

**JACY MARIA ALVES**

**CRITÉRIOS CITOLÓGICOS PARA PREDIZER O FENÓTIPO  
BASAL DO CARCINOMA DE MAMA**

**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  
2008**

**JACY MARIA ALVES**

**CRITÉRIOS CITOLÓGICOS PARA PREDIZER O FENÓTIPO  
BASAL DO CARCINOMA DE MAMA**

**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: Profa. Dra. Rozany Mucha Dufloth  
Professor Co-orientador: Prof. MSc. Carlos Gilberto Crippa**

**Florianópolis  
Universidade Federal de Santa Catarina  
2008**

Alves, Jacy Maria

Critérios citológicos para predizer o fenótipo basal do carcinoma de mama / Jacy Maria Alves. – Florianópolis: UFSC, 2008.

x, 48 p.

Orientadora: Rozany Mucha Dufloth

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) – Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Medicina, 2008.

1. Carcinoma de mama. 2. Fenótipo basal. 3. Punção aspirativa por agulha fina – Trabalho de Conclusão de Curso. I. Dufloth, Rozany Mucha. II. Universidade Federal de Santa Catarina, Curso de Medicina. III. Título.

*Dedico este trabalho a todas as  
mulheres vítimas do câncer de mama,  
que lutam na esperança de continuarem  
vivendo suas vidas com a dignidade que merecem.*

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, agradeço a Deus, por Sua presença constante em minha vida, permitindo-me alcançar os objetivos traçados.

Agradeço à minha orientadora Profa. Dra. Rozany Mucha Dufloth, desprovida de palavras que possam fielmente retratar minha gratidão, desejo retribuir a competência, a sensibilidade e a disponibilidade com que sempre me orientou, contribuindo para o meu aprimoramento intelectual, profissional e pessoal.

Agradeço ao Prof. Dr. Carlos Gilberto Crippa, por se colocar a disposição para colaborar em tudo o que fosse possível dentro da área de Ginecologia.

Ao Prof. Dr. Fernando Schmitt e ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino, que apesar de não conhecê-los pessoalmente, foram responsáveis por sugestões fundamentais para a condução deste estudo.

Ao Dr. Horácio Shigueru Chikota, por ter disponibilizado seu Laboratório Médico para a seleção de materiais necessários a este presente estudo.

Aos Professores, Mestres que com dedicação e competência muito contribuíram em minha jornada e a todos os colegas, pelo companheirismo e incentivo.

Ao meu namorado, Rafael Luís Marchetti, pela compreensão, amor e incentivo em todas as horas.

Agradeço também à minha irmã, Francine Maria Alves, sinônimo de amizade, amor e união.

Por fim, meu imenso e indescritível agradecimento aos meus pais, Maria das Graças Florêncio Alves e Edigar Hugo Alves, que sempre serviram de grande exemplo em minha vida e nunca mediram esforços para a conquista de meus sonhos. Agradeço por toda a paciência, compreensão, apoio e amor incondicional.

## 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 está associado a pior prognóstico e ainda não possui tratamento específico. Entretanto, ainda não foram definidos critérios citológicos que pudessem prever este fenótipo.

**Objetivo:** Investigar critérios citológicos específicos na punção aspirativa por agulha fina que pudessem prever o fenótipo basal do carcinoma de mama.

**Métodos:** As lâminas de punção aspirativa por agulha fina e espécimes de mastectomia de 74 carcinomas de mama ductais infiltrantes de alto grau foram selecionadas dos arquivos de três instituições. Os carcinomas de mama, através da técnica de *tissue microarray*, foram classificados em fenótipos: luminal A e B, superexpressão de HER2 e basal. Os critérios citológicos foram revisados por dois médicos patologistas de acordo com cinco critérios citológicos: celularidade, coesão celular, presença de necrose, nucléolo e atipia nuclear. O teste exato de Fisher foi utilizado para testar a associação entre os critérios citológicos e os fenótipos de carcinoma de mama.

**Resultados:** Necrose esteve presente em 64,7% dos casos de carcinoma de mama com fenótipo basal e em 31,1% dos carcinomas de mama não-basais, sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa, com *odds ratio* (OR) de 3,80. O fenótipo basal, em relação ao luminal A, apresentou mais necrose (OR=6,97), nucléolo presente/proeminente (OR=8,18) e acentuada celularidade (OR=18,03).

**Conclusões:** A presença de necrose, bem como nucléolo presente/proeminente e acentuada celularidade são critérios mais frequentemente associados ao fenótipo basal do carcinoma de mama.

## ABSTRACT

**Background:** 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 phenotype is associated to worse prognosis and it still remains without specific treatment. However, there is currently no international consensus on the cytomorphological criteria that could predict this phenotype.

**Objective:** The purpose of study was to evaluate the citomorphological criteria in fine-needle aspiration biopsy and to identify their association with the basal phenotype of breast carcinoma.

**Methods:** Fine-needle aspiration biopsy specimens and tissue sections (mastectomy specimen) from 74 cases of high-grade infiltrating ductal breast carcinomas were consecutively retrieved from the files of three institutions. Breast carcinomas were studied using the tissue microarray technique, being classified into phenotypes: luminal A and B, HER2 overexpression, and basal. The citomorphological criteria for all cases were reviewed blindly by two pathologists according to five cytomorphological criteria: cellularity, cell pattern, presence of necrosis, nucleoli, and nuclear atypia. Exact Fisher test was used to test the association between cytomorphological criteria and the phenotypes of breast carcinoma.

**Results:** Necrosis was present in 64.7% of basal breast carcinomas, and 31.1% of non-basal breast carcinomas, and that result was statistically significant, showing odds ratio (OR) of 3.80. The basal phenotype, comparing to the luminal A, showed more necrosis (OR=6.97), present/prominent nucleoli (OR=8.18), and cellularity more frequently (OR=18.03).

**Conclusions:** Necrosis, as well present/prominent nucleoli and abundant cellularity are criteria more frequently associated to the basal phenotype of breast carcinoma.

## LISTA DE 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
<i>c-DNA</i>	DNA complementar
CK	Citoqueratina
c-KIT	Proteína CD117
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido desoxirribonucléico
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HER1	<i>Human epithelial receptor 1</i>
HER2	<i>Human epithelial receptor 2</i>
HU	Hospital Universitário
IC95%	Intervalo de confiança de 95%
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPATIMUP	Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto
µm	micra
mRNA	RNA mensageiro
OMS	Organização Mundial da Saúde
OR	<i>Odds ratio</i>
p	p valor
p63	Proteína do gene P63
P-caderina	<i>Placental caderina</i>
PARP	<i>Poly ADP-ribose polymerase</i>
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
SAP	Serviço de Anatomia Patológica
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>



TMA	<i>Tissue microarray</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas

## SUMÁRIO

<b>FALSA FOLHA DE ROSTO</b> .....	i
<b>FOLHA DE ROSTO</b> .....	ii
<b>DEDICATÓRIA</b> .....	iii
<b>AGRADECIMENTOS</b> .....	iv
<b>RESUMO</b> .....	v
<b>ABSTRACT</b> .....	vi
<b>LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS</b> .....	vii
<b>SUMÁRIO</b> .....	ix
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	1
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	9
<b>2.1 Objetivo geral</b> .....	9
<b>2.2 Objetivos específicos</b> .....	9
<b>3 MÉTODOS</b> .....	10
<b>3.1 Desenho do estudo</b> .....	10
<b>3.2 Seleção de sujeitos e tamanho da amostra</b> .....	10
<b>3.2.1 Critérios de exclusão</b> .....	10
<b>3.3 Variáveis em estudo</b> .....	10
<b>3.3.1 Variáveis independentes</b> .....	10
<b>3.3.2 Variáveis dependentes</b> .....	13
<b>3.4 Descrição dos procedimentos técnicos</b> .....	14
<b>3.4.1 Construção dos <i>tissue microarrays</i> (TMAs)</b> .....	14
<b>3.4.1.1 Seleção dos tecidos para a construção dos TMAs</b> .....	14
<b>3.4.1.2 Montagem dos TMAs</b> .....	14
<b>3.4.1.3 Corte do bloco de TMA</b> .....	15
<b>3.4.2 Método imunoistoquímico</b> .....	15
<b>3.4.3 Controles</b> .....	18
<b>3.5 Coleta de dados</b> .....	18

<b>3.6</b>	<b>Processamento dos dados.....</b>	<b>18</b>
<b>3.7</b>	<b>Análise estatística.....</b>	<b>18</b>
<b>3.8</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>20</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>27</b>
<b>6.1</b>	<b>Resposta aos objetivos específicos.....</b>	<b>27</b>
<b>6.2</b>	<b>Considerações finais.....</b>	<b>27</b>
	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>29</b>
	<b>NORMAS ADOTADAS.....</b>	<b>37</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>38</b>
	<b>APÊNDICES.....</b>	<b>45</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama é o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo e o primeiro entre as mulheres, excetuando-se os carcinomas de pele não melanoma.<sup>1</sup> Nos Estados Unidos da América, o carcinoma de mama também ocupa a primeira posição entre as mulheres e são estimados cerca de 182.460 novos casos de carcinoma de mama invasivo e 67.770 novos casos de carcinoma de mama *in situ* em mulheres no ano de 2008. Além disso, corresponde à segunda causa de morte por câncer em mulheres (seguido do câncer de pulmão) nos Estados Unidos da América.<sup>1</sup> No Brasil, o número de casos novos de carcinomas de mama esperados para o ano de 2008 é de 49.400, com um risco estimado de 51 casos a cada 100 mil mulheres.<sup>2</sup> Na região Sudeste do Brasil, é o câncer de maior incidência entre as mulheres, com um risco estimado de 68 casos novos para cada 100 mil mulheres. Cabe destacar que sem considerar os carcinomas de pele não melanoma, este tipo de tumor também é o mais freqüente em mulheres das regiões Sul do país (67/100.000), Centro-Oeste (38/100.000) e Nordeste (28/100.000). Na região Norte é o segundo câncer de maior incidência (16/100.000).<sup>2</sup>

No intuito de tentar reduzir a mortalidade por carcinoma de mama, há um grande interesse dos pesquisadores em se caracterizar melhor esse tipo de tumor, principalmente aqueles que apresentam pior prognóstico, como os carcinomas de mama com fenótipo basal, a fim de prever seu comportamento biológico, assegurar um tratamento mais adequado e melhorar o prognóstico das pacientes.<sup>3-6</sup> Tendo isso em vista, faz-se necessário o estabelecimento de técnicas mais precisas para o diagnóstico desses tumores. É importante que se tente diagnosticá-los o mais precocemente possível, pois o fenótipo basal pode ter um componente hereditário por estar associado a mutações no gene *Breast Cancer 1 Gene (BRCA1)*.<sup>5,7-12</sup>

Assim, com o objetivo de investigar tratamentos mais eficazes, vem-se estudando a biologia dos carcinomas de mama com base no seu perfil de expressão gênica, o que origina uma assinatura molecular para cada tipo de tumor.<sup>3-5</sup>

Neste contexto, cabe destacar o trabalho do grupo de Stanford, o qual demonstrou que a diversidade fenotípica dos carcinomas de mama é acompanhada por uma correspondente diversidade na expressão gênica, que pôde ser constatada utilizando *tissue microarray* (TMA).<sup>3</sup> Perou *et al.*<sup>3</sup> utilizaram uma plataforma de 8100 genes em cerca de 65 amostras,

pertencentes a 42 pacientes e definiram diferentes perfis de expressão para os carcinomas de mama. O primeiro nível de classificação separou tumores negativos para os receptores de estrógeno (RE) e tumores positivos para a expressão deste receptor. Posteriormente, os carcinomas de mama foram classificados em cinco fenótipos moleculares distintos: luminal A (RE positivo e *Human epithelial receptor 2* [HER2] negativo), luminal B (RE positivo e HER2 positivo), basal (RE negativo, HER2 negativo e positividade para citoqueratinas [CKs] 5/6 e 17), superexpressão de HER2 (RE negativo e HER2 positivo) e *normal breast-like*.<sup>3-5</sup> Esses cinco fenótipos de carcinomas de mama associaram-se a diferentes desfechos clínicos, variando de melhor prognóstico para o luminal A e a pior prognóstico para os subtipos com superexpressão de HER2 e também para aqueles que apresentaram o fenótipo basal.<sup>3-6</sup>

Considerando essa classificação mais atual dos carcinomas de mama, um subtipo específico vem chamando mais atenção dos pesquisadores nos últimos anos, que é o carcinoma de mama com fenótipo basal, sendo assim definido por análise de expressão gênica por TMA e que corresponde à cerca de 15% de todos os carcinomas de mama.<sup>3,4,13,14</sup>

