfil duplo-negativo para caracterizar o fenótipo basal) foram semelhantes àquelas encontradas em mulheres afro-americanas com menos de 50 anos apresentadas no estudo de Ihemelandu *et al.*⁸ (perfil triplo-negativo para caracterizar o fenótipo basal). Comparativamente, ocorreram as seguintes freqüências nos dois estudos, respectivamente: luminal A (44,0% *versus* 50,0%), luminal B (13,3% *versus* 14,1%), superexpressão de HER2 (13,3% *versus* 12,7%) e basal (29,3% *versus* 23,2%).

Por outro lado, as freqüências dos fenótipos do carcinoma de mama observadas no grupo de mulheres ≤ 45 anos quando se usou o perfil duplo-negativo e p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo para caracterizar o fenótipo basal foram semelhantes àquelas encontradas entre mulheres não afro-americanas com menos de 50 anos apresentadas no estudo de Carey

*et al.*¹⁹ (perfil triplo-negativo e CK5/6 e/ou EGFR positivo para caracterizar o fenótipo basal). Comparativamente, ocorreram as seguintes freqüências no presente estudo e no de Carey *et al.*¹⁹, respectivamente: luminal A (50,8% e 51,0%), basal (18,5% e 16,0%), luminal B (15,4% e 18,0%) e superexpressão de HER2 (15,4% e 6,0%).

Portanto, com esse último perfil IHQ, as freqüências dos fenótipos do carcinoma de mama do presente estudo entre mulheres ≤ 45 anos, não selecionadas por etnia, tiveram maior semelhança com os valores encontrados em mulheres pré-menopausa (< 50 anos) não afro-americanas do que com mulheres pré-menopausa (< 50 anos) afro-americanas do estudo de Carey *et al.*¹⁹. O fenótipo superexpressão de HER2 foi mais freqüente no presente estudo, porém no estudo de Carey *et al.*¹⁹ 10% dos casos que estão faltando ocuparam a categoria dos casos inclassificáveis.

Dessa forma, percebe-se como a etnia e os diferentes marcadores IHQ envolvidos na avaliação dos fenótipos do carcinoma de mama influenciam a proporção de casos que aparecem em cada grupo etário. Quando se usou o perfil duplo-negativo para definir o fenótipo basal e se comparou as freqüências dos fenótipos com o estudo de Ihemelandu *et al.*⁸, houve semelhança entre os resultados do presente estudo entre mulheres ≤ 45 anos, não selecionadas por etnia, e os resultados obtidos em mulheres < 50 anos afro-americanas. Já quando se usou o perfil duplo-negativo e p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo para caracterizar o fenótipo basal entre mulheres ≤ 45 anos, os resultados foram semelhantes àqueles encontrados entre mulheres não afro-americanas < 50 anos apresentados no estudo de Carey *et al.*¹⁹, que usou o perfil triplo-negativo e CK5/6 e/ou EGFR positivo para caracterizar o fenótipo basal.

Já entre as mulheres ≥ 65 anos deste estudo, considerando o perfil duplo-negativo para caracterizar o fenótipo basal, foram encontradas as seguintes freqüências: luminal A (54,5%), basal (13,6%), luminal B (13,6%) e superexpressão de HER2 (18,2%). O único estudo que avaliou a freqüência dos fenótipos neste grupo etário (> 65 anos) foi o de Ihemelandu *et al.*⁷, que usou o perfil triplo-negativo para caracterizar o fenótipo basal e avaliou apenas mulheres afro-americanas, obtendo resultados que diferem do presente estudo em que não houve seleção de mulheres de acordo com etnia: luminal A (68,9%), basal (17,0%), luminal B (5,6%) e superexpressão de HER2 (8,5%). Apenas a freqüência do fenótipo basal mostrou semelhança entre os dois estudos.

O estudo de Carey *et al.*¹⁹, que usou o perfil triplo-negativo e CK5/6 e/ou EGFR positivo para caracterizar o fenótipo basal, apesar de ser mais amplo no sentido de avaliar mulheres afro-americanas e não afro-americanas, não distribuiu as mulheres em grupos

etários específicos, e apenas avaliou o grupo mais velho sob a condição de pós-menopausa (> 50 anos). Portanto, não foi possível comparar seus resultados com os do presente estudo, que avaliou especificamente o grupo ≥ 65 anos.

A variabilidade de ocorrência do fenótipo basal nos diferentes grupos etários, de acordo com os marcadores escolhidos para caracterizá-lo, é bem evidente no estudo de Rakha *et al.*⁶⁸, que avaliou 1944 carcinomas de mama invasores de acordo com a expressão de determinados marcadores. O fenótipo caracterizado pela expressão de actina do músculo liso e/ou p63 foi mais comum em mulheres mais jovens, enquanto o fenótipo caracterizado pela expressão de CK5/6 e/ou CK14 não apresentou diferença de acordo com a idade⁶⁸. Ainda, Rakha *et al.*⁶⁸ relataram que o fenótipo mioepitelial (actina do músculo liso e/ou p63 positivo) diferiu em termos de prognóstico do fenótipo basal (CK5/6 e/ou CK14 positivo).

Entretanto, para Fadare *et al.*⁴¹ as células mioepiteliais do tecido mamário normal são caracterizadas por expressão de CK5/6, CK14, p63 e actina do músculo liso, mas frequentemente perdem actina do músculo liso em condições neoplásicas. Portanto, segundo opinião desses autores, a expressão de actina do músculo liso é provavelmente uma definição sem sentido para o fenótipo basal⁴¹. Ainda no estudo de Fadare *et al.*⁴¹, os carcinomas que são tradicionalmente considerados como tendo diferenciação mioepitelial apresentam positividade para CK basais, conceito que também difere daquele de Rakha *et al.*⁶⁸.

Assim, percebe-se a necessidade de se definir um perfil IHQ ideal para caracterizar o fenótipo basal tanto em estudos epidemiológicos, que avaliam fatores como idade e etnia, quanto na prática clínica, identificando os marcadores mais relacionados a prognóstico e que possam ser alvo de novas medicações a serem desenvolvidas especificamente para o fenótipo basal do carcinoma de mama. Uma definição precisa poderia ajudar a padronizar os estudos, criar um grupo uniforme de neoplasias assim definidas, e aumentar a probabilidade que quaisquer características prognósticas possam ser uniformemente aplicadas à maioria do grupo⁴¹.

Dessa forma, o presente estudo inicialmente classificou os carcinomas de mama em um fenótipo basal, de acordo com o perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) e pelo menos um marcador basal. As proteínas p63, CK5 e P-caderina foram escolhidas de acordo com o estudo de Matos *et al.*⁵, que os definiu como bons marcadores para caracterizar o fenótipo basal, já que encontrou as seguintes expressões nas neoplasias basais assim definidas: p63 (55,5% dos casos), CK5 (66,7% dos casos) e P-caderina (83,3% dos casos).

Reforçando a importância desses marcadores na definição do fenótipo basal, o mesmo grupo de pesquisa, em estudo recente, usou p63, CK5, P-caderina, CK14, vimentina e EGFR

(ou HER1) para identificar os carcinomas ductais *in situ* de fenótipo basal, e encontrou que CK5 e P-caderina (junto com o perfil duplo-negativo) foram os marcadores adjuvantes mais úteis para distinguir o fenótipo basal³⁰. Ainda, a motivação pelo uso dessas três proteínas foi pautada em estudos que mostram que, além de servirem como marcadores do fenótipo basal, p63, CK5 e P-caderina teriam relação com o prognóstico das neoplasias.

Dessa forma, muitos estudos têm demonstrado associação entre expressão de P-caderina e agressividade neoplásica e presença de mutação em *BRCAl*, sendo um preditor de sobrevida menor^{39,61,62}, enquanto outros concluem que a avaliação de P-caderina não adiciona informação prognóstica significativa às neoplasias triplo-negativo (RE negativo/RP negativo/HER2 negativo)²¹.

