

DANIELLA SERAFIN COUTO VIEIRA

**DESEMPENHO DOS MARCADORES EGFR, CK5, CK14, p63 e
P-caderina PARA IDENTIFICAR O FENÓTIPO BASAL DO
CARCINOMA DE MAMA**

**FLORIANÓPOLIS
2007**

DANIELLA SERAFIN COUTO VIEIRA

**DESEMPENHO DOS MARCADORES EGFR, CK5, CK14, p63 e
P-caderina PARA IDENTIFICAR O FENÓTIPO BASAL DO
CARCINOMA DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Curso de
Mestrado em Ciências Médicas da
Universidade Federal de Santa Catarina,
para obtenção do título de Mestre em
Ciências Médicas.

Coordenadora: Prof^a. Dra. Marcia Margaret Menezes Pizzichini
Orientador: Prof. Dr. João Pércles da Silva Jr.
Co-Orientadora: Prof^a. Dra. Rozany Mucha Dufloth

FLORIANÓPOLIS
2007

***Meu Deus, meu tudo. Muito obrigada pelas bênçãos e graças.
A Maria, com amor, carinho e gratidão.
Ao Tito e ao Gabriel, meus amores, minha família, por terem me estimulado a
nunca desistir do meu sonho de aprender. Vocês são o meu esteio. Deram o
seu tempo, para que eu tivesse tempo. Deixaram o seu lazer para que eu
tivesse o meu. Deram seu carinho e amor para que eu tivesse forças.
Aos meus pais, por terem acreditado em mim, e me ensinado a continuar,
mesmo com os percalços da vida. Minha mãe, Salete, modelo de mulher, forte,
guerreira, sensível e humilde. Aprendi muito com a sua bondade e caridade.
Meu pai, Antonio Carlos, homem virtuoso, a quem amo e admiro, e que correu
todos os riscos pela felicidade da nossa família.***

AGRADECIMENTOS

Nossos agradecimentos aos orientadores. Prof. Dr. João Péricles da Silva Jr, obrigada pela confiança e amizade, e por me aceitar como sua orientanda. Professora Dra. Rozany Mucha Duflath, minha querida, agradeço pela sua amizade, pela sua sabedoria, pela sua generosidade e principalmente pelos seus ensinamentos e sua doação. Passamos vários momentos juntas, alguns deles difíceis, mas sem eles jamais teria tido a real proporção da grande tarefa a que me propus. Seus princípios estarão sempre no meu pensamento, para que um dia eu também possa ensinar. Muito obrigada.

Ao Grupo de Patologia Mamária do Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto pelo apoio e estímulo. Com especial agradecimento ao Prof. Dr. Fernando Carlos de Landér Schmitt.

Sinceros agradecimentos a Nair Lopes, Bárbara Souza, Angélica Bertagnolli, Angélica Costa Ramos pela amizade e carinho, durante o período em que eu estive em Portugal, bem como pelo apoio e valiosa colaboração na realização deste estudo. Nunca esquecerei.

Agradeço ao Prof. Dr. Luiz Carlos Zeferino (Unicamp), pela ajuda inestimável, fundamental para a conclusão deste trabalho. Obrigada pela oportunidade de conhecê-lo e constatar o grande profissional, com valores humanos e um inequívoco senso de respeito e zelo para com todas as pessoas. Minha sincera admiração.

Agradeço aos docentes e aos funcionários do Departamento de Patologia, em especial, à Vânia Regina Cardoso da Silva, e às Professoras Maria Beatriz Cacesse Shiozawa, Irene Vieira Souza e Alcíbia Helena de Azevedo Maia, pela ajuda e atenção durante o último ano.

A todos os funcionários e médicos do Serviço de Anatomia Patológica, em particular à Dra. Lee I Ching e à Dra. Gabriella Di Giunta, agradeço pelo apoio e compreensão.

Às minhas queridas Eliane, Eliete e Alessandra, que com profissionalismo, doação e principalmente amizade, permitiram o início de tudo. A vocês, meu eterno agradecimento e reconhecimento pelo bem que me fizeram.

Agradeço a todos os amigos, em especial ao querido Luiz Henrique Prazeres e ao Prof. Dr. Armando José d'Acampora, pelo grande incentivo.