Diversos estudos mostraram que esse subtipo de carcinoma de mama apresenta expressão imunoistoquímica (IHQ) de p53, mutações no gene TP53<sup>4</sup> e expressam genes relacionados a altas taxas de proliferação celular.<sup>3-5</sup> Com relação aos marcadores utilizados para definir o fenótipo basal, ainda não há consenso internacional aceito para a sua definição precisa<sup>12</sup> e nem há um único termo utilizado na literatura atual para descrevê-lo, pois este pode ser encontrado na literatura pelas denominações: “basal”, “basal-like”, “basalóide” e “tumores com um fenótipo basal/mioepitelial”.<sup>15</sup> O imunofenótipo dos carcinomas de mama com fenótipo basal é frequentemente, apesar de não invariavelmente, triplo-negativo (RE, receptor de progesterona [RP] e HER2 negativos) e superexpressam o *Epidermal growth factor receptor* (EGFR), também conhecido como *Human epithelial receptor 1* [HER1], em alta proporção (50% a 70%) dos casos.<sup>15</sup> A imunoistoquímica para CKs de alto peso molecular pode ser realizada para confirmar o fenótipo basal.<sup>15</sup> Nielsen *et al.*<sup>13</sup> identificaram um painel imunoistoquímico baseado em quatro marcadores específicos (RE, HER2, EGFR e CK5/6). Esse painel proposto demonstrou 100% de especificidade e 76% de sensibilidade para prever o fenótipo basal do carcinoma de mama.<sup>13</sup> Contudo, estudos prévios de nosso grupo demonstraram que as proteínas p63 e P-caderina, também expressas na camada de células mioepiteliais normais da glândula mamária, apresentaram-se superexpressas em carcinomas de mama com fenótipo basal.<sup>16</sup> Concomitantemente à expressão de CK5, essas proteínas podem ser consideradas marcadores moleculares específicos para esse fenótipo.<sup>16</sup> Teoricamente, ter uma precisa definição para a classificação desses tumores ajudaria a

padronizar as investigações, mas isso ainda não ocorre. A maioria dos autores incluiu em suas definições, ao menos em parte, imunoreatividade para CK5 ou CK5/6.<sup>13,14,16-26</sup> Contudo, outros marcadores também podem servir como base para definir o fenótipo basal, e dentre estes, incluem-se: CK14<sup>14,20,21,23-25,27</sup>, CK17<sup>13,17,18,20</sup>, EGFR (ou HER1)<sup>10,13,21,22,28</sup>, c-KIT<sup>21,23,29</sup>, p63<sup>16,23</sup> e P-caderina.<sup>16</sup>

Estudos mais atuais utilizaram como critério diagnóstico para o carcinoma de mama com fenótipo basal a ausência de imunoreatividade para receptores hormonais RE, RP e HER2<sup>16,18,21,22</sup>, enquanto a maioria dos outros autores não incluía esse requerimento em sua definição. Entretanto, nem todos os carcinomas de mama triplo-negativos mostraram ser de fenótipo basal, com os basais compreendendo cerca de 60-90% dos carcinomas de mama triplo-negativos, dependendo se eles foram estudados por IHQ ou pelo perfil de expressão gênica.<sup>30</sup> Assim sendo, estes dados passam a ter grande relevância clínica, pois há elevada prevalência de carcinomas de mama apresentando fenótipo basal em pacientes que carregam mutações em genes de susceptibilidade ao carcinoma de mama, como o *BRCA1*.<sup>5,7-12</sup> Este fato foi evidenciado no estudo de Foulkes *et al.*<sup>8</sup>, que encontrou que 88% dos carcinomas de mama com mutação no gene *BRCA1* expressaram CK5/6. Ainda, a maioria destas pacientes apresentou fenótipo triplo-negativo.<sup>12</sup>

Muitas características fenotípicas, imunoistoquímicas, moleculares e clínicas são compartilhadas por carcinomas basais e carcinomas de mama que surgem em portadores de mutação no *BRCA1*. Para enfatizar a relação entre carcinomas basais e carcinomas relacionados ao *BRCA1*, alguns autores demonstraram que a utilização de CKs basais, em combinação com RE e com características morfológicas dos tumores, ajuda a definir a presença de mutação no gene *BRCA1*. Esses critérios reunidos podem ser úteis na seleção de pacientes para a realização de testes de mutações nesse gene.<sup>12</sup>

Ultimamente, tem-se tentado caracterizar morfológicamente os carcinomas de mama com fenótipo basal, os quais apresentaram alto grau histológico, grande número de mitoses, presença de zonas de necrose e infiltrado linfocítico conspícuo.<sup>10,15,31-33</sup> Além disso, a presença de elementos metaplásicos<sup>15,31,32</sup> e de características de carcinoma do tipo histológico medular típico ou atípico foi significativamente mais prevalente em carcinomas com fenótipo basal que em outros subtipos moleculares.<sup>31,32,34</sup>

Do ponto de vista da prática clínica, essas características morfológicas e imunoistoquímicas podem ser utilizadas para alertar os médicos da probabilidade de se tratar de um carcinoma basal.<sup>10</sup>

Ainda, em relação à idade, recente estudo encontrou que o fenótipo basal ocorreu em idade média discretamente mais jovem que os demais fenótipos agrupados como não-basais.<sup>27</sup>

Os carcinomas de mama com fenótipo basal representam um dos mais intrigantes subtipos de carcinoma de mama e são freqüentemente associados a pior prognóstico.<sup>3-5,17,35</sup> Vários estudos mostraram que a expressão de CKs esteve relacionada à mortalidade, independente do *status* linfonodal, do tamanho ou grau tumoral.<sup>17</sup> Estudo de Rakha *et al.*<sup>35</sup>, que utilizou 347 casos de carcinomas de mama com fenótipo basal, mostrou associação deste tumor com maior tamanho do tumor primário, desenvolvimento de metástases a distância e menor sobrevida livre de doença.<sup>35</sup> Esse subtipo de tumor também apresenta risco aumentado de metástases para pulmão e cérebro<sup>27,36,37</sup>, que são locais associados a pior prognóstico, e menor probabilidade de metástases para ossos e fígado.<sup>20,22,27</sup>

Ainda não há alvos terapêuticos específicos para esses tumores como nos outros subtipos, pois os carcinomas de mama com fenótipo basal não expressam RE ou HER2 e, portanto, não respondem ao tratamento com drogas anti-estrogênicas, nem ao anticorpo monoclonal anti-HER2 (*trastuzumab*), que são amplamente utilizados na prática clínica.<sup>5,38</sup>

Recentemente, foi descoberto um dos alvos potenciais para o tratamento do carcinoma de mama com fenótipo basal, que é o EGFR, expresso em mais de 60% dos carcinomas basais e amplificado em alguns desses tumores.<sup>12,25,39,40</sup> Também, o receptor do fator de crescimento (c-KIT), que é expresso numa alta proporção em carcinomas basais<sup>13,21</sup>, vem sendo estudado como alvo terapêutico em outros tipos de tumores, entretanto, até o presente momento, estes ainda não estão sendo utilizados como alvos terapêuticos para o carcinoma de mama na prática clínica. Sendo assim, a quimioterapia e a radioterapia para controle local e sistêmico permanecem como principais formas de tratamento<sup>15</sup>, apesar da escolha da quimioterapia ainda não estar clara.<sup>20,22,41</sup> As similaridades biológicas entre carcinomas associados ao *BRCA1* e os de fenótipo basal sugerem que potenciais alvos de disfunção no *BRCA1* também devem ser efetivos em carcinomas basais. Há evidências de que defeitos de reparo de DNA característicos de carcinomas relacionados ao *BRCA1*, principalmente defeitos de recombinação homóloga, conferem sensibilidade a certos agentes sistêmicos, como agentes quimioterápicos baseados em sais de platina e inibidores de *Poly ADP-ribose polymerase* (PARP) que, portanto, deveriam ser relevantes para o tratamento de carcinomas com fenótipo basal.<sup>12</sup> Um estudo recente demonstrou baixa taxa de resposta de carcinomas basais à terapia neoadjuvante com docetaxel, doxorubicina e ciclofosfamida.<sup>42</sup>

Portanto, a classificação molecular dos carcinomas de mama tem chamado a atenção de oncologistas e da comunidade médica e científica em geral, pois os fenótipos moleculares

dos carcinomas de mama podem prever a forma de resposta a agentes terapêuticos específicos.<sup>12,43,44</sup> Assim, é importante que se tente diferenciar os diferentes subtipos de carcinoma de mama o mais precocemente possível.

Para a investigação inicial de lesões mamárias suspeitas de malignidade pelo exame físico ou por exames de imagem (mamografia, ultra-sonografia, tomografia computadorizada, ressonância nuclear magnética) existem diversas modalidades diagnósticas utilizadas. A seleção de um método ideal de biópsia depende muito das circunstâncias clínicas, dos achados nos exames de imagem, da habilidade do operador do exame e da confiança do médico em realizá-lo.<sup>45</sup>

Os principais métodos diagnósticos utilizados são: punção aspirativa por agulha fina (PAAF), *core biopsy* e biópsia cirúrgica aberta (excisional ou incisional).<sup>45</sup> Em muitas instituições médicas, a PAAF tem substituído a biópsia cirúrgica aberta para a avaliação de anormalidades diagnosticadas pela mamografia.<sup>46</sup>

A PAAF foi introduzida por Martin e Ellis em 1930<sup>47</sup> e, desde então, tem sido um método amplamente utilizado e aceito para a obtenção de amostras para o diagnóstico citológico em vários órgãos, sendo procedimento de rotina para a avaliação de lesões mamárias. Trata-se de um método rápido, de baixo custo, com boa acuidade diagnóstica e com riscos mínimos para a paciente.<sup>45,48-50</sup> Ele proporciona um resultado rápido, que contribui para o diagnóstico precoce do carcinoma de mama e faz parte do tripé multidisciplinar (exame clínico, achados em exames de imagem e PAAF) pré-operatório em várias instituições para avaliação de lesões mamárias sintomáticas ou diagnosticadas por rastreamento através de exames de imagem ou pelo exame físico da mama.<sup>50</sup> Este método não requer anestesia, internação hospitalar ou processamento tecidual elaborado e, portanto, é o método diagnóstico de menor custo em relação aos demais.<sup>51</sup>

Como o procedimento da PAAF é operador-dependente, os estudos mostram que quando realizado por um citopatologista que interpreta o material obtido, obtém-se melhor acurácia diagnóstica.<sup>45,46,48</sup> Este é um método em que é obtido material celular e que utiliza, na maioria das vezes, agulhas de 22 a 25 gauge.<sup>46</sup>

A PAAF guiada por imagem também tem sido utilizada em várias instituições no intuito de se tentar reduzir o número de espécimes insatisfatórios, sendo que a PAAF guiada por ultra-sonografia é um procedimento barato, com alta acurácia, pouco invasivo e com uma sensibilidade em torno de 90% e especificidade em torno de 100% em relação à PAAF não guiada por imagem.<sup>52,53</sup> Contudo, vale ressaltar que a presença de microcalcificações na



mamografia, sem uma massa ou distorção arquitetural, raramente é visível à ultra-sonografia e geralmente requer avaliação diagnóstica por outros meios que não sejam por PAAF.<sup>54</sup>

O estudo de Azavedo *et al.*<sup>55</sup> demonstrou que a combinação de mamografia e PAAF oferece uma avaliação de alta sensibilidade para o diagnóstico precoce do carcinoma de mama e quando a PAAF é realizada por médicos patologistas experientes, a sensibilidade e especificidade desse método em diagnosticar carcinomas de mama variam entre 60% a 100%.<sup>55-65</sup> Choi *et al.*<sup>61</sup> mostraram uma sensibilidade de 77,7% e especificidade de 99,2% da PAAF em diagnosticar lesões de mama benignas ou malignas, mas concluíram que, apesar da PAAF ser um procedimento diagnóstico útil para a avaliação de lesões mamárias, deveria ser combinada com outras modalidades diagnósticas, como exame clínico, ultra-sonografia e mamografia. Florentine *et al.*<sup>66</sup> encontraram 93% de sensibilidade e 100% de especificidade da PAAF para o diagnóstico de lesões palpáveis de mama. Young *et al.*<sup>67</sup> mostraram que a PAAF é um método confiável para o diagnóstico do carcinoma de mama, mas ainda há dificuldades na habilidade dos médicos patologistas em determinar o subtipo do tumor através da avaliação citológica.