A expressão de p63 também estaria relacionada à agressividade do carcinoma de mama, sendo associada com vários indicadores de prognóstico ruim³⁵. Porém, um inconveniente demonstrado por Livasy *et al.*¹⁸ é que, em seu estudo, a maioria das neoplasias de fenótipo basal não expressou p63, sendo positivo em apenas 22% desses casos.

Já a avaliação de citoqueratinas basais, como CK5/6 e CK14, é amplamente conhecida entre neoplasias de fenótipo basal^{16,18}, muitas vezes sendo usadas como marcadores exclusivos para definir este fenótipo^{21,56,69}. A expressão de CK basais em neoplasias triplo-negativo varia de 55,7% a 81%^{21,70}, e entre neoplasias basais, definidas por expressão gênica, é positiva em aproximadamente 61,5% dos casos^{16,18}. Portanto, inicialmente, poderiam ser bons marcadores do fenótipo basal. Ainda, Banerjee *et al.*⁶⁹, ao definir o fenótipo basal de acordo com a expressão de CK basais (CK5/6, CK14, CK17), observaram que essas neoplasias foram associadas com sobrevida livre de doença e sobrevida total significativamente menores, semelhante ao encontrado por Rakha *et al.*⁶⁸, e a quimioterapia adjuvante padrão parece ser menos efetiva nessas neoplasias⁶⁹.

Em um recente estudo em que Rakha *et al.*⁷¹ avaliaram o padrão de expressão de citoqueratinas basais (CK5/6 e CK14), RE, receptor de progesterona (RP), receptor de androgênio, EGFR, HER2, *BRCAl*, P-caderina, actina do músculo liso e p63 em carcinomas de mama invasores, concluíram que o fenótipo basal pode ser definido baseado na expressão de CK basais a despeito dos demais marcadores. E apesar desses marcadores adicionais serem associados à expressão de citoqueratinas basais, eles não serviram para aprimorar o reconhecimento de casos com pior prognóstico quando comparados com as CK basais isoladas e, quando usados para definir o fenótipo basal, reduziram consideravelmente a proporção de casos alocados a este grupo de pior prognóstico⁷¹.

Por outro lado, o estudo de Rakha *et al.*²¹ sobre a expressão de CK basais (CK5/6 e/ou CK14) em neoplasias triplo-negativo mostrou que estas poderiam acrescentar informação prognóstica importante apenas nos casos em que houvesse comprometimento linfonodal, sendo que essa é a mesma conclusão de Nielsen *et al.*¹⁶ ao estudar a expressão de CK5/6 e/ou CK17 em carcinomas de fenótipo basal. Fulford *et al.*⁵⁶, ao usarem a expressão de CK14 para identificar carcinomas basais, além de encontrar associação com prognóstico pior apenas em mulheres com doença metastática, observaram que entre aquelas sem doença metastática a expressão de CK14 indicou sobrevida livre de doença maior. Ainda, Fulford *et al.*⁵⁶ mostram que a sobrevida total em mulheres com carcinomas CK14 positivo ou CK14 negativo foi similar em cinco anos, e sobrevida à longo prazo foi maior entre mulheres com carcinomas CK14 positivo.

Isso mostra como a inconsistência das definições do fenótipo basal do carcinoma de mama que têm sido usadas em diversos estudos pode afetar significativamente os resultados obtidos a partir deles⁴¹. As diferentes definições atribuídas ao fenótipo basal do carcinoma de mama indubitavelmente influenciam a proporção de carcinomas classificados como basais e, provavelmente, afetam a significância prognóstica obtida por eles⁴¹.

Outros estudos conduzidos recentemente têm identificado variedades neoplásicas dentro do fenótipo basal. Rakha *et al.*⁶⁸ dividiram as neoplasias em um fenótipo basal (aquelas que expressaram CK5/6 e/ou CK14) e um fenótipo mioepitelial (aquelas que expressaram actina do músculo liso e/ou p63), sendo esses fenótipos considerados subtipos neoplásicos distintos, que compartilham algumas características morfológicas comuns e uma associação com pior prognóstico, porém o basal apresentou relação mais forte com prognóstico pior. Essa é a mesma impressão de Fadare *et al.*⁴¹, que avaliando neoplasias basais, concluíram que parece haver variedades de carcinoma dentro do fenótipo basal ou mioepitelial, assim como existiria uma gama de neoplasias dentro do fenótipo luminal (luminal A, luminal B).

Também considerando o fenótipo basal um grupo heterogêneo, Lerma *et al.*⁷⁰ dividiram as neoplasias triplo-negativo em subtipos de carcinoma de mama basais: a variante pura (negativa para S-100 e actina), que foi mais frequentemente associada com carcinoma ‘*in situ*’, e a variante mioepitelial (positiva para S-100 ou actina), e concluíram que o carcinoma basal tem no mínimo dois subtipos com características microscópicas e imunoistoquímicas distintas. Por outro lado, Kreike *et al.*²⁰ mostram que, baseado no perfil de expressão gênica global, cinco subtipos de carcinomas basais poderiam ser identificados, o que indica que as neoplasias de fenótipo basal não consistem em um grupo homogêneo de carcinomas de mama.

Existem várias linhas de evidências sugerindo que os carcinomas basais, especialmente aqueles definidos por IHQ, são mais heterogêneos que previamente se reconhecia⁴¹. É, portanto, imperativo que esforços de pesquisas futuras sejam focados na definição com relevância prognóstica dos subtipos dentro desse grupo de neoplasias enigmáticas, os carcinomas de fenótipo basal⁴¹. A caracterização dos perfis de expressão gênica dessas variedades será requerida para otimizar modalidades de tratamento⁴¹.

Assim, diante do exposto, observa-se que diferentes grupos de pesquisa têm optado por determinados marcadores, cada um mostrando níveis de sensibilidade e especificidade variáveis. Deve-se considerar que, quando se exige a expressão de pelo menos um marcador basal/mioepitelial, aquelas neoplasias que não expressam nenhum dos marcadores propostos caem na categoria das indeterminadas, e não recebem atenção, mesmo sendo neoplasias RE negativo, que se espera sejam mais agressivas.

Os autores que defendem a necessidade de um marcador basal para definir o fenótipo basal, como Nielsen *et al.*¹⁶, afirmam que os carcinomas basais classificados de acordo com o perfil duplo-negativo e CK5/6 e/ou EGFR positivo, além de apresentarem a melhor correlação com o perfil de expressão gênica por *DNA microarray*, também apresentam as mais significativas diferenças de sobrevida em TMA. Ainda, defendem que selecionar os carcinomas de mama como fenótipo basal com base apenas na não-expressão de RE e de HER2 (perfil duplo-negativo) seria arriscado, pois implicaria em uma classificação baseada na ausência total de marcação e que estaria sujeita a falhas técnicas, além de que o uso de ao menos um marcador basal seria necessário para assegurar alta especificidade, devido à heterogeneidade dentro do grupo todo negativo (RE negativo/HER2 negativo)¹⁶.

Por outro lado, observa-se que o uso de um único marcador basal, como CK5/6, apesar de identificar com sucesso um subgrupo de pacientes com pior prognóstico, ignora aproximadamente metade das neoplasias basais¹⁶, resultando na subdetecção de carcinomas basais geneticamente definidos, que foram negativos para esse marcador^{16,18,41}. No estudo de Nielsen *et al.*¹⁶, nota-se que existe grande sobreposição entre a expressão de CK5/6 e EGFR, pois houve 44,1% de positividade para EGFR nos casos CK5/6 positivo e apenas 7,9% de positividade para EGFR nos casos CK5/6 negativo. Portanto, exigir positividade para um dentre esses dois marcadores basais propostos para considerar a neoplasia como de fenótipo basal pode excluir muitos casos, que passam a ser considerados indeterminados (negativo para os quatro marcadores), mas que poderiam ser positivos para outros marcadores basais.