Agradeço aos colaboradores do mestrado, Ivo Soares e Simone Nunes, pelo auxílio e apoio constante ao longo de todo o curso.

Querida Tânia Regina Tavares, agradeço por toda dedicação e carinho, és uma mulher muito prestativa e com grandes valores.

Aos amigos do IDAP (Instituto de Diagnóstico Anátomo Patológico): Dr. José Bastos, Nilva, Manuel, Célio, Luciene e Heráclito. Foram tantos anos de trabalho juntos, com muitas conquistas e transformações. Não esquecerei vocês.

Estimada Família Mansur, representada pelo Sr. Alfredo, D. Eunice, Fernando e Paulo, muito obrigado por me receberem em seu lar. Foi muito importante ver o amor e o carinho de uma família especial enquanto passei pelos momentos mais pesados durante a fase de conclusão do trabalho. Nunca esquecerei vocês. Muito obrigada.

Agradeço ainda a Catarina Lucia Pereira (querida Nina) e a toda minha família, especialmente as minhas irmãs, (Giovanna, Sophia e Isabella) e meus cunhados (Tasca, Menegon e Fabrício) pelo incentivo, carinho e amor, mesmo no silêncio.

... Isabella, minha amada, não desista de seus sonhos! Nunca! Você é muito especial. Obrigada pela ajuda e paciência durante todo o meu estudo.

“Sem sonhos, as perdas se tornam insuportáveis, as pedras do caminho se tornam montanhas, os fracassos se transformam em golpes fatais.

Mas, se você tiver grandes sonhos ... seus erros produzirão crescimento, seus desafios produzirão oportunidades, seus medos produzirão coragem.

Por isso, meu ardente desejo é que você NUNCA DESISTA DOS SEUS SONHOS.”

Augusto Cury

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

AFIP	<i>Armed Forces Institute of Pathology</i>
BRCA1	<i>Breast Cancer 1 Gene</i>
CAGIMA	Grupo de Pesquisa CNPq – câncer ginecológico e mamário
c- erbB1	Fator de crescimento epidérmico humano 1
c- erbB2	Fator de crescimento epidérmico humano 2
c- erbB3	Fator de crescimento epidérmico humano 3
c- erbB4	Fator de crescimento epidérmico humano 4
CISH	Hibridização Cromogênica <i>in situ</i>
CK	Citoqueratina
c - DNA	DNA complementar
DNA	Ácido Desoxirribonucléico
DAB	<i>Diaminobenzidine</i>
e- caderina	<i>Epithelial caderina</i>
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
FISH	Hibridização Fluorescente <i>in situ</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HER1	<i>Human epithelial receptor 1</i>
HER2	<i>Human epithelial receptor 2</i>
HER3	<i>Human epithelial receptor 3</i>
HER4	<i>Human epithelial receptor 4</i>
HU	Hospital Universitário
IC 95%	Intervalo de Confiança a 95%
IHQ	Imunoistoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IPATIMUP	Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto
µm	micra
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	p valor
P53	Gene que codifica fosfoproteína de 53kDa
p53	Proteína do gene P53
p63	Proteína do gene P63
p73	Proteína do gene P73
P- caderina	<i>Placental caderina</i>
RE	Receptor de estrógeno
RH	Receptor hormonal
RNA-ISH	Hibridização <i>in situ</i> do RNA
RP	Receptor de progesterona
SAME	Serviço de Arquivo Médico
SAP	Serviço de Anatomia Patológica
SAS	<i>Statistical Analysis System</i>
TMA	<i>Tissue Microarray</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