Jayaram e Elsayed<sup>68</sup> demonstraram que a avaliação citológica de marcadores prognósticos em carcinomas de mama tem boa correlação com a avaliação histológica e pode ser de grande valor para guiar protocolos de tratamento. Em tal estudo, o tipo histológico do tumor teve acurácia em 94,8% dos casos e a média de acurácia para o grau histológico foi de 71%. Como o plano terapêutico é frequentemente feito no pré-operatório, com base nos registros citológicos, é importante reunir o máximo possível de informações prognósticas dos espécimes citológicos. A rigor, o tipo histológico do tumor, o grau tumoral, o *status* de receptor hormonal e a taxa de proliferação celular são indicadores prognósticos importantes que podem ser avaliados em nível citológico.<sup>68</sup> Também há confiabilidade da avaliação de esfregaços de PAAF na avaliação do RE e do HER2.<sup>46</sup>

Quanto aos critérios citológicos diagnósticos de carcinomas de mama, pelo menos três devem estar presentes no esfregaço: acentuada celularidade, dissociação celular e atipia. A atipia consiste de um ou mais dos seguintes critérios: alta relação núcleo/citoplasma, aumento do tamanho do núcleo, pleomorfismo, anisocariose, cromatina grosseiramente granular, hipercromasia, nucléolos conspícuos, irregulares ou múltiplos. Células neoplásicas bizarras e multinucleadas podem estar presentes em carcinomas de mama de alto grau. Ainda, a perda da coesão das células epiteliais, observada na maioria dos carcinomas de mama, pode ser sutil para o diagnóstico de carcinomas colóides e tubulares. Além disso, os carcinomas de mama colóides e lobulares podem ter células de padrão mais monomórfico.<sup>54</sup> Os carcinomas de

mama podem ser classificados de acordo com seu grau nuclear, com o grau I mostrando núcleo pequeno e monótono, o grau III apresentando grandes núcleos com nucléolos grandes e proeminentes e o grau II sendo o intermediário entre esses dois extremos. Em aproximadamente 80% dos casos, o diagnóstico de carcinoma de mama pode ser feito seguramente através do exame citológico.<sup>69</sup> Em relação aos fenótipos moleculares desses tumores, ainda não há estudos demonstrando quais critérios citológicos poderiam ter associação com cada fenótipo molecular específico.

Além da biópsia cirúrgica aberta e da PAAF, a *core biopsy* também pode ser utilizada para a o diagnóstico de lesões mamárias. Esta consiste do uso de uma agulha de 14-gauge e extrai fragmentos teciduais para posterior avaliação histológica.<sup>54</sup> Ainda permanece controverso qual procedimento deve ser o método diagnóstico inicial para a avaliação de lesões mamárias. Alguns estudos demonstraram que a PAAF possui maior acurácia, menor taxa de falso-negativos e é um procedimento menos traumático que a *core biopsy*.<sup>46</sup> Em estudos prévios, a PAAF de nódulos mamários palpáveis provou ser superior a *core biopsy* em especificidade e sensibilidade.<sup>70,71</sup>

Há inúmeras vantagens da PAAF em relação a outros métodos mais invasivos para o diagnóstico de lesões mamárias. Dentre essas vantagens, pode-se citar: diagnóstico rápido e com boa sensibilidade, que não requer anestesia; diferenciação de cistos de tumores sólidos e procedimento terapêutico quando uma lesão cística é encontrada; envolvimento da paciente no processo de decisão quando se encontra uma lesão maligna de mama; ajuda psicológica no alívio da ansiedade para pacientes com lesões mamárias benignas; avaliação de recorrência local na parede torácica, metástase linfonodal e condições inoperáveis; caracterização de perfis genômicos e proteômicos para a identificação de pacientes de alto risco para o desenvolvimento de carcinoma de mama, caracterização tumoral e predição de resposta da doença ao tratamento.<sup>46</sup> O procedimento da PAAF possui complicações mínimas, como: infecção, hemorragia, implantação e disseminação vascular de células neoplásicas, e sabe-se que essas complicações são teóricas e praticamente não vistas na prática clínica.<sup>62</sup>

Dentro de todas essas alternativas diagnósticas, há a importância de se identificar os carcinomas de mama o mais precocemente possível, preferencialmente, caracterizando aqueles subtipos de pior prognóstico.

Assim, encontrar critérios citológicos que pudessem predizer um carcinoma de mama com fenótipo basal na PAAF, poderia ser um forte indicativo de se tratar de um carcinoma hereditário de mama, relacionado ao gene *BRCA1* e, dessa forma, seria possível realizar um manejo terapêutico mais direcionado para essa paciente, bem como sugerir o rastreamento nos

seus familiares, no intuito de verificar as possíveis mutações genéticas. Também, o diagnóstico do carcinoma de mama com fenótipo basal é fundamental na decisão da conduta terapêutica, pois requer uma intervenção mais agressiva por apresentar pior prognóstico quando comparado aos outros subtipos moleculares de carcinoma de mama, muito embora ainda estejam sendo estudadas as terapias-alvo para esses tumores.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo geral

O objetivo geral do presente estudo foi investigar os critérios citológicos individuais na punção aspirativa por agulha fina (PAAF) que poderiam predizer o fenótipo basal do carcinoma de mama, tendo como padrão-ouro uma série de carcinomas de mama classificados segundo a atual classificação molecular, utilizando a técnica de *tissue microarray* (TMA).

### 2.2 Objetivos específicos

1. Verificar a frequência dos critérios citológicos individuais presentes na PAAF em relação aos fenótipos basal e não-basal (luminal A, luminal B e superexpressão de HER2) do carcinoma de mama.
2. Analisar a associação dos critérios citológicos individuais presentes na PAAF com o diagnóstico do fenótipo molecular do carcinoma de mama.

## **3 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 de pesquisa CAGIMA, cadastrado no CNPq (Anexo 1).

### **3.2 Seleção de sujeitos e tamanho da amostra**

A amostra consistiu de 74 mulheres que tiveram o diagnóstico de carcinoma de mama ductal infiltrante de alto grau histológico. Todos os prontuários médicos das pacientes que foram submetidas a procedimentos cirúrgicos na mama e cujo material foi enviado para avaliação de médicos patologistas foram vistos.

Foram revistos e separados para o presente estudo os laudos anátomopatológicos e de punção aspirativa por agulha fina (PAAF), lâminas e respectivos blocos de parafina contendo material de carcinoma de mama, arquivados em três instituições: 1) Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), 2) Hospital São João do Porto, Universidade do Porto, Portugal 3) IMP Laboratório Médico, Florianópolis, Brasil, do período de Janeiro de 2000 a Julho de 2007.

#### **3.2.1 Critérios de exclusão**

Foram excluídos do estudo os casos cujo material (PAAF, lâminas, bloco de parafina) não foi encontrado ou não apresentou condições técnicas para a avaliação da expressão das proteínas através do método imunistoquímico e aqueles casos em que as lâminas estavam quebradas.

### **3.3 Variáveis em estudo**

#### **3.3.1 Variáveis independentes**

Foram selecionadas, nos citados Laboratórios de Patologia, as lâminas de punção aspirativa por agulha fina (PAAF) de pacientes previamente diagnosticadas com carcinoma de mama. As PAAF estavam previamente coradas pelos métodos de Papanicolaou e May-

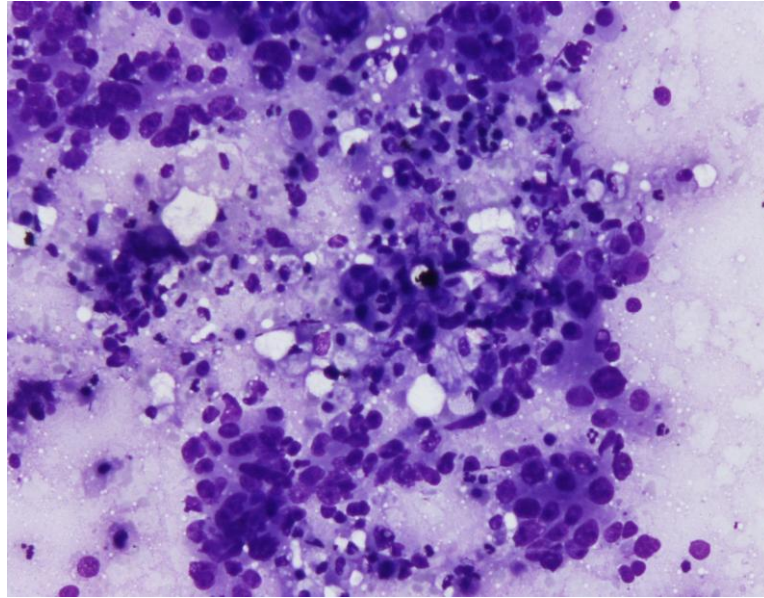
Grunwald Giemsa e foram reavaliadas por dois patologistas (R.M.D. e F.S.) para identificar a presença de cinco critérios citológicos individuais preestabelecidos: celularidade, coesão celular, presença de necrose, nucléolo e atipia nuclear. Esses cinco critérios foram analisados individualmente, através da revisão microscópica do exame da PAAF alterado, resultando na inclusão das mulheres neste estudo (Quadro 1).

**Quadro 1** - Variáveis independentes

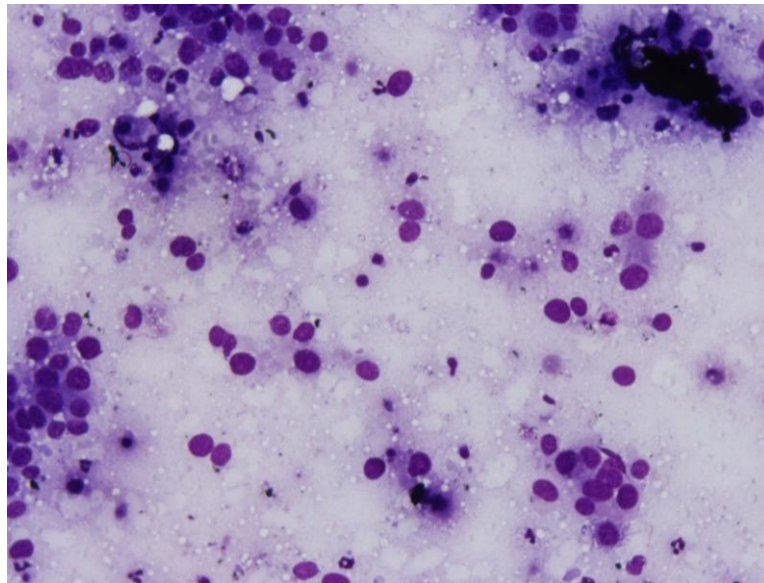
Variável	Definição	Categorização
Celularidade	Quantidade de células presentes no esfregaço	1- Discreta 2- Moderada 3- Acentuada
Coesão celular	Grau de associação celular	1- Predominância de células agregadas: acentuada coesão celular 2- Igual representação de células agregadas e células dissociadas: moderada coesão celular 3- Predominância de células dissociadas: pouca coesão celular
Necrose	Presença de áreas de necrose/inflamação	1- Presença de necrose 2- Ausência de necrose
Nucléolo	Aspecto do nucléolo	1- Nucléolo inconspícuo ou somente micronucléolo: nucléolo inconspícuo 2- Macronucléolo isolado presente na maioria das células: nucléolo presente 3- Múltiplos macronucléolos presentes: nucléolo presente e proeminente
Atipia nuclear	Pleomorfismo nuclear	1- Discreta atipia 2- Moderada atipia 3- Intensa atipia

FONTE: Jayaram *et al.*, 2005<sup>68</sup> e Koss' Diagnostic Cytology and its histopathologic bases, 5<sup>a</sup> ed., vol. 1, 2006<sup>69</sup>

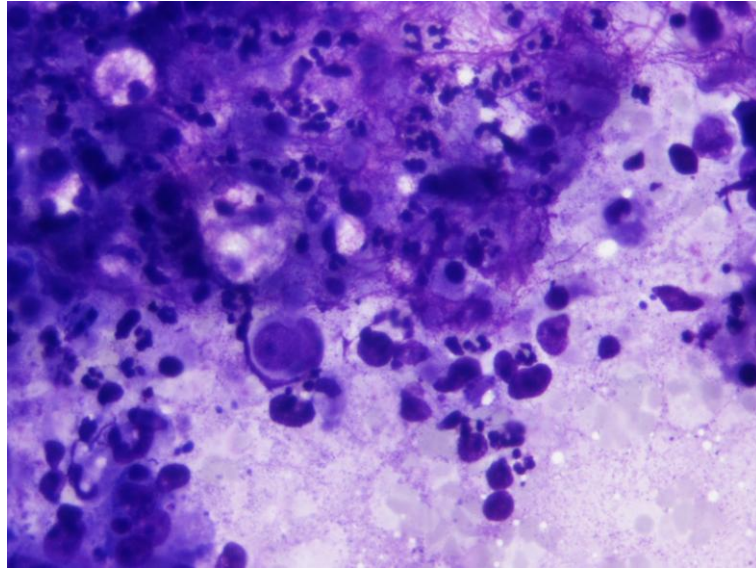
As figuras que seguem ilustram alguns dos critérios citológicos analisados neste estudo (Figuras 1 a 4).