Assim, as neoplasias consideradas indeterminadas no estudo de Nielsen *et al.*¹⁶ (RE, HER2, CK5/6 e EGFR negativos) corresponderam a 22% do total de casos estudados,

enquanto no estudo de Kim *et al.*³² houve taxa de 15,9% (RE, RP, HER2, CK5, CK14, EGFR e c-kit negativos), um número muito alto para ser ignorado. Esse grupo precisa ser conhecido, afinal, à semelhança do fenótipo basal, foi um grupo que apresentou prognóstico ruim¹⁶. Além disso, como citado pelos próprios autores, alguns desses casos seriam neoplasias que entrariam nessa categoria por falhas técnicas ou poderiam ser carcinomas *normal breast-like*¹⁶. É pertinente ressaltar que os carcinomas *normal breast-like*, mesmo sendo um grupo minoritário, deveriam ser mais estudados, pois são neoplasias RE negativo e, portanto, podem ter comportamento mais agressivo.

Além disso, o perfil IHQ de Nielsen *et al.*¹⁶ mostrou 76% de sensibilidade e 100% de especificidade na identificação do fenótipo basal, assim determinado por *DNA microarray*. Porém, quando esses autores analisaram neoplasias classificadas por IHQ como RE negativo/HER2 negativo e verificaram por análise gênica de *microarray* aquelas de fenótipo basal, encontraram que 83% dos casos duplo-negativo apresentaram esse fenótipo. Assim, a maioria das neoplasias RE negativo/HER2 negativo (perfil duplo-negativo) foi constituída por carcinomas de mama basais, enquanto o perfil IHQ proposto por Nielsen *et al.*¹⁶ (RE negativo/HER2 negativo e CK5/6 e/ou EGFR positivo) conseguiu identificar 76% dos carcinomas basais.

Corroborando esses dados sobre o perfil duplo-negativo, Carey *et al.*⁷², ao realizarem uma análise combinada dos dados apresentados nos estudos de Nielsen *et al.*¹⁶ e de Livasy *et al.*¹⁸, mostraram que deste conjunto de 70 neoplasias, 94% dos carcinomas de fenótipo basal, 92% dos carcinomas de fenótipo superexpressão de HER2 e 100% dos carcinomas de fenótipo luminal seriam corretamente identificados usando apenas RE e HER2 como marcadores.

Dessa forma, se o perfil duplo-negativo incluiu entre seus casos neoplasias, por exemplo, *normal breast-like*, e não teve especificidade adequada, o perfil IHQ de Nielsen *et al.*¹⁶ deixou de identificar 24% dos carcinomas basais. Neste cenário, portanto, se o perfil duplo-negativo acabasse casualmente abrangendo neoplasias *normal breast-like*, que são RE negativo e como tais possivelmente se beneficiassem de quimioterapia mais agressiva, poderia ser menos danoso do que deixar de identificar neoplasias de fenótipo basal e não oferecer tratamento agressivo às mesmas.

Os autores que optaram em seus estudos pelos perfis duplo e triplo-negativo também alcançaram resultados positivos com seu uso. Assim, Livasy *et al.*¹⁸, ao estudarem 18 neoplasias de fenótipo basal classificadas desta forma por análise de expressão gênica, encontraram 100% delas como sendo RE negativo/HER2 negativo quando realizada IHQ

(perfil duplo-negativo). A aplicação do perfil duplo-negativo mais CK5/6 e/ou EGFR positivo aos dados do estudo de Livasy *et al.*¹⁸ mostrou que tal perfil IHQ teve sensibilidade de apenas 55% (encontrado em 10 de 18 carcinomas basais), e especificidade de 100%⁴¹.

Também Kreike *et al.*²⁰, ao analisarem 97 neoplasias de perfil triplo-negativo por IHQ, observaram que todas elas se agruparam junto com aquelas de fenótipo basal na análise de expressão gênica, diferente dos casos não triplo-negativo que se agruparam junto com os demais fenótipos. Neste estudo, portanto, as neoplasias triplo-negativo foram consideradas o mesmo grupo de neoplasias de fenótipo basal no perfil de expressão gênica²⁰. Assim, esses autores afirmam ser racional definir o fenótipo basal como triplo-negativo por IHQ, não sendo requeridos perfil de expressão gênica ou marcadores imunistoquímicos adicionais para identificar neoplasias de fenótipo basal²⁰.

Rakha *et al.*²¹ destacam que 80 a 90% das neoplasias de perfil triplo-negativo (RE negativo/RP negativo/HER2 negativo) são basais e apresentam um comportamento clínico similar ao comportamento basal. Dos 1726 casos de carcinomas de mama invasores estudados por esses pesquisadores, 16,3% apresentaram perfil triplo-negativo²¹, taxa semelhante aos 15% de carcinomas basais identificados pelo perfil IHQ de Nielsen *et al.*¹⁶ (RE negativo/HER2 negativo e CK5/6 positivo e/ou EGFR positivo). No estudo de Rakha *et al.*²¹, o perfil triplo-negativo mostrou associação com sobrevida total menor e intervalo livre de doença menor, além de grau histológico elevado, semelhante às neoplasias de fenótipo basal. Portanto, o perfil triplo-negativo foi por si só um indicador prognóstico²¹.

Silva *et al.*²⁹, que usam como painel IHQ padrão para carcinoma de mama RE, RP, HER2, CK14 e CK5/6, fazem uma importante colocação em seu estudo. Destacam que neoplasias com determinadas características morfológicas e um perfil triplo-negativo alertariam o patologista para a possibilidade desse carcinoma ter um fenótipo basal, e que a marcação posterior com citoqueratinas de alto peso molecular (CK14, CK5/6) confirmaria a suspeita, apesar de lembrarem que até o momento não existe consenso sobre quais CK ou marcadores basais deveriam ser usados²⁹.

A importância da especificidade para caracterizar o fenótipo basal teria justificativa, por exemplo, na seleção de pacientes para testes de mutação *BRC1A1*. Lakhani *et al.*²⁵ sugerem que uma combinação de características morfológicas, RE negativo e expressão de CK basal poderia funcionar como uma ferramenta preditiva poderosa para identificar portadores de mutação *BRC1A1* e ainda poderia ser útil para selecionar pacientes para testes de mutação *BRC1A1*.

Essa questão é bem pertinente quando se pondera que muitas mulheres que são portadoras de mutações no gene *BRCA1* podem não ter uma história familiar positiva de carcinoma de mama e/ou ovário²⁹. Assim, encontrar um carcinoma em uma mulher jovem com características morfológicas e imunofenóticas indicando fenótipo basal poderia ajudar a alertar médicos para a possibilidade de predisposição familiar²⁹.

Uma última ponderação é sobre o EGFR (receptor do fator de crescimento epidérmico). No estudo de Livasy *et al.*¹⁸, o EGFR foi positivo em 72% das neoplasias basais, para Lerma *et al.*⁷⁰ foi positivo em 77% das neoplasias triplo-negativo, entretanto no estudo de Kreike *et al.*²⁰ apenas 27% das neoplasias triplo-negativo foram positivas para EGFR. É importante destacar que o EGFR, mesmo com essa variabilidade de expressão nos diferentes estudos, talvez mereça ser pesquisado em neoplasias basais, devido ao seu potencial como alvo terapêutico^{20,28,29,73}. Terapias anti-EGFR como cetuximab, gefitinib e erlotinib estão sendo testadas em ensaios clínicos^{16,29,30,73}.