RESUMO	ix
ABSTRACT	x
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Considerações gerais	1
1.2. Perfil molecular de expressão no carcinoma de mama	2
1.3. Carcinoma da mama: diagnóstico baseado em técnicas moleculares	5
1.4. Marcadores imunoistoquímicos utilizados em carcinoma de mama	7
1.5. Aspectos histopatológicos	12
1.6. Considerações finais	14
2. OBJETIVOS	16
2.1. Objetivo Geral	16
2.2. Objetivos Específicos	16
3. SUJEITOS E MÉTODOS	17
3.1. Desenho do estudo	17
3.2. Seleção de sujeitos e tamanho da amostra	17
3.3. Variáveis e conceitos	19
3.4. Descrição dos procedimentos técnicos (IPATIMUP)	22
3.5. Coleta de dados	26
3.6. Análise dos dados	26
3.7. Aspectos éticos	27
4. RESULTADOS	28
5. DISCUSSÃO	38
6. CONCLUSÃO	42
7. REFERÊNCIAS	46
8. NORMAS ADOTADAS	58
APÊNDICES	59
ANEXOS	62

RESUMO

INTRODUÇÃO: Os estudos dos perfis de expressão gênica dos carcinomas de mama identificaram um subtipo de tumor com pior prognóstico denominado subtipo basal. Tais tumores são caracterizados por apresentarem negatividade para receptor de estrógeno e HER2, muito embora ainda não estejam bem caracterizadas quais as proteínas que poderiam ser bons marcadores para distinguir este subtipo de carcinoma.

OBJETIVO: Avaliar o desempenho da expressão das proteínas EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina, para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama. Secundariamente, analisar as características morfológicas dos subtipos do carcinoma de mama.

MÉTODOS: Este estudo do tipo validação de teste diagnóstico foi constituído por 121 espécimes de carcinoma de mama, conservados em blocos de parafina, selecionados consecutivamente no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, entre janeiro de 1994 a dezembro de 2004. Dos blocos doadores, foram extraídos dois cilindros de 2 mm de diâmetro e depositados nos blocos de parafina receptores, usando a técnica de *Tissue Microarray* (Abcam ® Cambridge, UK). Nestes cortes foi feita a pesquisa dos marcadores de diferenciação do fenótipo basal através de imunohistoquímica.

RESULTADOS: O carcinoma de mama do subtipo basal mostrou diferenças específicas dos subtipos não basais: alto grau (grau III) ($p < 0,0001$), RE e HER2 negativos ($p < 0,0001$) e ($p < 0,0001$), e os marcadores basais CK5 ($p < 0,0001$) e CK14 ($p < 0,0001$) foram os que apresentaram melhor desempenho para identificar o fenótipo basal. Em todos os casos do subtipo não basal, a CK14 foi negativa ($p < 0,0001$). O EGFR contribuiu para distinguir os verdadeiros casos negativos do fenótipo não-basal ($p = 0,0414$).

CONCLUSÃO: O presente estudo revelou que os marcadores do fenótipo basal CK5 e CK14 demonstraram um bom desempenho para distinguir o subtipo basal dos não basais, destes, o CK14 apresentou o melhor valor preditivo positivo (100%).

ABSTRACT

INTRODUCTION: Gene expression profiles in breast cancer have identified a tumour subtype with worse prognosis entitled basal-like type. These tumours are characterized by their negativity for oestrogen receptor and HER2, although good protein markers of this type of carcinoma have not yet been identified.

AIM: To assess the performance of expression of the following proteins: EGFR, CK5, CK14, p63 and P-cadherin, in order to identify the basal phenotype of breast carcinomas. Afterwards, morphological features of the breast cancer subtypes were evaluated.

METHODS: This validation of the diagnosis test study encompassed 121 paraffin-embedded breast carcinoma samples, consecutively selected in the Pathological Anatomy Service in University Hospital of the Federal University of Santa Catarina between 1994 and 2004. Two cores of 2mm in diameter were extracted from the donor blocks and placed in the receptor blocks, using the Tissue Microarray technique (Abcam ® Cambridge, UK). The search for the basal phenotype differentiation markers was performed on the slides using immunohistochemistry, after the blocks were cut.

RESULTS: Basal like breast carcinomas have shown significant differences from the non-basal subtypes: high grade (grade III) ($p < 0,0001$), ER and HER2 negative ($p < 0,0001$) and ($p < 0,0001$), and the basal markers CK5 ($p < 0,0001$) and CK14 ($p < 0,0001$) were the ones which displayed a better performance in the identification of the basal phenotype. EGFR contributed to the distinction of the non-basal truly negative cases ($p = 0,0414$).