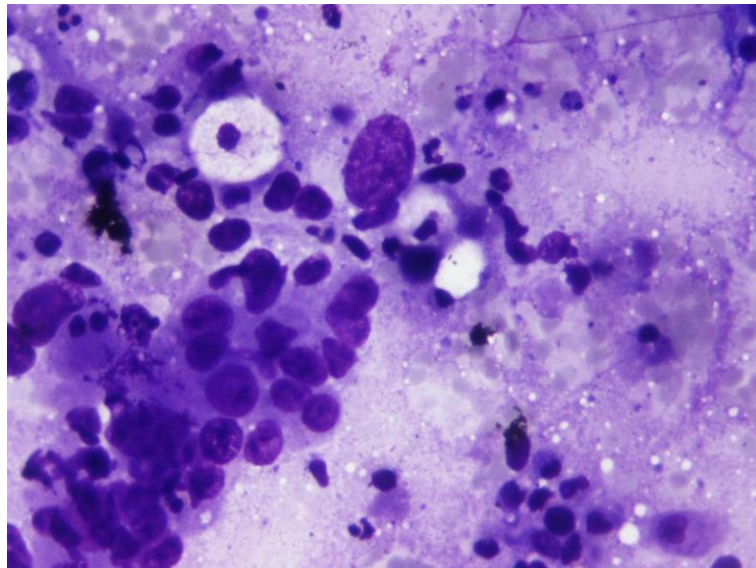
**Figura 1** - Acentuada celularidade (coloração de May-Grunwald Giemsa, x 400).



**Figura 2** - Pouca coesão celular (coloração de May-Grunwald Giemsa, x 400).



**Figura 3** - Presença de necrose (coloração de May-Grunwald Giemsa, x 400).



**Figura 4** - Atipia nuclear intensa (coloração de May-Grunwald Giemsa, x 400).

### 3.3.2 Variáveis dependentes

Os fenótipos moleculares do carcinoma de mama foram as variáveis dependentes e seguiram a classificação de Perou *et al.*<sup>3</sup>, modificada por Sorlie *et al.*<sup>5</sup>, e a caracterização do fenótipo basal foi de acordo com os critérios de Perou *et al.*<sup>3</sup>, modificada por Sorlie *et al.*<sup>4,5</sup>, Nielsen *et al.*<sup>13</sup>, Matos *et al.*<sup>16</sup> e Paredes *et al.*<sup>72</sup> (Quadro 2). Esse perfil molecular dos carcinomas de mama foi estabelecido no bloco de parafina, com a utilização de marcadores imunohistoquímicos específicos (RE, HER2, CK5, P-caderina e EGFR), através da técnica de *tissue microarray*.



**Quadro 2** – Variáveis dependentes

<b>Classificação dos fenótipos dos carcinomas de mama</b>	<b>Descrição</b>
Luminal A	RE + e HER2 -
Luminal B	RE + e HER2 +
Supereexpressão do HER2	RE - e HER2 +
Basal	RE -, HER2 - e EGFR + e/ou CK5 + e/ou P-caderina +

FONTE: Perou *et al.*<sup>3</sup>, Sorlie *et al.*<sup>4,5</sup>, Nielsen *et al.*<sup>13</sup>, Matos *et al.*<sup>16</sup> e Paredes *et al.*<sup>72</sup>

**Casos indeterminados** de carcinoma de mama foram definidos dessa forma quando não houve marcação para nenhuma das proteínas (RE, HER2, CK5, EGFR e P-caderina negativos)<sup>13</sup> ou quando a leitura de uma ou mais proteínas resultou inconclusiva.<sup>3,13,16</sup>

### 3.4 Descrição dos procedimentos técnicos

Os procedimentos técnicos foram realizados no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), seguindo protocolos específicos da referida Instituição e divulgados em artigos do grupo de pesquisa.<sup>16,72-74</sup>

#### 3.4.1 Construção dos *tissue microarrays* (TMAs)

##### 3.4.1.1 Seleção dos tecidos para a construção dos TMAs

A partir dos blocos de tecidos doadores, foram realizados cortes histológicos de 4µm (micra) para coloração Hematoxilina-Eosina (HE). As novas lâminas foram sequencialmente analisadas ao microscópio óptico (Leica MDL, Germany) por uma patologista (R.M.D.) para fins de identificar duas áreas morfológicamente significativas do componente tumoral. Posteriormente, foram delimitados dois círculos (correspondentes às áreas significativas) em cada bloco doador sobrepondo às lâminas marcadas, para assim marcar a área de extração do material dos blocos doadores.

##### 3.4.1.2 Montagem dos TMAs

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 foi seguido criteriosamente durante a confecção dos TMAs. Os blocos receptores dos TMAs 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 apresentou uma marcação de 5mm, de acordo com o tamanho dos cilindros do molde do bloco receptor, para que os cilindros de tecido extraídos tivessem todos a mesma altura. Depois de depositados todos os cilindros, os blocos receptores, agora TMAs, 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 TMAs foram esfriados a -10°C durante 30 minutos. Após o corte seqüencial de 2µm de espessura, as lâminas foram envolvidas numa camada de parafina até a sua utilização no processo de imunoistoquímica (IHQ). Fez-se a coloração HE do primeiro corte de cada TMA para controle morfológico da presença de tumor. Utilizou-se uma placa fria (Leica EG1130, Germany) e um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Germany) para a realização dos cortes histológicos. Foram utilizados dois tipos de lâminas, conforme os cortes histológicos eram destinados para coloração com HE (Marienfeld, Germany) ou para IHQ (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 2).

Todos os casos foram processados de acordo com o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase. Para a recuperação antigênica, foram utilizadas duas soluções comerciais: Unmasking solution – tampão citrato (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) e EDTA (Dako Cytomation, Carpinteria, CA, USA) e um banho (JenconsPLS SUB6, Grant instruments, Cambridge, UK), além de uma solução de bloqueio de peroxidase endógena a

3% (solução de peróxido de hidrogênio a 3%) (Panreac, Espanha) em metanol (Sigma-Aldrich, Germany).

A coloração IHQ para RE, HER2 e CK5 foi feita utilizando-se o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase (LabVision Corporation, Fremont, CA, USA) em cada local com 4 lâminas contendo TMAs, enquanto P-caderina e EGFR utilizaram o polímero marcados com HRP (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). O antígeno Unmasking para RE e HER2 foi realizado utilizando uma diluição de 1:100 de uma solução disponível no comércio de tampão citrato, pH=6.0 (laboratórios do vetor, Burlingame, CA, EUA) em 98°C, enquanto uma diluição do 1:10 da solução etilenodiaminotetraacético (EDTA) com pH=9.0 (DakoCytomation) foi utilizada para CK5 e P-caderina. A recuperação do epítipo para EGFR foi realizada pela digestão de enzima proteolítica (pepsin A, 4 g/l; Sigma-Aldrich, Alemanha) a 37°C. Os tempos de recuperação do antígeno, os anticorpos clonais, as diluições e os fornecedores encontram-se listados no quadro 3. Após lavagens em uma solução de tampão fosfato (PBS), a atividade endógena da peroxidase foi bloqueada pela incubação das lâminas em água oxigenada a 3% (Panreac, Spain) em metanol (sigma-Aldrich). As lâminas foram incubadas com um soro bloqueador (LabVision) por 15 minutos e incubadas então com o anticorpo específico. A incubação preliminar do anticorpo foi realizada por 30 minutos na temperatura ambiente (RE, HER2) e por 1h na temperatura ambiente (P-caderina, CK5, EGFR). Após lavagens, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário biotinylated, seguido pela peroxidase streptavidina-conjugada (LabVision). O Diaminobenzidine (SOLHA) foi usado como um cromogênio (DakoCytomation). Para marcação de P-caderina e EGFR, o anticorpo secundário foi associado com o polímero etiquetado HRP (DakoCytomation) e revelado imediatamente com DAB. Os tecidos foram corados com hematoxilina de Mayer, foram desidratados e cobertos utilizando uma solução permanente da montagem (Zymed, San Francisco, CA, EUA). Os controles positivos e negativos foram incluídos a fim de garantir a confiabilidade dos ensaios. Os núcleos de tecido mamário não neoplásicos, assim como tecido mamário normal circundando as células neoplásicas, foram considerados controles internos para a maioria dos anticorpos testados: CK5, P-caderina, EGFR (células mioepiteliais); RE (células epiteliais).

Em resumo, os cortes de TMAs foram desparafinados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica induzida pelo calor em banho a 98°C. Foram utilizadas solução Retrieval (pH=6) e EDTA (pH=8) durante 30 minutos, onde foram aplicados cinco anticorpos primários monoclonais (Quadro 3). 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 3). Seguiu-se a incubação do anticorpo secundário e do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase foi revelada pelo DAB e os cortes corados com Hematoxilina de Mayer.

A avaliação IHQ dos resultados foi feita por dois médicos patologistas (R.M.D. e F.S.): P-caderina foi considerada positiva se mais de 10% das células neoplásicas mostraram marcação membranar, geralmente associada à marcação citoplasmática.<sup>75</sup> Da mesma forma, adotamos o mesmo valor de corte para reatividade nuclear de RE e CK5.<sup>16</sup> A expressão de HER2 foi avaliada de acordo com o sistema de escore Dako Cytomation HercepTest : 0 - sem marcação ou marcação membranar em menos de 10% das células neoplásicas; 1+ - fraca marcação membranar perceptível em mais de 10% das células tumorais e as células são marcadas em apenas parte da membrana; 2+ - fraca a moderada marcação completa membranar observada em mais de 10% das células tumorais e 3+ - intensa marcação membranar completa em mais de 10% das células tumorais. As células neoplásicas foram consideradas positivas (superexpressão) de HER2 quando a marcação foi classificada como +3.<sup>16,76,77</sup> A marcação para EGFR também utilizou a classificação de acordo com o sistema de escore do HercepTest, mas o carcinoma de mama foi considerado positivo para EGFR na presença de qualquer uma das marcações classificadas como +1, +2 ou +3.

Todas as lâminas foram analisadas pelos dois médicos patologistas (R.M.D. e F.S.) no microscópio de multiobservação (Leica MDL, Germany).

**Quadro 3** - Anticorpos monoclonais utilizados no método imunoistoquímico

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Tempo de incubação (min)	Antígeno de recuperação (min)
<b>CK5</b>	XM26	LabVision	1:50	60	30-Tris EDTA (1:10)
<b>P-caderina*</b>	56	LabVision	1:50	60	30-Tampão citrato (1:100)
<b>EGFR†</b>	31G7	Zymed	1:100	60	30-Solução de pepsina
<b>RE</b>	SP1	LabVision	1:150	30	30-Tampão citrato (1:100)
<b>HER2</b>	SP3	LabVision	1:80	30	30-Tampão citrato (1:100)

\* No P-caderina utilizou-se anticorpo secundário com o polímero

† No EGFR utilizou-se anticorpo secundário com o polímero

### 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 pertencem ao TMA e não apresentaram expressão relevante do antígeno.

### 3.5 Coleta de dados

Os dados foram coletados através dos seguintes passos:

- a) Os casos incluídos receberam um número seqüencial;
- b) As lâminas das PAAF receberam uma nova identificação e foram separadas dos respectivos arquivos dos laboratórios envolvidos nesse estudo;
- c) As lâminas da PAAF foram submetidas à revisão em microscópio de multiobservação (Leica MDL, Germany) para identificação dos critérios citológicos individuais;
- d) Os blocos de parafina foram selecionados e separados dos respectivos arquivos dos laboratórios envolvidos nesse estudo;
- e) Foi realizada coloração IHQ para identificação dos subtipos moleculares através de leitura microscópica em microscópio de multiobservação;
- f) Os patologistas envolvidos não tinham conhecimento dos laudos dos demais exames envolvidos no estudo, bem como de informações clínicas das pacientes;
- g) Todos os dados de diagnóstico, necessários à pesquisa, foram anotados em uma ficha pré-codificada, especialmente elaborada para este estudo (Anexo 3).