Portanto, o presente estudo encontrou maior frequência do fenótipo basal comparativamente ao grupo não-basal em mulheres ≤ 45 anos do que em mulheres ≥ 65 anos, sem selecionar a amostra por etnia, e usando o perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) para caracterizar o fenótipo basal. Diante disso, seria plausível selecionar os carcinomas de mama em fenótipo basal com base no perfil duplo-negativo ou triplo-negativo²⁰, pois neoplasias RE negativo/HER2 negativo, apesar de sensibilidade à quimioterapia inicialmente, terão pior prognóstico e necessitarão de esquemas de quimioterapia mais agressivos⁷². Ainda, diante do arsenal terapêutico atualmente disponível, que é restrito para o fenótipo basal do carcinoma de mama, são os casos que devem ser obrigatoriamente identificados.

Assim, futuramente, os marcadores basais/mioepiteliais que identificassem com maior fidedignidade os subtipos neoplásicos que estão sendo mapeados dentro do fenótipo basal, poderiam ser pesquisados na medida em que surgissem drogas que tivessem como alvo terapêutico os marcadores mais frequentes e adequados em cada subtipo dentro do fenótipo basal. A caracterização dos perfis de expressão gênica dessas variedades será requerida para otimizar modalidades de tratamento⁴¹. Ainda, marcadores basais poderão ser pesquisados quando se quer ter uma grande especificidade para o fenótipo basal, em casos específicos em que haja intenção de selecionar pacientes para testes de mutação em *BRCA1*²⁵.

6 CONCLUSÕES

Respostas aos Objetivos Específicos

1. As frequências dos fenótipos do carcinoma de mama em mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos, com o perfil duplo-negativo e os marcadores basais (p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo) definindo o fenótipo basal foram, respectivamente: luminal A (50,8% e 58,1%), luminal B (15,4% e 14,5%), superexpressão de HER2 (15,4% e 19,4%) e basal (18,5% e 8,1%). As frequências dos fenótipos com apenas o perfil duplo-negativo definindo o fenótipo basal, nos dois grupos etários foram, respectivamente: luminal A (44,0% e 54,5%), luminal B (13,3% e 13,6%), superexpressão de HER2 (13,3% e 18,2%) e basal (29,3% e 13,6%). A diferença entre os grupos etários não foi estatisticamente significativa em nenhuma das situações ($P=0,3650$ e $P=0,1535$).
2. A frequência dos grupos basal e não-basal em mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos, com o perfil duplo-negativo e os marcadores basais (p63 e/ou CK5 e/ou P-caderina positivo) definindo o fenótipo basal foram, respectivamente: fenótipo basal (18,5% e 8,1%) e grupo não-basal (81,5% e 91,9%). A frequência dos grupos basal e não-basal em mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos, com o perfil duplo-negativo definindo o fenótipo basal foram, respectivamente: fenótipo basal (29,3% e 13,6%) e grupo não-basal (70,7% e 86,4%). Não houve diferença significativa na primeira situação, ($P=0,0854$), mas a diferença foi estatisticamente significativa na segunda situação ($P= 0,0247$).
3. Carcinomas de mama diagnosticados em idade mais jovem (≤ 45 anos) foram mais frequentemente RE negativo/HER2 negativo do que quando diagnosticados em idade mais velha (≥ 65 anos). Quando foi usado o perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) para caracterizar o fenótipo basal, e este foi comparado com o conjunto dos demais fenótipos agrupados sob a denominação de não-basal (fenótipos luminal A, luminal B e superexpressão de HER2), houve maior frequência do fenótipo basal em mulheres ≤ 45 anos (29,3%) do que em mulheres ≥ 65 anos (13,6%) ($P=0,0247$).

Considerações Finais

Diante da tendência atual em fragmentar o fenótipo basal do carcinoma de mama em variedades neoplásicas^{20,41,68,70}, assim como o fenótipo luminal já é dividido em luminal A e luminal B, toma-se como rotina básica usar o perfil duplo-negativo ou o triplo-negativo para alertar o patologista e o clínico para a possibilidade do carcinoma ter um fenótipo basal²⁹. Mesmo que estudos recentes mostrem que carcinomas de mama com perfil duplo-negativo sejam verdadeiramente basais em 83% dos casos¹⁶ e carcinomas de mama com perfil triplo-negativo sejam verdadeiramente basais em 80-90% dos casos²¹, ou até mesmo em todos os casos²⁰, ainda assim se realiza marcação posterior com marcadores basais para confirmar a suspeita²⁹.

Sugestão para futuro estudo

É importante que se prossiga estudando esses dois grupos etários (mulheres ≤ 45 anos e mulheres ≥ 65 anos) para estabelecer se as mulheres que tiveram carcinomas de mama de fenótipo basal caracterizados pelo perfil duplo-negativo (RE negativo/HER2 negativo) apresentam pior prognóstico, tanto comparativamente, avaliando o prognóstico do fenótipo basal nos dois grupos etários, quanto em relação aos demais fenótipos (luminal A, luminal B e superepressão de HER2).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005 Mar-Apr;55(2):74-108.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de câncer no Brasil [homepage na Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2005. [acesso em 20 de junho de 2007]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/>.
3. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2007 [homepage na Internet]. Atlanta: American Cancer Society; 2007. [acesso em 14 de fevereiro de 2007]. Disponível em: <http://www.cancer.org/>.
4. World Health Organization [homepage na Internet]. WHO Global InfoBase Online. Cancer Review. The Impact of Cancer. [acesso em 18 de junho de 2007]. Disponível em: <http://www.who.int/research/en/>.
5. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005 Oct;447(4):688-94.
6. Paredes J, Albergaria A, Carvalho S, Schmitt FC. “Basal-like” breast carcinomas: identification by the expression of basal cytokeratins, P-cadherin, P63 and EGFR. *Appl. Cancer Res.* 2006;26(2):41-55.
7. Ihemelandu CU, Leffall LD Jr, Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal african-american women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res.* 2007 Nov;143(1):109-18.
8. Ihemelandu CU, Leffall LD Jr, Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal african-american women, tumor biologic factors and clinical outcome. *Ann Surg Oncol.* 2007 Oct;14(10):2994-3003.
9. Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
10. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
11. Sørlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Jul 8;100(14):8418-23.

12. Böcker W, Moll R, Poremba C, Holland R, Van Diest PJ, Dervan P, et al. Common adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest.* 2002 Jun;82(6):737-46.
13. Bertucci F, Birnbaum D, Gonçalves A. Proteomics of breast cancer: principles and potential clinical applications. *Mol Cell Proteomics.* 2006 Oct;5(10):1772-86.
14. Sørlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer.* 2004 Dec;40(18):2667-75.
15. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics.* 2006 Apr 27;7:96.
16. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004 Aug 15;10(16):5367-74.
17. Sørlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics.* 2006 May 26;7:127.
18. 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 Feb;19(2):264-71.
19. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
20. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Bartelink H, Van de Vijver MJ. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2007 Oct 2;9(5):R65.
21. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007 Jan 1;109(1):25-32.
22. Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, Tagett R, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E. Basal and luminal breast cancers: basic or luminous? (review). *Int J Oncol.* 2004 Aug;25(2):249-58.
23. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2003 Oct 1;95(19):1482-5.
24. Gusterson BA, Ross DT, Health VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2005 Jul;7(4):143-8.
25. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res.* 2005 Jul 15;11(14):5175-80.