CONCLUSIONS: This study demonstrated that CK5 and CK14 are good markers to distinguish the basal subtype from the non-basal tumours. Among the molecules tested, CK14 displayed the best positive predictive value (100%).

1. INTRODUÇÃO

O carcinoma de mama é a neoplasia maligna mais freqüente em mulheres ^{1,2}, com incidência mundial crescente ³. No ano 2000 foram registrados 1.050.000 casos, expressando 22% de todos os casos de carcinoma no contexto mundial ^{3,4,5,6,7}.

No Brasil, a incidência do carcinoma de mama é semelhante à dos países desenvolvidos, porém apresenta variações de acordo com as regiões do país ⁸. Neste contexto, no estado de Santa Catarina e na cidade de Florianópolis este carcinoma tem sido o mais freqüente nos últimos anos ⁹. Em 2006, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), foram registrados 1.610 novos casos, destes, 140 novos casos foram diagnosticados em Florianópolis ⁹.

1.1. Considerações Gerais

O carcinoma de mama é uma doença complexa apresentando padrões histopatológicos diversos, com desfechos clínicos diferentes e variações de respostas ao tratamento ^{10, 11}. Em se tratando de uma doença multifatorial, existe uma forte relação entre fatores genéticos e não genéticos, com acúmulo de numerosas e freqüentemente desconhecidas alterações moleculares, que levam à proliferação celular, instabilidade genética e aquisição de um fenótipo resistente e invasivo ¹². As mudanças nas atividades dos genes alcançam o ambiente interno e a vizinhança das células tumorais e a combinação entre os fatores exógenos com variações genéticas inatas do indivíduo constituem a causa para a manifestação tumoral através de diferentes fenótipos ¹³.

Um dos maiores desafios para o estudo da carcinogênese mamária, conforme as atuais classificações dos perfis de expressão gênica, inicialmente propostos pelo grupo de Stanford ¹⁴, seria identificar marcadores específicos que pudessem prever quais os tumores de mama com pior prognóstico.

1.2. Perfil Molecular de Expressão no Carcinoma de Mama

Desde o início desta década, o estudo do perfil molecular do carcinoma de mama vem mostrando um importante avanço a partir da identificação dos perfis de expressão gênica propostos por Perou *et al*¹⁴, que foram baseados em estudos com *cDNA microarrays*.

Neste trabalho pioneiro, os autores estudaram uma plataforma de mais de 8.000 genes humanos, pertencentes a 42 pacientes, e conseguiram definir perfis de expressão diferentes para os carcinomas de mama¹⁴.

O primeiro nível de classificação separou tumores negativos para o receptor de estrógeno (RE) e tumores positivos para a expressão deste receptor¹⁴. Subseqüentes análises mais refinadas foram realizadas em modelos propostos por vários pesquisadores¹⁵⁻¹⁹.

A rigor, correlacionando os subtipos de carcinoma de mama com parâmetros clínicos relevantes, como o tempo de sobrevida e o tempo livre de doença destas mulheres, foi possível distinguir os atuais conceitos em que se baseia a classificação molecular^{11, 14, 15, 20, 21}, a saber:

- **Luminal A** (fenótipos RE positivo/HER2 negativo): Foi caracterizado pela elevada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas (CK) 7, 8, 18 e 19. A este fenótipo está associada a assinatura de melhor prognóstico, e não se verifica expressão aumentada de HER2¹⁴. A maioria dos carcinomas não relacionados a mutações genéticas, são caracterizados por este perfil²².

- **Luminal B** (fenótipos RE positivo/HER2 positivo): Foi caracterizado por baixa ou moderada expressão de genes expressos pelas células epiteliais luminais, como, por exemplo, as citoqueratinas (CK) 7, 8, 18 e 19. A este fenótipo está associada à assinatura de pior prognóstico, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, por apresentar possíveis similaridades com os tumores RE negativos (subtipo Superexpressão do HER2 e Basal)^{11, 21}. Provavelmente, este perfil esteja ligado a mutações genéticas¹¹.