### 3.6. Processamento dos dados

Foi realizada revisão manual das fichas pré-codificadas e as falhas ou inconsistências detectadas foram corrigidas. Após, os dados anotados na ficha foram digitados em um banco de dados construído em *software* EXCEL. Após a digitação, foram realizadas tabelas descritivas para avaliação da consistência dos dados.

### 3.7 Análise estatística

A análise estatística da magnitude da associação dos critérios citológicos individuais com o diagnóstico do fenótipo molecular do carcinoma de mama, obtido através da técnica de TMA, foi feita através dos valores de *odds ratio* (OR) com respectivos intervalos de confiança (IC) de 95%. Os dados foram descritos em frequências absolutas (n) e frequências relativas

(%) para avaliar a associação dos critérios citológicos. Esses critérios foram comparados entre os fenótipos de carcinoma de mama através do Teste exato de Fisher. O nível de significância assumido foi de 5% e o *software* utilizado para a análise estatística foi o SAS, Versão 9.02.

### **3.8 Aspectos éticos**

O projeto deste trabalho foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), de acordo com a Resolução n°. 196/96, 251/97 e 292/99, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, com parecer substanciado – Projeto n° 015/2008, aprovado em reunião do dia 10 de Abril de 2008 (Anexo 4).

## 4 RESULTADOS

A frequência dos fenótipos de carcinoma de mama nos 74 casos analisados encontra-se descrita na Tabela 1. Os mais frequentes foram: luminal A (35,1%) e basal (23,0%).

**Tabela 1** - Frequência dos fenótipos do carcinoma de mama definidos pela imunohistoquímica em 74 casos para os marcadores testados

<b>Classificação do fenótipo</b>	<b>RE</b>	<b>HER2</b>	<b>P-caderina e/ou EGFR e/ou CK5</b>	<b>Frequência n (%)</b>
<b>Luminal A</b>	Positivo	Negativo	Positivo/negativo	26 (35,1)
<b>Luminal B</b>	Positivo	Positivo	Positivo/negativo	4 (5,4)
<b>Basal</b>	Negativo	Negativo	Positivo	17 (23,0)
<b>Superexpressão de HER2</b>	Negativo	Positivo	Positivo/negativo	15 (20,3)
<b>Indeterminado*</b>	Negativo	Negativo	Negativo	12 (16,2)

\* Os casos indeterminados referem-se àqueles que não preencheram critérios de classificação do carcinoma de mama (luminal A, luminal B, basal e superexpressão de HER2), utilizando-se análise imunohistoquímica e, portanto, foram excluídos da análise estatística.

Necrose esteve presente em 64,7% dos carcinomas de mama com fenótipo basal e em 31,1% dos carcinomas não-basais (luminal A, luminal B e superexpressão de HER2), sendo que esta diferença foi estatisticamente significativa, apresentando OR de 3,80 ( $p=0,0404$ , IC95%: 1,16-12,38) (Tabelas 2-3).

Dentre as PAAF de carcinoma de mama, outros critérios citológicos importantes para identificar o fenótipo basal foram: presença/proeminência de nucléolo (88,2%), celularidade acentuada (76,5%) e atipia nuclear intensa (76,5%), porém a frequência destes componentes não apresentou diferença significativa em relação às frequências correspondentes observadas para os carcinomas de mama não-basais (Tabelas 2-3).

Referente ao fenótipo luminal A, 33,3% dos casos apresentaram discreta celularidade, 52,2% apresentaram nucléolo inconspícuo e 20,8% apresentaram necrose (Tabela 2). O fenótipo basal, em relação ao subtipo luminal A apresentou mais frequentemente necrose,

com OR de 6,97 (p=0,0151, IC95%: 1,72-28,25) e nucléolo presente/proeminente, apresentando OR de 8,18 (p=0,0013, IC95%: 1,51-44,21). O critério celularidade demonstrou significância limítrofe para diferenciar os carcinomas com fenótipo basal do luminal A, com OR de 18,03 (p=0,0257, IC95%: 0,96-337,81) (Tabela 3).

**Tabela 2** - Distribuição dos critérios citológicos individuais identificados no exame citológico da PAAF com o diagnóstico do fenótipo molecular do carcinoma de mama

Critérios citológicos	Basal		Luminal A		Luminal B		Superexpressão de HER2		Não-basal†	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
<b>Celularidade</b>										
Discreta	0	0,0	8	33,3	1	25,0	2	13,3	11	25,6
Moderada	4	23,5	5	20,8	0	0,0	5	33,3	10	23,3
Acentuada	13	76,5	11	45,8	3	75,0	8	53,3	22	51,2
Indeterminada/excluída*	0		2		0		0		2	
<b>Coesão celular</b>										
Pouca	6	35,3	4	16,7	1	25,0	2	13,3	7	16,3
Moderada	11	64,7	12	50,0	3	75,0	10	66,7	25	58,1
Acentuada	0	0,0	8	33,3	0	0,0	3	20,0	11	25,6
Indeterminada/excluída*	0		2		0		0		2	
<b>Necrose</b>										
Presente	11	64,7	5	20,8	3	75,0	6	40,0	14	31,1
Ausente	6	35,3	19	79,2	1	25,0	9	60,0	29	67,4
Indeterminada/excluída*	0		2		0		0		2	
<b>Nucléolo</b>										
Inconspícuo	2	11,8	12	52,2	1	25,0	0	0,0	13	32,5
Presente	3	17,6	11	47,8	2	50,0	3	23,1	16	40,0
Presente e proeminente	12	70,6	0	0,0	1	25,0	10	76,9	11	27,5
Indeterminado/excluído*	0		3		0		2		5	
<b>Atipia nuclear</b>										
Discreta	0	0,0	6	25,0	0	0,0	0	0,0	6	14,0
Moderada	4	23,5	15	62,5	2	50,0	4	26,7	21	48,8
Intensa	13	76,5	3	12,5	2	50,0	11	73,3	16	37,2
Indeterminada/excluída*	0		2		0		0		2	
<b>Total de casos</b>	<b>17</b>	<b>27,4</b>	<b>26</b>	<b>41,9</b>	<b>4</b>	<b>6,5</b>	<b>15</b>	<b>24,2</b>	<b>45</b>	<b>72,6</b>

\* Considerou-se como critério citológico indeterminado quando não foi possível estabelecer tal característica ao se analisar o material de PAAF no esfregaço. Tais casos foram excluídos da análise dos percentuais.

† Luminal A, luminal B e superexpressão de HER2.



**Tabela 3** - Correlação entre critérios citológicos comparando o fenótipo basal com os outros fenótipos de carcinoma de mama definidos pela imunohistoquímica

<b>Crítérios citológicos</b>	<b>p*</b>	<b>OR (IC95%)†</b>
<b>Celularidade (discreta <i>versus</i> moderada/acentuada)</b>	0,0257	
Basal X superexpressão de HER2		6,48 ( 0,29 a 146,54 )
Basal X Luminal A		18,03 ( 0,96 a 337,81 )
Basal X Luminal B		15,00 ( 0,50 a 449,55 )
Basal X Não-basal‡	0,0247	12,38 ( 0,69 a 222,95 )
<b>Coesão celular (pouca <i>versus</i> moderada/acentuada)</b>	0,3968	
Basal X superexpressão de HER2		0,28 ( 0,05 a 1,69 )
Basal X Luminal A		0,37 ( 0,08 a 1,58 )
Basal X Luminal B		0,76 ( 0,09 a 6,45 )
Basal X Não-basal‡	0,1628	0,36 ( 0,10 a 1,29 )
<b>Necrose/inflamação (presente)</b>	0,0151	
Basal X superexpressão de HER2		2,75 ( 0,66 a 11,54 )
Basal X Luminal A		6,97 ( 1,72 a 28,25 )
Basal X Luminal B		0,61 ( 0,05 a 7,24 )
Basal X Não-basal‡	0,0404	3,80 ( 1,16 a 12,38 )
<b>Nucléolo (inconspícuo <i>versus</i> presente/presente e proeminente)</b>	0,0013	
Basal X superexpressão de HER2		0,23 ( 0,01 a 5,22 )
Basal X Luminal A		8,18 ( 1,51 a 44,21 )
Basal X Luminal B		2,50 ( 0,17 a 37,26 )
Basal X Não-basal‡	0,1871	3,61 ( 0,72 a 18,19 )
<b>Atipia nuclear (discreta <i>versus</i> moderada/intensa)</b>	0,0236	
Basal X superexpressão de HER2		1,13 ( 0,02 a 60,37 )
Basal X Luminal A		12,30 ( 0,64 a 234,91 )
Basal X Luminal B		3,89 ( 0,07 a 224,24 )
Basal X Não-basal‡	0,1703	6,07 ( 0,32 a 113,83 )

\* Teste exato de Fisher

† Odds ratio bruto (OR). IC95% = Intervalo de confiança de 95%

‡ Luminal A, luminal B e superexpressão de HER2

## 5 DISCUSSÃO

O presente estudo analisou o material obtido por punção aspirativa por agulha fina de tecido mamário com carcinoma de mama tendo como objetivo investigar se alguns critérios citológicos específicos seriam capazes de predizer o fenótipo basal do carcinoma de mama, tendo como padrão-ouro uma série de 74 casos de carcinomas de mama ductais infiltrantes de alto grau, classificados segundo a atual classificação imunoistoquímica, utilizando a técnica de *tissue microarray*.

No intuito de se obter um diagnóstico cada vez mais precoce do carcinoma de mama e estabelecer critérios para caracterizá-lo, principalmente aqueles subtipos de pior prognóstico, como é o caso do carcinoma de mama com fenótipo basal, têm-se utilizado métodos de investigação variados. Até a presente data, nenhum estudo havia sido realizado utilizando material citológico, obtido através da PAAF, para a investigação da associação de critérios citológicos específicos com os subtipos moleculares do carcinoma de mama, a fim de verificar a existência de critérios citológicos que poderiam predizer o fenótipo basal do carcinoma de mama.

Segundo os resultados desse estudo, o critério citológico que teve associação estatisticamente significativa para diferenciar o fenótipo basal dos fenótipos não-basais (luminal A, luminal B e superexpressão de HER2) foi a presença de necrose no material citológico obtido através da PAAF. O fenótipo basal apresentou 3,80 vezes mais chance de ter necrose se comparado ao fenótipo não-basal ( $p=0,0404$ ). Tsuda *et al.*<sup>33</sup> foram um dos primeiros autores a demonstrar a presença de grandes zonas de necrose na histologia como sendo uma característica marcante dos carcinomas de mama com fenótipo basal. Livasy *et al.*<sup>32</sup> também demonstraram em seu estudo que carcinomas basais na histologia apresentaram zonas de necrose em 74% dos 23 casos analisados. Dados correspondentes foram encontrados no exame histopatológico de carcinomas ductais *in situ* de alto grau, pois estes estão associados, dentre outros aspectos, à presença de necrose, nucléolo proeminente, alta celularidade e pleomorfismo celular.<sup>24,31,32,72,78</sup> Esses achados estão em concordância com outros estudos, que demonstraram correlação estatisticamente significativa entre o fenótipo basal e a presença de necrose tumoral.<sup>10,24,31,32,72</sup> Além disso, a presença de necrose também foi recentemente identificada com valor no diagnóstico do fenótipo basal, utilizando material

proveniente de *core biopsy*.<sup>79</sup> Portanto, a presença de necrose é um critério freqüentemente associado ao fenótipo basal e pode ser utilizado na PAAF para predizer esse diagnóstico.

Um outro resultado de nosso estudo demonstrou que o fenótipo basal apresentou mais freqüentemente acentuada celularidade, necrose e nucléolo presente/proeminente em relação ao fenótipo luminal A. Contudo, vale ressaltar que o critério celularidade apresentou significância limítrofe, com OR de 18,03 ( $p=0,0257$ ; IC95%: 0,96 – 337,81). Esse fato pode ter ocorrido devido à amostra analisada ser insuficiente para demonstrar a diferença, o que acontece quando o evento é mais raro ou quando há pequenas diferenças entre os dados. No caso da análise da celularidade dos fenótipos basal e luminal A, a única categoria com alguma diferença mais evidente é celularidade discreta, sendo oito casos apresentando celularidade discreta no fenótipo luminal e nenhum caso no fenótipo basal, ou seja, possivelmente se trata de uma amostra com insuficiente poder estatístico para ser claramente significativa.