26. Bane AL, Beck JC, Bleiweiss I, Buys SS, Catalano E, Daly MB, et al. BRCA2 mutation-associated breast cancers exhibit a distinguishing phenotype based on morphology and molecular profiles from tissue microarrays. *Am J Surg Pathol*. 2007 Jan;31(1):121-8.
27. Troester MA, Herschkowitz JI, Oh DS, He X, Hoadley KA, Barbier CS, et al. Gene expression patterns associated with p53 status in breast cancer. *BMC Cancer*. 2006 Dec 6;6:276.
28. Yehiely F, Moyano JV, Evans JR, Nielsen TO, Cryns VL. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends Mol Med*. 2006 Nov;12(11):537-44.
29. Silva LD, Clarke C, Lakhani SR. Basal-like breast cancer. *J Clin Pathol*. 2007 May 11. Cited in PubMed; PMID: 17496191.
30. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch*. 2007 Jan;450(1):73-80.
31. Kusinska R, Potemski P, Jesionek-Kupnicka D, Kordek R. Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma--relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2. *Pol J Pathol*. 2005;56(3):107-10.
32. Kim MJ, Ro JY, Ahn SH, Kim HH, Kim SB, Gong G. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Hum Pathol*. 2006 Sep;37(9):1217-26.
33. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, et al. Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res*. 2006 Mar 1;12(5):1533-9.
34. Dufloth R, Matos I, Schmitt FC, Zeferino LC. Tissue microarrays for testing basal biomarkers in familial breast cancer. *Sao Paulo Med J*. 2007 Jul;125(4):226-230.
35. Ribeiro-Silva A, Zambelli Ramalho LN, Britto Garcia S, Zucoloto S. The relationship between p63 and p53 expression in normal and neoplastic breast tissue. *Arch Pathol Lab Med*. 2003 Mar;127(3):336-40.
36. Yang A, Kaghad M, Wang Y, Gillett E, Fleming MD, Dötsch V, et al. p63, a p53 homolog at 3q27-29, encodes multiple products with transactivating, death-inducing, and dominant-negative activities. *Mol Cell*. 1998 Sep;2(3):305-16.
37. Kovács A, Walker RA. P-cadherin as a marker in the differential diagnosis of breast lesions. *J Clin Pathol*. 2003 Feb;56(2):139-41.
38. Kovács A, Dhillon J, Walker RA. Expression of P-cadherin, but not E-cadherin or N-cadherin, relates to pathological and functional differentiation of breast carcinomas. *Mol Pathol*. 2003 Dec;56(6):318-22.

39. Arnes JB, Brunet JS, Stefansson I, Bégin LR, Wong N, Chappuis PO, et al. Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2005 Jun 1;11(11):4003-11.
40. Vieira DSC. Desempenho dos marcadores EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2007.
41. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol.* 2007 Sep;14(5):358-73.
42. Nose A, Takeichi M. A novel cadherin cell adhesion molecule: its expression patterns associated with implantation and organogenesis of mouse embryos. *J Cell Biol.* 1986 Dec;103(6 Pt 2):2649-58.
43. Stern DF. ErbBs in mammary development. *Exp Cell Res.* 2003 Mar 10;284(1):89-98.
44. El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, Geara FB, et al. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer.* 2006 Jul 20;6:194.
45. Han W, Kim SW, Park IA, Kang D, Kim SW, Youn YK, et al. Young age: an independent risk factor for disease-free survival in women with operable breast cancer. *BMC Cancer.* 2004 Nov 17;4:82.
46. Albain KS, Allred DC, Clark GM. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? *J Natl Cancer Inst Monogr.* 1994;(16):35-42.
47. Love RR, Duc NB, Dinh NV, Quy TT, Xin Y, Havighurst TC. Young age as an adverse prognostic factor in premenopausal women with operable breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2002 Jan;2(4):294-8.
48. Foo CS, Su D, Chong CK, Chng HC, Tay KH, Low SC, et al. Breast cancer in young Asian women: study on survival. *ANZ J Surg.* 2005 Jul;75(7):566-72.
49. Dubsy PC, Gnant MF, Taucher S, Roka S, Kandioler D, Pichler-Gebhard B, et al. Young age as an independent adverse prognostic factor in premenopausal patients with breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2002 Apr;3(1):65-72.
50. Guerra I, Algorta J, Díaz de Otazu R, Pelayo A, Fariña J. Immunohistochemical prognostic index for breast cancer in young women. *Mol Pathol.* 2003 Dec;56(6):323-7.
51. Oliveira ARD. Correlação dos principais fatores prognósticos no câncer de mama entre mulheres jovens e idosas atendidas no Serviço de Mastologia da Maternidade Carmela Dutra de Florianópolis [dissertação]. Florianópolis (SC): Universidade Federal de Santa Catarina; 2005.
52. Figueiredo JC, Ennis M, Knight JA, McLaughlin JR, Hood N, O'malley F, et al. Influence of young age at diagnosis and family history of breast or ovarian cancer on breast cancer outcomes in a population-based cohort study. *Breast Cancer Res Treat.* 2007 Sep;105(1):69-80.

53. Talley LI, Grizzle WE, Waterbor JW, Brown D, Weiss H, Frost AR. Hormone receptors and proliferation in breast carcinomas of equivalent histologic grades in pre- and postmenopausal women. *Int J Cancer*. 2002 Mar 1;98(1):118-27.
54. Musolino A, Bella MA, Bortesi B, Michiara M, Naldi N, Zanelli P, et al. BRCA mutations, molecular markers, and clinical variables in early-onset breast cancer: A population-based study. *Breast*. 2007 Jun;16(3):280-92.
55. Eerola H, Heikkilä P, Tamminen A, Aittomäki K, Blomqvist C, Nevanlinna H. Relationship of patients' age to histopathological features of breast tumours in BRCA1 and BRCA2 and mutation-negative breast cancer families. *Breast Cancer Res*. 2005;7(4):R465-9.
56. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R4.
57. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1721-8.
58. Jatoi I, Chen BE, Anderson WF, Rosenberg PS et al. Breast cancer mortality trends in the United States according to estrogen receptor status and age at diagnosis. *J Clin Oncol*. 2007 May 1;25(13):1683-90.
59. Dufloth R. Carcinoma de mama hereditário em mulheres brasileiras: mutações dos genes de *BRCA1* e *BRCA2*, polimorfismos dos genes de reparo do DNA e caracterização imunoistoquímica pela técnica de *Tissue Microarray* [tese]. Campinas (SP): Universidade Estadual de Campinas; 2004.
60. Paredes JCAF, Milanezi MFG, Reis-Filho JS, Leitão DRA, Athanzio DA, Schmitt FCL. Correlação entre as expressões de P-caderina e de receptores de estrógeno no câncer de mama. *J Bras Patol Med Lab*. 2002;38(4):307-13.
61. Paredes J, Milanezi F, Reis-Filho JS, Leitão D, Athanzio D, Schmitt F. Aberrant P-cadherin expression: is it associated with estrogen-independent growth in breast cancer? *Pathol Res Pract*. 2002;198(12):795-801.
62. Paredes J, Albergaria A, Oliveira JT, Jerónimo C, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin overexpression is an indicator of clinical outcome in invasive breast carcinomas and is associated with CDH3 promoter hypomethylation. *Clin Cancer Res*. 2005 Aug 15;11(16):5869-77.
63. Prati R, Apple SK, He J, Gornbein JA, Chang HR. Histopathologic characteristics predicting HER-2/neu amplification in breast cancer. *Breast J*. 2005 Nov-Dec;11(6):433-9.

64. Huang HJ, Neven P, Drijckoningen M, Paridaens R, Wildiers H, Van Limbergen E, et al. Hormone receptors do not predict the HER2/neu status in all age groups of women with an operable breast cancer. *Ann Oncol.* 2005 Nov;16(11):1755-61.
65. Reis-Filho JS, Milanezi F, Paredes J, Silva P, Pereira EM, Maeda SA, et al. Novel and classic myoepithelial/stem cell markers in metaplastic carcinomas of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003 Mar;11(1):1-8.
66. Altman, DG. *Practical statistics for medical research.* 1 ed. London: Chapman & Hall; 1991.
67. Kurebayashi J, Moriya T, Ishida T, Hirakawa H, Kurosumi M, Akiyama F, et al. The prevalence of intrinsic subtypes and prognosis in breast cancer patients of different races. *Breast.* 2007 Nov;16 Suppl 2:72-7.
68. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol.* 2006 Mar;208(4):495-506.
69. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol.* 2006 Jul;59(7):729-35.
70. Lerma E, Peiro G, Ramón T, Fernandez S, Martinez D, Pons C, et al. Immunohistochemical heterogeneity of breast carcinomas negative for estrogen receptors, progesterone receptors and Her2/neu (basal-like breast carcinomas). *Mod Pathol.* 2007 Nov;20(11):1200-7.
71. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology.* 2007 Mar;50(4):434-8.
72. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329-34.
73. Siziopikou KP, Cobleigh M. The basal subtype of breast carcinomas may represent the group of breast tumors that could benefit from EGFR-targeted therapies. *Breast.* 2007 Feb;16(1):104-7.

NORMAS ADOTADAS

Este trabalho foi realizado seguindo a normalização para trabalhos de conclusão do Curso de Graduação em Medicina, aprovada em reunião do Colegiado do Curso de Graduação em Medicina da Universidade Federal de Santa Catarina, em 27 de novembro de 2005.

ANEXOS

ANEXO 1



Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil



Grupo de Pesquisa Cagima



Identificação	Recursos Humanos	Linhas de Pesquisa	Indicadores do Grupo
---------------	------------------	--------------------	----------------------

Identificação

Dados básicos

Nome do grupo: Cagima

Status do grupo: **certificado pela instituição**

Ano de formação: 2000

Data da última atualização: 09/08/2007 14:46

Lider(es) do grupo: Luiz Carlos Zeferino - luiz.zeferino@pq.cnpq.br

Sophie Françoise Mauricette Derchain - sophie.derchain@pq.cnpq.br

Área predominante: Ciências da Saúde; Medicina

Instituição: Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP

Órgão: Faculdade de Ciências Médicas Caism

Unidade: Departamento de Tocoginecologia

Endereço

Logradouro: AV. ALEXANDER FLEMING, 101

Bairro: CIDAD. UNIV. ZEFERINO VAZ

CEP: 13083881

Cidade: Campinas

UF: SP

Telefone: 35219516

Fax: 35218302

E-mail: zeferino@caism.unicamp.br

Home page: <http://www.caism.unicamp.br>

Repercussões dos trabalhos do grupo

Aumentar o conhecimento sobre a carcinogênese e a fisiopatologia, que inclui os mecanismos celulares e moleculares envolvidos na defesa, progressão e patogenicidade das neoplasias ginecológicas e mamárias, em busca de avanços na orientação e aprimoramento das ações preventivas, de rastreamento, diagnósticas e terapêuticas; contribuir para o conhecimento do processo de invasão tumoral, em especial a transformação da neoplasia intra-epitelial em carcinoma invasivo; aprimorar o conhecimento sobre a epidemiologia e história natural da neoplasia do colo uterino em busca de novos parâmetros para a definição de estratégias e normas, visando a aumentar o desempenho do rastreamento desta doença; identificar marcadores de prognóstico e testar novas técnicas terapêuticas que auxiliem no planejamento terapêutico e no seguimento dos pacientes tratados.

Recursos humanos

Pesquisadores

[Cecilia Maria Roteli-Martins](#)

[Glauce Aparecida Pinto](#)

[Jose Vassallo](#)

[Julio Cesar Teixeira](#)

[Luiz Carlos Zeferino](#)

[Maria Salete Costa Gurgel](#)

[Rita Goreti Amaral](#)

[Rozany Mucha Dufloth](#)

Total: 12

[Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade](#)
[Luís Otávio Zanatta Sarian](#)

[Sílvia Helena Rabelo dos Santos](#)
[Sophie Françoise Mauricette Derchain](#)

Estudantes	Total: 14
-------------------	------------------

Adriana Cássia Paiva Santos	Marcela Ponzio Pinto Silva
Anne Melina Ambrósio Avelar	Raphael Augusto Pioli de Freitas
Claudia Cristina Camisão	Renata Clementino Gontijo
Eliana Borin Lopes Montemor	Rosana Franco
Joana Froes Bragança Bastos	Sabas Carlos Vieira
Jung Hyun Yoon	Tatiane Fernandes
Karen Vicência Pingarilho Lombardelli	Vera Lúcia Rezende

Técnicos	Total: 10
-----------------	------------------

Cristiano Aparecido Chagas - Ensino Médio (2o grau) - Técnico de Laboratório
 Deise Regina Juliette Voltani - Graduação - Técnico de Laboratório
 Douglas Munhoz Montis - Graduação - Médico
 Elisabete Aparecida Campos - Graduação - Biólogo
 Érika Simone Lopes - Graduação - Bioquímico
 Gislaïne Aparecida F Carasan - Graduação - Estatístico
 Julia Kawamura Tambascia - Graduação - Médico
 Lucia Maria F de Carvalho - Graduação - Biólogo
 Maria Cristina do Amaral Westin - Graduação - Médico
 Sirlei Siani Morais - Graduação - Estatístico

Linhas de pesquisa	Total: 3
---------------------------	-----------------

- [Avaliação dos Procedimentos Diagnósticos e Terapêuticos do Câncer Ginecológico e Mamário](#)
- [Epidemiologia e Prevenção do Câncer Ginecológico e Mamário](#)
- [Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Patogênese e na Progressão do Câncer Ginecológico e Mamário.](#)

Relações com o setor produtivo	Total: 0
---------------------------------------	-----------------

Indicadores de recursos humanos do grupo	
Integrantes do grupo	Total
Pesquisador(es)	12
Estudante(s)	14
Técnico(s)	10



Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil



Linha de Pesquisa

Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Patogênese e na Progressão do Câncer Ginecológico e Mamário.

Linha de pesquisa

Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Patogênese e na Progressão do Câncer Ginecológico e Mamário.

Nome do grupo: [Cagima](#)

Palavras-chave: Câncer da Mama; Câncer do Colo Uterino; HPV; Membrana Basal; Oncogene; p53;

Pesquisadores:

[Glauce Aparecida Pinto](#)
[Jose Vassallo](#)
[Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade](#)
[Luis Otávio Zanatta Sarian](#)
[Luiz Carlos Zeferino](#)
[Maria Salete Costa Gurgel](#)
[Rozamy Mucha Duffloth](#)
[Sílvia Helena Rabelo dos Santos](#)
[Sophie Françoise Mauricette Derchain](#)

Estudantes:

[Jung Hyun Yoon](#)
[Renata Clementino Gontijo](#)
[Sabas Carlos Vieira](#)

Árvore do conhecimento:

Ciências da Saúde; Medicina; Clínica Médica; Cancerologia;
Ciências da Saúde; Medicina; Anatomia Patológica e Patologia Clínica; Biologia Molecular e Imuno Histoquímica;

Setores de aplicação:

Saúde humana

Objetivo:

ANEXO 2

Universidade Federal de Santa Catarina
Pró-Reitoria de Pesquisa
Departamento de Projetos
Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica - PIBIC/CNPq
Programa de Bolsas de Iniciação à Pesquisa - BIP/UFSC



TERMO DE OUTORGA 2007/2008



BENEFICIÁRIO

Nome: ALINE SCHMITT POLIDORO	CPF:	Curso: MEDICINA	
Matrícula: 2254212		Agência Banco do Brasil:	Conta Banco do Brasil:
e-mail:			

ORIENTADOR

Nome: ROZANY MUCHA DUFLOTH	e-mail: :
Depto: DEPTO DE PATOLOGIA	Centro: CENTRO DE CIENCIAS DA SAUDE

TÍTULO DO PROJETO

PERFIL FENOTÍPICO DO CARCINOMA DE MAMA EM DOIS GRUPOS ETÁRIOS DISTINTOS.