Os resultados encontrados nesse estudo merecem especial atenção, pois os carcinomas de mama com fenótipo basal possuem formas de abordagem muito distintas daquelas dos carcinomas luminais.

De acordo com vários autores, o carcinoma de mama com fenótipo basal é um subtipo distinto de carcinoma de mama que mostra características morfológicas, genéticas e imunofenotípicas heterogêneas e é associado a um pior prognóstico.<sup>3-5,17,35</sup> Na prática, a atual definição desses tumores varia amplamente. Em termos de *microarray* de expressão gênica, são definidos por assinaturas de genes específicos que é similar àquelas de células basais e/ou mioepiteliais de mama. Em termos de identificação imunoistoquímica, tem-se utilizado um painel de marcadores das proteínas dos genes.<sup>4,7,12,13,15,25</sup> Carcinomas basais requerem a investigação de presença de mutações no gene *BRCA1*, particularmente se esses tumores forem negativos para receptores hormonais.<sup>12</sup> De acordo com o estudo de Lakhani *et al.*<sup>10</sup>, considerando-se um procedimento de rastreamento de mutações no gene *BRCA1* baseado na seleção de mulheres que são RE negativo e CK5/6positivo, tal teste isoladamente teria uma sensibilidade de cerca de 56% e especificidade de 97% em detectar carreadores da mutação no *BRCA1*, com valor preditivo positivo de 28% e valor preditivo negativo de 99%. Para o rastreamento de mutação nesse gene, atualmente as pacientes são selecionadas com base na história familiar, mas isso pode ser pouco confiável, pois somente uma minoria dos casos de carcinomas de mama apresenta uma história familiar positiva de parentes de primeiro grau acometidos e que menos de 10% das pacientes com história familiar positiva carregam mutação no *BRCA1*.<sup>80</sup> Portanto, um teste de rastreamento baseado nessa definição de história familiar teria uma sensibilidade de 31% e um valor preditivo positivo de 9%.<sup>10</sup> Sendo assim, a

análise imunistoquímica fornece melhor sensibilidade e valor preditivo positivo para detectar carreadores de mutações no gene *BRCA1* se comparada à presença de história familiar positiva de carcinoma de mama.

Em relação à prevalência do carcinoma de mama com fenótipo basal, mesmo que nosso estudo tenha avaliado um número relativamente pequeno de casos de carcinomas de mama, foram encontrados 23,0% dos carcinomas ductais infiltrantes de alto grau analisados apresentando esse fenótipo, sendo que esse dado coincide com estudos prévios, pois o fenótipo basal foi responsável por 17,4% a 21,2% dos carcinomas ductais esporádicos de alto grau.<sup>18,20,27,31,81</sup>

Até o presente momento, este foi o primeiro estudo que se propôs a analisar a relação de critérios citológicos específicos com o fenótipo basal do carcinoma de mama por PAAF. A PAAF da mama é a técnica menos invasiva de se obter um diagnóstico celular e com grande acurácia se o operador e o citopatologista são experientes, contudo, resultados falso-negativos ocorrem, na maioria dos casos, por erros na coleta da amostra.<sup>62</sup> Trata-se de uma técnica que pode ser repetida seguramente se a citologia é inconclusiva, pois possui complicações mínimas descritas na literatura vigente.<sup>45,48-50,62</sup> A recente diminuição da popularidade da PAAF pode ser atribuída, em parte, à falta de experiência dos citopatologistas em centros individuais, levando a mais erros diagnósticos e a um maior número de amostras insatisfatórias.<sup>82</sup> Realizada por uma equipe médica experiente, a PAAF de lesões mamárias é confiável para o diagnóstico de carcinoma de mama e para guiar tratamentos posteriores. Principalmente em centros médicos em áreas menos privilegiadas economicamente, a PAAF é recomendada como procedimento de primeira linha, haja vista a facilidade da técnica, a rapidez em se obter o diagnóstico e o baixo custo se comparado à biópsia cirúrgica aberta como procedimento inicial.<sup>53</sup>

Uma avaliação citológica de marcadores prognósticos é importante e de grande utilidade, em especial em pacientes com carcinomas de mama inoperáveis e em casos com alto risco para cirurgia. Além disso, a avaliação do *status* hormonal (RE e PR) pode ser feita com material obtido pela PAAF, demonstrando boa acurácia.<sup>81</sup> Em pacientes com carcinoma de mama avançado que requerem radioterapia ou quimioterapia neoadjuvante, a avaliação citológica de determinadas características pode fornecer dados úteis, pois se sabe que esses parâmetros podem ser modificados pelo tratamento.<sup>84-86</sup> Alguns estudos sugerem que os tumores palpáveis de mama podem ser definitivamente diagnosticados com base numa combinação de exame físico, exames de imagem e PAAF, quando os exames de imagem estiverem de acordo com o diagnóstico por PAAF.<sup>65</sup> Por outro lado, a *core biopsy* tem sido

freqüentemente utilizada em alguns centros, porém, este ainda é um procedimento traumático para uso clínico rotineiro e às vezes é tecnicamente difícil a se aplicar a tumores de mama pequenos. Na realidade, o resultado da análise citológica por PAAF geralmente é suficiente na maioria dos casos de carcinoma de mama para cirurgia conservadora de mama.<sup>65</sup> No estudo de revisão de Kocjan *et al.*<sup>83</sup>, concluiu-se que quando há concordância na avaliação tripla de uma lesão mamária (exame clínico, exames de imagem e PAAF), o tratamento final pode ser realizado com base na PAAF, sem necessidade de biópsia cirúrgica aberta. Sendo assim, propõe-se que a PAAF seja a primeira linha de investigação patológica em populações sintomáticas ou em populações com lesões mamárias descobertas através de programas de rastreamento, com exceção daquelas lesões apresentando microcalcificações no exame de mamografia, em que seria mais indicado outro tipo de abordagem diagnóstica inicial.<sup>83</sup>

Temos conhecimento de que nosso estudo enfrentou algumas limitações, como número reduzido de casos de carcinoma de mama ductal infiltrante de alto grau disponíveis para análise e, portanto, faz-se necessária a realização de mais estudos acerca deste tema, utilizando uma amostra maior de casos analisados.

Dessa forma, conclui-se que critérios citológicos específicos podem ser muito úteis no reconhecimento do carcinoma de mama com fenótipo basal no material de citologia obtido por PAAF, método mais comumente utilizado no início da investigação de um tumor ou nódulo mamário. Esses critérios citológicos encontrados em nosso estudo, em conjunto com negatividade para RE, RP e HER2, combinado com positividade para marcadores imunoistoquímicos basais como CK5, P-caderina e EGFR poderiam auxiliar na confirmação do diagnóstico do fenótipo basal. Sabendo-se da natureza agressiva desse subtipo de tumor, há um grande interesse clínico em estabelecer o seu diagnóstico o mais precocemente possível. Assim sendo, ao se verificar a presença de necrose, nucléolo presente/proeminente e acentuada celularidade, recomendamos que se investigue a possibilidade de se tratar de um carcinoma de mama com fenótipo basal e, se possível, tentar confirmar esse diagnóstico através da análise imunoistoquímica, utilizando-se os marcadores conhecidos como relacionados a esse subtipo de tumor. Ainda, a PAAF proporciona uma alternativa adequada numa variedade de situações clínicas e pode ser útil para se obter material para estudar marcadores prognósticos.

Analisamos em nosso estudo material citológico da PAAF por se tratar de um método pouco traumático e com boa sensibilidade para o diagnóstico de carcinoma de mama quando realizado por médicos experientes, com bom treinamento na realização desse método diagnóstico.

## 6 CONCLUSÕES

### 6.1 Respostas aos objetivos específicos

1. A frequência dos critérios citológicos individuais presentes na PAAF em relação aos fenótipos basal e não-basal foi a seguinte: celularidade discreta: 0,0% dos basais e 25,6% dos não-basais; celularidade moderada: 23,5% dos basais e 23,3% dos não-basais; celularidade acentuada: 76,5% dos basais e 51,2% dos não-basais. Pouca coesão celular: 35,3% dos basais e 16,3% dos não-basais; moderada coesão celular: 64,7% dos basais e 58,1% dos não-basais; acentuada coesão celular: 0,0% dos basais e 25,6% dos não-basais. Presença de necrose: 64,7% dos basais e 31,1% dos não-basais. Nucléolo inconspícuo: 11,8% dos basais e 32,5% dos não-basais; nucléolo presente: 17,6% dos basais e 40,0% dos não-basais; nucléolo presente e proeminente: 70,6% dos basais e 27,5% dos não-basais. Discreta atipia nuclear: 0,0% dos basais e 14,0% dos não-basais; moderada atipia: 23,5% dos basais e 48,8% dos não-basais; intensa atipia: 76,5% dos basais e 37,2% dos não-basais.

2. Houve associação dos critérios citológicos individuais presentes na PAAF com o diagnóstico do perfil molecular do carcinoma de mama, pois se verificou que o critério citológico mais importante para diferenciar o carcinoma de mama com fenótipo basal dos não-basais foi a presença de necrose, sendo que este critério esteve presente em 64,7% dos carcinomas basais e em apenas 31,1% dos carcinomas não-basais, e esta diferença foi estatisticamente significativa, apresentando OR de 3,80 ( $p=0,00404$ ). O fenótipo basal, em relação ao luminal A apresentou com maior frequência mais necrose (OR=6,97;  $p=0,0151$ ), nucléolo presente/proeminente (OR=8,18;  $p=0,0013$ ) e acentuada celularidade (OR=18,03;  $p=0,0257$ ), sendo que este último critério apresentou significância limítrofe.

### 6.2 Considerações finais

Tendo em vista a natureza agressiva dos carcinomas de mama com fenótipo basal<sup>3-5,17,35,38</sup>, há a necessidade de se investigar critérios citológicos, histológicos e imunistoquímicos cada vez mais específicos a fim de que se possa estabelecer um diagnóstico preciso deste subtipo molecular de tumor. Para isso, esse estudo demonstrou que a análise citológica, utilizando critérios específicos: necrose, nucléolo presente/proeminente e acentuada celularidade, podem servir como ferramenta útil para se identificar este fenótipo de

carcinoma de mama. Dentre os critérios analisados, a presença de necrose mostrou ter significância estatística para diferenciar o carcinoma com fenótipo basal dos outros fenótipos moleculares. Além disso, presença de necrose, presença ou presença/proeminência de nucléolo e acentuada celularidade também foram critérios estatisticamente significantes para se diferenciar o carcinoma com fenótipo basal do luminal A, este último associado a melhor prognóstico e que responde à terapia anti-estrogênica disponível.

Em conjunto com os marcadores imunoistoquímicos conhecidos para diferenciar o fenótipo basal, como por exemplo: CK5/6, CK14, EGFR, P-caderina e p63, esses critérios citológicos estudados podem ser úteis na confirmação do diagnóstico desse subtipo de carcinoma de mama.

Assim, esses dados possuem grande relevância clínica, pois esses tumores ainda não possuem tratamento específico<sup>5,38</sup>, têm um pior prognóstico<sup>3-5,17,35</sup> e podem levantar a suspeita de se tratar de um carcinoma de mama de caráter hereditário, pois os estudos mostraram ter associação importante com mutações no gene *BRCA1*<sup>5,7-12</sup> e, portanto, faz-se necessário diagnosticá-los o mais precocemente possível, pois se sabe que mulheres que carregam mutações no *BRCA1* têm uma probabilidade de cerca de 80% de desenvolverem carcinoma de mama e de 40% a 60% para o desenvolvimento de câncer de ovário durante a sua vida.<sup>85</sup> Além disso, essas mulheres têm 65% de probabilidade de desenvolverem um segundo carcinoma de mama se elas atingirem 70 anos de idade.<sup>88-90</sup> Sabendo-se que a PAAF é o método de rotina para a avaliação inicial das lesões mamárias, em sendo identificada a presença de necrose, nucléolo presente/proeminente e acentuada celularidade, recomendamos que se investigue a possibilidade de se tratar de um carcinoma de mama com fenótipo basal e, se possível, tentar confirmar esse diagnóstico através da análise imunoistoquímica, utilizando-se os marcadores conhecidos como relacionados a esse subtipo de tumor, pois, dessa forma, pode-se guiar a tomada de condutas iniciais nesse momento da avaliação, haja vista as particularidades desse subtipo de tumor.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. American Cancer Society. Cancer Facts & Figures 2008 [homepage da Internet]. Atlanta: American Cancer Society; 2008. [acesso em 16 de junho de 2008]. Disponível em: <http://www.cancer.org/>.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2008: Incidência do Câncer no Brasil [homepage da Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2008. [acesso em 16 de junho de 2008]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>.
3. 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.
4. 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.
5. 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; 00(14):8418-23.
6. Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006 Feb 15;98(4):262-72.
7. van't Veer LJ, Dai H, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature*. 2002 Jan 31;415(6871):530-6.
8. 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.
9. Foulkes WD. BRCA1 functions as a breast stem cell regulator. *J Med Genet*. 2004 Jan;41(1):1-5.
10. 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.
11. Turner NC, Reis-Filho JS. Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene*. 2006 Sep 25;25(43):5846-53.
12. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008 May 20;26(15):2568-81.