VIGÊNCIA DA BOLSA

Início: agosto de 2007	Término: julho de 2008
------------------------	------------------------

CONDIÇÕES GERAIS

1. Ao aceitar a concessão, que ora lhe é feita, compromete-se o beneficiário a dedicar-se, com exclusividade, às atividades pertinentes à bolsa concedida.

2. COMPROMETE-SE AINDA O BENEFICIÁRIO A:

- a) não possuir vínculo empregatício nem receber salário ou remuneração decorrente do exercício de atividades de qualquer natureza, inclusive de estágio remunerado, durante a vigência da bolsa;
- b) dedicar-se integralmente às atividades acadêmicas e de pesquisa, em ritmo compatível com as atividades exigidas pelo curso;
- c) não se afastar da UFSC, exceto para a realização de pesquisa de campo, participação em evento científico ou estágio de pesquisa, por período limitado (até 3 meses) e com autorização expressa da Pró-Reitoria de Pesquisa da UFSC, após solicitação justificada e endossada pelo orientador;
- d) não reprovar durante a vigência da bolsa (semestres 2007.2 e 2008.1), sob pena de não poder candidatar-se à renovação para o Programa 2008/2009;
- e) apresentar os resultados finais da pesquisa, sob a forma exposições orais, pôsteres, resumos e/ou painéis (Seminário de Iniciação Científica da UFSC), acompanhado de um Relatório Final com redação científica, que permita verificar o acesso a métodos científicos;
- f) estar recebendo apenas esta modalidade de bolsa, sendo vedada a acumulação desta com a de outros programas do CNPq, de outra agência ou da própria UFSC;
- g) devolver ao CNPq, em valores atualizados, a(s) mensalidade(s) recebidas indevidamente, caso os requisitos e compromissos estabelecidos acima não sejam cumpridos;

3. COMPROMETE-SE AINDA O ORIENTADOR A:

- a) responsabilizar-se pelo andamento do trabalho;
- b) comunicar à Pró-Reitoria imediatamente, e por escrito, todo e qualquer problema que possa porventura, surgir no desenvolvimento do trabalho. Caso não seja feita a comunicação, a responsabilidade será assumida pelo orientador;
- c) orientar o bolsista nas distintas fases do trabalho científico, na elaboração do Relatório Final e no material para apresentação dos resultados nos Anais do Seminário de Iniciação Científica da UFSC, em congressos, seminários e publicações científicas;
- d) participar como avaliador do Seminário de Iniciação Científica da UFSC e acompanhar as exposições do(s) bolsista(s) na medida do possível, por ocasião deste Seminário;
- e) incluir o nome dos bolsistas de Iniciação Científica nas publicações e nos trabalhos apresentados em congressos e seminários, cujos resultados tiverem a participação efetiva dos mesmos;
- f) observar os prazos estipulados para entrega do Relatório Final, substituição de bolsista, inscrição no Seminário, pedidos de renovação, etc...

4. O CNPq poderá cancelar ou suspender a bolsa quando constatada infração a qualquer das condições constantes deste termo e das normas aplicáveis a esta concessão, sem prejuízo da aplicação dos dispositivos legais que disciplinam o ressarcimento dos recursos.

5. O acompanhamento do bolsista de Iniciação Científica se dará de duas formas:

<http://www.dep.ufsc.br/pibic/termo/cadastro.php>

4/8/2007

a) SEMINÁRIO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UFSC. A UFSC realiza, anualmente, o Seminário de Iniciação Científica da UFSC, aberto a todos os alunos de graduação. Os bolsistas de Iniciação Científica deverão, OBRIGATORIAMENTE, apresentar os resultados de seu trabalho no Seminário (caso não seja possível, o orientador deverá justificar por escrito à Pró-Reitoria, antecipadamente). A participação no Seminário se dará através da elaboração de resumos, que comporão os Anais do Seminário e através da exposição de painéis e apresentação oral dos resultados obtidos;

b) RELATÓRIO FINAL: Cada bolsista deverá elaborar um Relatório Final referente às atividades desenvolvidas durante o período de vigência da bolsa, que permita verificar seu desempenho acadêmico e científico. Este Relatório deverá ser entregue pelo bolsista, com a sua assinatura e a do orientador, na Pró-Reitoria, até 29 de agosto de 2008. Estes Relatórios serão avaliados por consultores ad hoc e as observações e recomendações pertinentes retornarão a cada orientador para que possam dar conhecimento ao bolsista.

6. A substituição do bolsista, em casos excepcionais, será permitida de novembro de 2007 a abril de 2008, mediante o Formulário de Substituição/Cancelamento - acessado através do endereço <http://www.dep.ufsc.br/pibic>; este formulário deverá ser encaminhado até o último dia útil do mês anterior ao da substituição (a indicação do novo bolsista deve ser feita no momento do pedido de substituição ou, no máximo, em até 30 dias); não serão permitidas substituições nos três primeiros (agosto, setembro e outubro) e nos três últimos meses (maio, junho e julho) de vigência da bolsa; cada orientador só poderá fazer uma única substituição por bolsista; o cancelamento da bolsa poderá ser solicitado a qualquer momento, pelo não cumprimento das normas estabelecidas ou por solicitação do orientador, também através do Formulário de Substituição/Cancelamento, desde que justificado (poderá ser indicado o nome de um novo aluno até, no máximo, 30 dias após o pedido de cancelamento). Os bolsistas excluídos (cancelados ou substituídos) não poderão retornar ao sistema na vigência do Programa 2007/2008.

7. Os trabalhos publicados em decorrência das atividades pelo CNPq deverão, necessariamente, fazer referência ao apoio recebido, com as seguintes expressões:

- a) se publicado individualmente: "O presente trabalho foi realizado com o apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq - Brasil".
- b) se publicado em co-autoria: "Bolsista do CNPq - Brasil"

8. A não entrega do Relatório Final, bem como a sua não aprovação, é considerada inadimplência junto a esse Departamento e impeditivo à concessão de renovação ou de pedidos de novas bolsas por parte do orientador e do bolsista;

9. A concessão objeto do presente instrumento não gera vínculo de qualquer natureza ou relação de trabalho, constituindo doação, com encargos, feita ao beneficiário.

10. O beneficiário e o orientador manifestam sua integral e incondicional concordância com a concessão que ora é feita, comprometendo-se a cumprir fielmente as condições expressas neste instrumento e as normas que lhe são aplicáveis: Resolução Normativa Nº 017/2006/CNPq de 13 de julho de 2006 e Resolução Nº 032/CEPE, de 1º de junho de 1995.

Florianópolis, 04 de agosto 2007.

Assinatura do Bolsista: _____
ALINE SCHMITT POLIDORO

Assinatura do Orientador: _____
ROZANY MUCHA DUFLOTH

O presente termo entrará em vigor na data de sua assinatura

LEIA O PRESENTE TERMO DE OUTORGA COM BASTANTE ATENÇÃO.
ENTREGUE-O, DEVIDAMENTE ASSINADO, NO DIA 06 DE AGOSTO, NO MOMENTO DA REUNIÃO, NO AUDITÓRIO GARAPUVU
NÃO ESQUEÇA DE TIRAR UMA CÓPIA PARA VOCÊ.
CASO PRECISE ALTERAR/ACRESCENTAR ALGUMA INFORMAÇÃO, FAÇA-O ENVIANDO UM E-MAIL
PARA : dep@reitoria.ufsc.br
Toda e qualquer dúvida a respeito do Programa deve ser sanada diretamente junto ao DEPI/PRPe
através do e-mail: dep@reitoria.ufsc.br ou pelo tel. 3721-9332.
Qualquer nova informação será disponibilizada no www.dep.ufsc.br/pibic.

ANEXO 3

Protocolo otimizado e estabelecido pelo Laboratório de Imunoistoquímica

TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA (KIT LABVISION)

Caso as lâminas estejam protegidas com uma camada de parafina, devem ser colocadas numa cuvete de vidro, imersas em *Clear-Rite* (agente desparafinante, MICROM International) e colocadas posteriormente na estufa a 60°C. Após aproximadamente 30 minutos, deve-se proceder à desparafinação e hidratação dos cortes no aparelho Leica AutoStainer XL.

1. Recuperação Antigênica

Solução Retrieval

Diluir a solução retrieval (**Vector®**) 1/100 em água desionizada. Acertar o pH da solução a 6.00 (6.00-6.02). Pré-aquecer a solução em banho-maria a 98°C durante 5 minutos (numa cuvete de plástico). Colocar as lâminas durante 20 minutos (ou 30, conforme o anticorpo) na solução dentro do banho-maria e deixar arrefecer a solução à temperatura ambiente durante 5 minutos. Colocar as lâminas em PBS.

Solução de EDTA

Diluir a solução EDTA (Labvision) 1/100 em água destilada. Acertar o pH da solução a 8.00 (8.00-8.02). Pré-aquecer a solução em banho-maria a 98°C durante 5 minutos (numa cuvete de plástico). Colocar as lâminas durante 20 minutos na solução dentro do banho-maria e deixar arrefecer a solução à temperatura ambiente durante 5 minutos. Colocar as lâminas em PBS.

2. Bloqueio da Peroxidase Endógena

Para bloqueio da peroxidase endógena, coloca-se sobre a área delimitada (com caneta hidrofóbica) 100µl de solução de peróxido de hidrogênio a 3% diluído em metanol durante 10 minutos.

Lavagem em PBS 2-5 minutos (todas as lavagens podem ser feitas diretamente na lâmina a fim de evitar demasiados movimentos das *cores* do array).

3. Bloqueio de Reações Inespecíficas

Incubação das lâminas com 100µl de UltraVisonBlock durante 15 minutos.

Após a incubação, retirar o excesso de reagente escorrendo as lâminas e não lavar.

4. Anticorpo Primário

Incubação de 100µl de anticorpo primário durante 30 minutos à temperatura ambiente ou *overnight* a 4°C.

Lavagem em PBS 2-5 minutos.

5. Anticorpo Secundário Biotinilado

Incubação das lâminas com 100µl de anticorpo secundário biotinilado anti-polivalente durante 15 minutos.

Lavagem em PBS 2-5 minutos.

6. Complexo Streptavidina Peroxidase

Incubação das lâminas com 100µl do complexo streptavidina peroxidase durante 15 minutos.

Lavagem em PBS 2-5 minutos.

7. Cromogênio: Diaminobenzidina (DAB)

Preparar uma solução de diaminobenzidina: 2 gotas de cromogênio DAB para cada mililitro de substrato. Incubar durante 6-7 minutos. Lavagem em água corrente durante 5 minutos.

8. Contraste Nuclear

Contrastar os núcleos com Hematoxilina de Mayer, mergulhando as lâminas neste corante durante 30 segundos. Lavagem em água corrente (ter o cuidado para que a água não caia diretamente nas lâminas). A diferenciação é realizada por imersão repetida (cerca de 10 vezes) em água amoniacal 1%. Lavagem em água corrente. Após o contraste, desidratam-se as lâminas numa série crescente de álcoois (70%, 95% e absoluto).

ANEXO 4

FICHA PARA COLETA DE DADOS

Local: () SAP do HU () CAISM () Hospital São João

Ficha para Coleta de Dados de Número: |_|_|_|_|

Data da Coleta de Dados: |_|_| - |_|_| - |_|_|_|_|

Número do Prontuário: |_|_|_|_|_|_|_|_|

Data de Nascimento: |_|_| - |_|_| - |_|_|_|_|

Idade ao diagnóstico de carcinoma de mama: |_|_|_|_| anos

Laudos Anátomo-patológicos

Número do Exame: |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Data de Emissão do Exame: |_|_| - |_|_| - |_|_|_|_|

Laudos Imunoistoquímicos

Número do Exame: |_|_|_|_|_|_|_|_|_|_|

Data de Emissão do Exame: |_|_| - |_|_| - |_|_|_|_|

Receptor de Estrógeno: () Positivo () Negativo

Expressão da oncoproteína HER2: () Positivo () Negativo

Expressão de p63: () Positivo () Negativo

Expressão de P-caderina: () Positivo () Negativo

Expressão de CK5/6: () Positivo () Negativo

ANEXO 5



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARNA
 CAMPUS UNIVERSITÁRIO - TRINDADE CEP: 88040-900 - FLORIANÓPOLIS - SC
 TELEFONE (048) 234-1755 - FAX (048) 234-4069

PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 129/2007

I – IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: “Perfil fenotípico do carcinoma de mama em dois grupos etários distintos”.

Área: Medicina

Pesquisador Responsável: Rozany Mucha Duffloth

Co-orientador: Carlos Gilberto Crippa

Pesquisador Principal: Aline Schmitt Polidoro

Data da coleta dos dados: junho a julho de 2007

Instituição em que será realizado o estudo: Serviço de anatomia patológica do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago.

II – Objetivos

Gerais: 1. Verificar a frequência dos fenótipos basal e não-basal em mulheres com 35 anos ou menos de idade e em mulheres com 65 anos ou mais velhas; 2. Correlacionar estes fenótipos com grau histológico e os marcadores p53 e Ki67 nos dois grupos do estudo.

III – SUMÁRIO DO PROJETO: Trata-se de um estudo de conclusão de curso na área da medicina. Os dados serão coletados em torno de 100 mulheres com diagnóstico histopatológico de carcinoma invasor de mama, em dois grupos etários distintos: abaixo de 35 anos e acima de 65 anos de idade, selecionadas no laboratório médico e no serviço de anatomia patológica do HU. Serão estudadas as variáveis: idade do diagnóstico do carcinoma de mama, grau histológico do tumor e os marcadores imunoistoquímicos receptor de estrógeno, oncoproteína do gene HER2, p53 e Ki-67.

IV – COMENTÁRIO: A pesquisa proposta tem relevância científica e social. O tema faz parte da linha de atuação dos pesquisadores. O protocolo da pesquisa contém os documentos necessários para sua análise e exigidos pela legislação. O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) está adequado, sugere-se que para o grupo etário acima de 65 anos a fonte do TCLE seja no mínimo 14.

V – PARECER CEP:

(X) aprovado

Parecer:

Tendo em vista o exposto, somos de parecer favorável a aprovação do referido projeto.

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado, em reunião deste Comitê na data de 25 de junho de 2007.

Prof. Washington Portela de Souza

Coordenador do CEP

Fonte: CONEP/ANVS - Resoluções 196/96 e 251/97 do CNS.



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
HOSPITAL DE CLÍNICAS
SUPERINTENDÊNCIA



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, objetivando atender as exigências para a obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como representante legal da Instituição, tomei conhecimento do projeto de pesquisa: "Perfil fenotípico do carcinoma de mama em dois grupos etários distintos", e cumprirei os termos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares, e como esta instituição tem condição para o desenvolvimento deste projeto, autorizo a sua execução nos termos propostos.

Campinas, 29 de novembro de 2007

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Luiz Carlos Zeferino", written over a circular scribble.

PROF. DR. LUIZ CARLOS ZEFERINO
PROFESSOR LIVRE DOCENTE
FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS/ UNICAMP



DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, para atender as exigências para a obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como representante legal da Instituição, tomei conhecimento do projeto de pesquisa: “Perfil fenotípico do carcinoma de mama em dois grupos etários distintos”, e cumprirei os termos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares, e como esta instituição tem condição para o desenvolvimento deste projeto, autorizo a sua execução nos termos propostos.

Porto, 29 de Novembro de 2007

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'F. Schmitt', is written over the typed name.

Prof. Fernando Schmitt
Director da Unidade de Patologia
IPATIMUP