13. 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.
14. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer.* 2005 Sep 1;116(3):340-50.
15. Da Silva L, Clarke C, and Lakhani SR. Demystifying basal-like breast carcinomas. *J Clin Pathol.* 2007 Dec;60(12):1328-32.
16. 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.
17. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* 2002 Dec;161(6):1991–6.
18. Kusińska R, Potemski P, Jesionek-Kupnicka D, Kordek R. Immunohistochemical identification of basal-type cytokeratins in invasive ductal breast carcinoma –relation with grade, stage, estrogen receptor and HER2. *Pol J Pathol.* 2005;56(3):107–10.
19. Ribeiro-Silva A, Ramalho LN, Garcia SB, Brandão DF, Chahud F, Zucoloto S. p63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology.* 2005 Nov;47(5):458-66.
20. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, Steele D, Ashworth A, Lakhani SR, Smith IE. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol.* 2006 Jul; 59(7):729-35.
21. 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.
22. Rodríguez-Pinilla SM, Sarrió D, Honrado E, Hardisson D, Calero F, Benitez J, Palacios J. 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.
23. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, et al. Basolumental carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4185-91.

24. 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.
25. Rakha EA, El-Sayed M, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007 Mar;50(4):434-8.
26. 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.
27. 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.
28. Tsuda H, Morita D, Kimura M, Shinto E, Ohtsuka Y, Matsubara O, et al. Correlation of c-KIT and EGFR overexpression with invasive ductal breast carcinoma of the solid-tubular subtype, nuclear grade 3, and mesenchymal or myoepithelial differentiation. *Cancer Sci*. 2005 Jan;96(1):48-53.
29. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Voss R, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*. 2002 Nov;82(11):1525-33.
30. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinomas of the breast revisited – an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):553-60.
31. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, Hanby A. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):22-34.
32. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006 Feb;19(2):264-71.
33. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa T, Murata T, Hirohashi S. Myoepithelial differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas with large central acellular zones. *Hum Pathol*. 1999 Oct;30(10):1134-9.
34. Jacquemier J, Padovani L, Rabayrol L, Lakhani SR, Penault-Llorca F, Denoux Y, et al. Typical medullary breast carcinoma have a basal/myoepithelial phenotype. *J Pathol*. 2005 Nov; 207(3):260-8.
35. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, Green AR, Lee AH, Robertson JF, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. 2006 Dec;42(18):3149–56.

36. Gaedcke J, Traub F, Milde S, Wilkens L, Stan A, Ostertag H, et al. Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. *Mod Pathol.* 2007 Aug;20(8):864-70.
37. Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, Coleman KA, Yoder BJ, et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol.* 2006 Sep;30(9):1097-104.
38. van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *New Engl J Med.* 2002 Dec 19;347(25):1999-2009.
39. Hatake K, Tikudome N, Ito Y. Next generation molecular targeted agents for breast cancer: focus on EGFR and VEGFR pathways. *Breast Cancer.* 2007 Apr;14(2):132-49.
40. Katz M, Amit I, Citri A, Shay T, Carvalho S, Lavi S, et al. A reciprocal tensin-3-cten switch mediates EGF-driven mammary cell migration. *Nat Cell Biol.* 2007 Aug;9(8):961-9.
41. Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol.* 2007 Mar;8(3):235-44.
42. Rody A, Karn T, Solbach C, Gaetje R, Munnes M, Kissler S, et al. The erbB2+ cluster of the intrinsic gene set predicts tumor response of breast cancer patients receiving neoadjuvant chemotherapy with docetaxel, doxorubicin and cyclophosphamide within the GEPARTRIO trial. *Breast.* 2007 Jun;16(3):235-40.
43. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403-10.
44. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol.* 2006 Mar;59(3):225-31.
45. Koss LG. The palpable breast nodule: a cost-effectiveness analysis of alternate diagnostic approaches. The role of the needle aspiration biopsy. *Cancer.* 1993 Sep 1; 72 (5): 1499-502.
46. Zagorianakou P, Fiaccavento S, Zagorianakou N, Makrydimas G, Stefanou D, Agnantis NJ. FNAC: its role, limitations and perspective in the preoperative diagnosis of breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol.* 2005;26(2):143-9.
47. Martin H, Ellis E. Biopsy by needle puncture and aspiration. *Ann Surg.* 1930 Aug;92(2):169-81.
48. Arisio R, Cuccorese C, Accinelli G, Mano MP, Bordon R, Fessia L. Role of fine-needle aspiration biopsy in breast lesions: analysis of a series of 4.110 cases. *Diagn Cytopathol.* 1998 Jun;18(6):462-7.

49. Eisenberg AJ, Hajdu SI, Winhelmus J, Melamed MR, Kinne D. Preoperative aspiration cytology of breast tumors. *Acta Cytol.* 1986 Mar-Apr;30(2):135-46.
50. Karimzadeh M, Sauer T. Diagnostic accuracy of fine-needle aspiration cytology in histological grade 1 breast carcinomas: are we good enough? *Cytopathology.* 2008 Oct;19(5):279-86.
51. Layfield LJ, Chrischilles EA, Cohen MB, Bottles K. The palpable breast nodule: A cost-effectiveness analysis of alternate diagnostic approaches. *Cancer.* 1993 Sep; 72(5):1642-51.
52. Kamphausen BH, Toellner T, Ruschenburg I. The value of ultrasound-guided fine-needle aspiration cytology of the breast: 354 cases with cytohistological correlation. *Anticancer Res.* 2003 May-Jun;23(3C):3009-13.
53. Chaiwun B, Thorner P. Fine needle aspiration for evaluation of breast masses. *Curr Opin Obstet and Gynecol.* 2007 Feb;19(1):48-55.
54. Stanley MW, Sidawy MK, Sanchez MA, Stahl RE, and Goldfisher M. Current issues in breast cytopathology. *Am J Clin Pathol.* 2000 May;113(5 Suppl 1):S49-75.
55. Azavedo E, Svane G, Auer G. Stereotatic fine-needle biopsy in 2594 mammographically detected non-palpable lesions. *Lancet.* 1989 May 13;1(8646):1033-6.
56. Vetrani A, Fulcitini F, Di Benedetto G, Zeppa P, Troncone G, Boscaino A, et al. Fine-needle aspiration biopsies of breast masses. An additional experience with 1153 cases (1985 to 1988) and a meta-analysis. *Cancer.* 1992 Feb 1;69(3):736-40.
57. Hussain MT. Comparison of fine needle aspiration cytology with biopsy excision biopsy of breast lumps. *J Coll Physicians Surg Pak* 2005 Apr;15(4):211-4.
58. Collaço LM, de Lima RS, Werner B, Torres LF. Value of fine needle aspiration in the diagnosis of breast lesions. *Acta Cytol.* 1999 Jul-Aug;43(4):587-92.
59. Mehmood A, Ahmed M, Jamal S. Role of cytological grading in the management of breast lump. *J Coll Physicians Surg Pak.* 2003 Mar;13(3):150-2.
60. Dennison G, Anand R, Makar SH, Pain JA. A prospective study of the use of fine-needle aspiration cytology in diagnosis of breast cancer. *Breast J.* 2003 Nov-Dec;9(6):491-3.
61. Choi YD, Choi YH, Lee JH, Nam JH, Juhng SW, Choi C. Analysis of fine needle aspiration cytology of the breast: a review of 1,297 cases and correlation with histologic diagnoses. *Acta Cytol.* 2004 Nov-Dec;48(6):801-6.

62. Aziz M, Ahmad N, Zahid J, Aziz F, Faizullah ,Aziz M. Comparison of FNAC and open biopsy in palpable breast lumps. *J Coll Physicians Surg Pak*. 2004 Nov;14(11):654-6.
63. Medina-Franco H, Abarca-Pérez L, Cortés-González R, Soto-Germes S, Ulloa JA, Uribe N. Fine needle aspiration biopsy of breast lesions: institutional experience. *Rev Invest Clin*. 2005 May-Jun;57(3):394-8.
64. Saravanja S, Kubik-Huch RA, Komminoth P, Jöstingmeier S, Hohl M, Otto RC. Ultrasound-guided fine-needle aspiration of the breast. *Praxis (Bern 1994)*. 2005 Apr 27;94(17):673-9.
65. Ishikawa T, Hamaguchi Y, Tanabe M, Momiyama N, Chishima T, Nakatani Y, et al. False-positive and false-negative cases of fine-needle aspiration cytology for palpable breast lesions. *Breast cancer*. 2007 Oct;14(4):388-92.
66. Florentine BD, Staymates B, Rabadi M, Barstis J, Black A. The reliability of fine-needle aspiration biopsy as the initial diagnostic procedure for palpable masses. *Cancer*. 2006 Jul 15;107(2):406-16.
67. Young NA, Mody DR, Davey DD. Diagnosis and subclassification of breast carcinoma by fine-needle aspiration biopsy: results of the interlaboratory comparison program in non-gynecologic cytopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2002 Dec;126(12):1453-7.
68. Jayaram G, Elsayed EM. Cytologic evaluation of prognostic markers in breast carcinoma. *Acta Cytol*. 2005 Nov-Dec;49(6):605-10.
69. Koss LG. *Koss's diagnostic cytology*. 5 th ed. Philadelphia, PA: Lippincott Williams & Wilkins; 2006. p. 1004–1120.
70. Shabot MM, Goldberg IM, Schick P, Nieberg R, Pilch YH. Aspiration cytology is superior to Tru-Cut needle biopsy in establishing the diagnosis of clinically suspicious breast masses. *Ann Surg*. 1982 Aug;196(2):122-6.
71. Frable JW. Needle aspiration biopsy: past, present and future. *Hum Pathol*. 1989 Jun;20(6):504-17.
72. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, and 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.
73. Paredes J, Albergaria A, Carvalho S, Schmitt FC. "Basal-like" breast carcinomas: identification by P-cadherin, P63 and EGFR basal cytokeratins expression. *Appl. Cancer Res*. 2006 Apr-Jun;26(2):41-55.
74. 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.

75. 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.
76. 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.
77. Huang HJ, Neven P, Drijkoningen 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.
78. Cangiarella J, Waisman J, Simsir A. Cytologic findings with histologic correlation in 43 cases of mammary intraductal adenocarcinoma diagnosed by aspiration biopsy. *Acta Cytol*. 2003 Nov-Dec;47(6):965-72.
79. Chivukula M, Striebel J, Erşahin C, Dabbs DJ. Evaluation of morphologic features to identify "basal-like phenotype" on core needle biopsies of breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008 Oct;16(5):411-6.
80. Peto J, Collins N, Barfoot R, Seal S, Warren W, Rahman N, et al. Prevalence of BRCA1 and BRCA2 gene mutations in patients with early-onset breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 1999 Jun 2;91(11):943-9.
81. Jones C, Ford E, Gillett C, Ryder K, Merrett S, Reis-Filho JS, et al. Molecular cytogenetic identification of subgroups of grade III invasive ductal breast carcinomas with different clinical outcomes. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):5988-97.
82. Wells CA, Perera R, White FE, Domizio P. Fine needle aspiration cytology in the UK breast screening programme: a national audit of results. *Breast*. 1999 Oct; 8(5):261-6.
83. Kocjan G, Bourgain C, Fassina A, Hagmar B, Herbert A, Kapila K, et al. The role of breast FNAC in diagnosis and clinical management: a survey of current practice. *Cytopathology* 2008 Oct;19(5):271-8.
84. Masood S. Estrogen and progesterone receptors in cytology: a comprehensive review. *Diagn Cytopathol*. 1992;8(5):475-491.
85. Zoppi JA, Pellicer EM, Sundblad AS. Cytohistologic correlation of nuclear grade in breast carcinoma. *Acta Cytol*. 1997 May-Jun;41(3):701-4.
86. Zoppi JA, Rotundo AV, Sundblad AS. Correlation of immunocytochemical and immunohistochemical determination of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Acta Cytol*. 2002 Mar-Apr;46(2):337-40.
87. Easton DF, Bishop DT, Ford D, Crockford GP. Genetic linkage analysis in familial breast and ovarian cancer: results from 214 families. The Breast Cancer Linkage Consortium. *Am J Hum Genet*. 1993 Apr;52(4):678-701.

88. Andersen TI. Genetic heterogeneity in breast cancer susceptibility. *Acta Oncol.* 1996;35(4):407-10.
89. Ellisen LW, Haber DA. Hereditary breast cancer. *Annu Rev Med.* 1998 Feb;49:425-36.
90. Pharoah PD, Day NE, Duffy S, Easton DF, Ponder BA. Family history and the risk of breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Cancer.* 1997 May 29;71(5):800-9.

## **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.



## ANEXO 1

Grupo de Pesquisa  
Cagima



<u>Identificação</u>	<u>Recursos Humanos</u>	<u>Linhas de Pesquisa</u>	<u>Indicadores do Grupo</u>
----------------------	-------------------------	---------------------------	-----------------------------

**Identificação**

**Dados básicos**

**Nome do grupo:** Cagima  
**Status do grupo:** **certificado pela instituição**  
**Ano de formação:** 2000  
**Data da última atualização:** 16/04/2008 11:27  
**Líder(es) do grupo:**  
 Luiz Carlos Zeferino - [luiz.zeferino@pq.cnpq.br](mailto:luiz.zeferino@pq.cnpq.br)

Sophie Françoise Mauricette Derchain - [sophie.derchain@pq.cnpq.br](mailto: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

**Cidade:** Campinas

**Telefone:** 35219516

**E-mail:** [zeferino@caism.unicamp.br](mailto:zeferino@caism.unicamp.br)

**CEP:** 13083881

**UF:** SP

**Fax:** 35218302

**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**

**Total: 15**

[Cecilia Maria Roteli-Martins](#)

[Fernando Guimarães](#)

[Glauce Aparecida Pinto](#)

[Joana Froes Bragança Bastos](#)

[Jose Vassallo](#)

[Juliana Karina Ruiz Heinrich](#)

[Julio Cesar Teixeira](#)

[Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade](#)

[Luís Otávio Zanatta Sarian](#)

[Luiz Carlos Zeferino](#)

[Maria Salete Costa Gurgel](#)

[Rita Goreti Amaral](#)

[Rozany Mucha Dufloth](#)

[Sílvia Helena Rabelo dos Santos](#)

[Sophie Françoise Mauricette Derchain](#)

**Estudantes**

**Total: 15**

[Adriana Cássia Paiva Santos](#)

[Aline Schmitt Polidoro](#)

[Paulo Cesar Martins Alves](#)

[Raphael Augusto Pioli de Freitas](#)

[Anne Melina Ambrósio Avelar](#)  
[Claudia Cristina Camisão](#)  
[Eliana Borin Lopes Montemor](#)  
[Jung Hyun Yoon](#)  
[Karen Vicência Pingarilho Lombardelli](#)  
[Marcela Ponzio Pinto Silva](#)

[Renata Clementino Gontijo](#)  
[Rosana Franco](#)  
[Sabas Carlos Vieira](#)  
[Tatiane Fernandes](#)  
[Vera Lúcia Rezende](#)

<b>Técnicos</b>	<b>Total: 10</b>
-----------------	------------------

Cristiano Aparecido Chagas - Ensino Médio (2o grau) - Técnico de Laboratório  
 Deise Regina Giuliette Voltani - Graduação - Técnico de Laboratório  
 Douglas Munhoz Montis - Graduação - Médico  
 Elisabete Aparecida Campos - Graduação - Biólogo  
 Érika Simone Lopes - Graduação - Bioquímico  
 Gislaine 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 Moraes - Graduação - Estatístico

<b>Linhas de pesquisa</b>	<b>Total: 5</b>
---------------------------	-----------------

- [Avaliação dos Procedimentos Diagnósticos e Terapêuticos do Câncer Ginecológico e Mamário](#)
- [Epidemiologia e Prevenção do Câncer Ginecológico e Mamário](#)
- [Imunoterapia do câncer utilizando células NK](#)
- [Interações tumor hospedeiro](#)
- [Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Patogênese e na Progressão do Câncer Ginecológico e Mamário.](#)

<b>Relações com o setor produtivo</b>	<b>Total: 0</b>
---------------------------------------	-----------------

<b>Indicadores de recursos humanos do grupo</b>		
	<b>Integrantes do grupo</b>	<b>Total</b>

Pesquisador(es)		15
Estudante(s)		15
Técnico(s)		10

## ANEXO 2

### 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 a 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 a 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 a temperatura ambiente durante 5 minutos. Colocar as lâminas em PBS.

#### *3. Bloqueio da Peroxidase Endógena*

Para bloqueio da peroxidase endógena, coloca-se sobre a área delimitada (com caneta hidrofóbica) 100ul 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 laminas com 100ul de UltraVisonBlock durante 15 minutos.

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

### ***4. Anticorpo Primário***

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

Lavagem em PBS 2-5 minutos.

### ***5. Anticorpo Secundário Biotinilado***

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

Lavagem em PBS 2-5 minutos.

### ***6. Complexo Streptavidina Peroxidase***

Incubação das lâminas com 100ul 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 3

### FICHA PARA COLETA DE DADOS

**Local da coleta:** ( ) Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário (HU), Florianópolis ( ) IMP Laboratório Médico, Florianópolis ( ) Hospital São João do Porto, Universidade do Porto, Portugal

#### Fenótipos dos carcinomas de mama

(1) Basal\* (2) Luminal A (3) Luminal B (4) Superexpressão de HER2 (5) Indeterminado

\* Fenótipo basal = RE negativo/HER2 negativo e pelo menos um marcador basal positivo (P-caderina, CK5 ou EGFR).

#### Critérios citológicos dos carcinomas de mama

**Celularidade** (1) Discreta (2) Moderada (3) Acentuada

**Coesão celular** (1) Pouca (2) Moderada (3) Acentuada

**Necrose/Infamação** (0) Ausente (1) Presente

**Nucléolo** (1) Inconspícuo (2) Presente (3) Presente e proeminente

**Atipia nuclear** (1) Discreta (2) Moderada (3) Intensa


Número do caso	Perfil molecular do carcinoma de mama	Celularidade	Coesão celular	Necrose/inflamação	Nucléolo	Atipia nuclear

**ANEXO 4****APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS**

Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos

**CERTIFICADO Nº 13**

O Comitê de Ética na Pesquisa em Seres Humanos (CEPSH) da Pró-Reitoria de Pesquisa da Universidade Federal de Santa Catarina, instituído pela PORTARIA N.º0584/GR/99 de 04 de novembro de 1999, com base nas normas para constituição e funcionamento do CEPSH, considerando o contido no Regimento Interno do CEPSH, **CERTIFICA** que os procedimentos que envolvem seres humanos no projeto de pesquisa abaixo especificado estão de acordo com os princípios estabelecidos pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

**APROVADO****PROCESSO: 15/08 FR- 177162****TÍTULO:** Critérios citomorfológicos para predizer o perfil basal do carcinoma de mama .**AUTORES:** Rozany Mucha Dufloth e Jacy Maria Alves**DEPARTAMENTO:** HU-UFSC**FLORIANÓPOLIS, 10 DE ABRIL DE 2008.**  
\_\_\_\_\_  
Coordenador do CEPSH - Prof.º Washington Portela de Souza

**APÊNDICE 1****L a b o r a t ó r i o M é d i c o<sup>®</sup>****DECLARAÇÃO**

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, objetivando atender as exigências para obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como representante legal da Instituição, tomei conhecimento do projeto de pesquisa "Critérios citomorfológicos para predizer o perfil basal do carcinoma de mama", 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.

Florianópolis, 14 de fevereiro de 2008.

---

Dr. Horácio Shigueru Chikota



## APÊNDICE 2



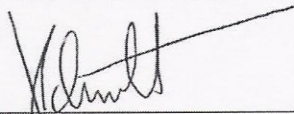
### DECLARAÇÃO

Declaro que no desenvolvimento do projeto de pesquisa intitulado “**Critérios citomorfológicos para prever o perfil basal do carcinoma da mama**”, cumprirei os termos da Resolução CNS 196/96 e suas complementares. Comprometo-me a utilizar os materiais e dados coletados exclusivamente para fins previstos no protocolo e a publicar os resultados seja eles favoráveis ou não. Declaro, ainda, que não há conflitos de interesses entre o/a ( os/as) pesquisado/a ( es/as) e participantes da pesquisa. Aceito as responsabilidades pela condução científica do projeto em questão.

Declaro que faremos uso do material de pesquisa (lâminas e blocos de parafina) somente para os fins previstos neste projeto.

Por fim, atento ao que diz a legislação portuguesa e aos preceitos da ética não se faz necessário que esta pesquisa passe pelo comitê de ética em pesquisa local.

Porto, 10 de Fevereiro de 2008.



---

**Prof. Fernando Schmitt**  
Investigador Sênior do Instituto de Patologia e  
Imunologia Molecular da Universidade do  
Porto (IPATIMUP) – Porto/Portugal

Prof. Fernando Schmitt  
IPATIMUP (<http://www.ipatimup.pt>)  
Rua Dr. Roberto de Frias, s/n  
4200-465, Porto, PORTUGAL  
e-mail: [fernando.schmitt@ipatimup.pt](mailto:fernando.schmitt@ipatimup.pt)  
Tel.: + 351225570700  
Fax.: + 35122557070799

## APÊNDICE 3



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA

Campus Universitário-Trindade-Fpolis/SC - CEP 88040-370  
Fone: (048) 3319473 - Fax: (048) 3319542 - e-mail [deptoptl@ccs.ufsc.br](mailto:deptoptl@ccs.ufsc.br)

---

### DECLARAÇÃO

Declaro para os devidos fins e efeitos legais que, objetivando atender as exigências para obtenção de parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos, e como representante legal da Instituição, tomei conhecimento do projeto de pesquisa “**Critérios citomorfológicos para predizer o perfil basal do carcinoma de mama**”, 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.

Florianópolis, 22 de Fevereiro de 2008.

A handwritten signature in black ink, appearing to read 'Daniella Serafin Couto Vieira', written over a horizontal line.

Dra. Daniella Serafin Couto Vieira  
Chefe do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário

## APÊNDICE 4

### **E-mail de envio do resumo do presente trabalho ao XX Congresso Brasileiro de Citopatologia, XV Congresso Latinoamericano de Citopatologia e Jornada Satélite de Ginetoscopia e e-mail da Comissão Científica do Congresso em resposta**

#### **Comissão Científica XX Congresso Brasileiro de Citopatologia**

Segue em anexo o resumo intitulado "Critérios citológicos para predizer o fenótipo basal do carcinoma de mama" para ser submetido à avaliação para apresentação no Congresso Brasileiro de Citopatologia 2008.

Informações para cadastro de autor:

Nome: Profa. Rozany Mucha Dufloth

e-mail: [rozany.ufsc@gmail.com](mailto:rozany.ufsc@gmail.com)

Telefone: 48 - 8826 3880 ou 48 - 3721 9473

Atenciosamente,

Rozany

**Caro(a) Dr.(a) Rozany Mucha Dufloth,**

Boa noite!

É com satisfação que a Comissão Científica, por meio desta, agradece o seu interesse e empenho em submeter seu resumo de **Pôster e/ou Tema Livre** ao processo de seleção de trabalhos para o **XX Congresso Brasileiro de Citopatologia, XV Congresso Latinoamericano de Citopatologia e Jornada Satélite de Ginetoscopia**, que acontecerá de 01 a 05 de dezembro, no WTC – Hotel são Paulo.

A Comissão de Painéis e Temas Livres, enviará posteriormente ao(à) senhor(a) uma nova circular informando mais detalhes da apresentação do referido painel durante o evento.

Ressaltamos também que a apresentação de Temas Livres, por estar condicionada ao tempo disponível na grade de aulas, reúne um número limitado de trabalhos, muitas vezes não podendo contemplar todos os estudos de interesse ao desenvolvimento científico.

Havendo alguma dúvida ou sugestão, favor entrar em contato com Secretaria Executiva do evento pelo (16) 3512-1111 - site: [www.citopatologia2008.com.br](http://www.citopatologia2008.com.br) ou e-mail: [contato@citopatologia2008.com.br](mailto:contato@citopatologia2008.com.br)