- **Superexpressão do HER2** (fenótipos RE negativo/HER2 positivo): Foi caracterizado pela expressão aumentada de vários genes expressos nas células progenitoras ¹¹. A amplificação do oncogene HER2, e concomitantemente a superexpressão de sua proteína, é atualmente implicada como um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama ^{23, 24}. Provavelmente, este perfil também não esteja relacionado a mutações genéticas ^{15, 25}.

- **Basal** (fenótipos RE negativo/HER2 negativo): Foi caracterizado pela expressão de vários genes expressos nas células progenitoras ou células basais/mioepiteliais ¹¹. De acordo com as mais recentes publicações, este fenótipo mostra positividade para CK5/6, CK14, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), P-caderina, p63 e CK17 que são proteínas expressas nas células basais/mioepiteliais, e nosso grupo tem dado especial atenção ao estudo do perfil basal de carcinoma de mama ^{10, 15, 20, 21, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32}. Este perfil está ligado a mutações genéticas ¹¹, e é um dos mais intrigantes subtipos tumorais, pois tem associação com pior prognóstico ²⁷ e não possui um alvo terapêutico definido como os outros subtipos ³³. Portanto, não responde ao tratamento com drogas anti-estrogênicas nem com o anticorpo monoclonal anti-HER2 denominado *trastuzumab* ^{10, 22, 24, 34}.

- **Normal Breast-Like**: Último grupo identificado por Perou *et al* ¹⁴, através do aumento da expressão de muitos genes conhecidos por serem expressos pelo tecido adiposo e por outros tipos de células não epiteliais. Estes tumores também mostraram forte expressão para genes epiteliais basais e baixa expressão para genes do epitélio luminal ¹⁴. Apesar disso, atualmente ainda não está clara sua distinção e seu valor clínico ¹¹.

Atualmente, um dos objetivos da investigação molecular do carcinoma de mama é saber se os tumores com perfil basal surgem de uma célula basal, e assim buscar melhorar a terapia, utilizando marcadores destas células como proteínas-alvo ²². O principal interesse em caracterizar os níveis de expressão gênica do carcinoma de mama está na determinação do subtipo basal por meio da verificação das citoqueratinas basais (CK5, CK6, CK14 e CK17) ^{15, 21, 28}, EGFR, p-63 e P-caderina ^{10, 27}. A importância e a grande atenção neste subtipo de carcinoma de mama vem aumentando nos últimos anos devido à freqüente demonstração com um pior desfecho e menor sobrevida livre de doença para as pacientes ^{20, 21, 26}.

Em recente revisão, Sorlie ¹¹ investigou se os diferentes subtipos do carcinoma de mama poderiam representar grupos clinicamente distintos, utilizando para tanto análise univariada, comparando com a sobrevida global e a sobrevida livre de doença. A curva de Kaplan-Meier, baseada em quatro subtipos (excluindo o Normal *Breast-Like*) mostrou diferenças altamente significantes na sobrevida global entre as pacientes de subclasses diferentes ¹¹.

Resultados intrigantes foram observados no subtipo Luminal, revelando diferentes desfechos. A observação entre o Luminal A e Luminal B, evidenciou que o subtipo Luminal B pode representar um grupo clinicamente distinto com pior curso da doença, sendo particularmente relacionado à recidiva tumoral, provavelmente por similaridades deste grupo com os tumores RE negativos (subtipo Basal e o Superexpressão do HER2) ¹¹. Este subtipo pode refletir o grupo de pacientes que não se beneficiam com o uso de tamoxifen adjuvante, mesmo com valores de receptor de estrógeno positivo ¹¹.

Em 2006, Sorlie *et al* ³⁵, validaram e caracterizaram os dois principais subtipos do carcinoma de mama, previamente definidos como clinicamente relevantes (subtipo Luminal A e Basal), em amostras de carcinoma de mama em estágios iniciais, utilizando três diferentes plataformas em DNA *microarray* ³⁵. A caracterização destes dois subtipos revelou que mecanismos distintos podem ser pré-programados, em estágios iniciais, nestes diferentes subtipos da doença. Os resultados observados produziram maiores evidências que tais subtipos representam entidades biologicamente distintas, e que podem necessitar de estratégias terapêuticas diferentes ³⁵.

1.3. Carcinoma de Mama: Diagnóstico Baseado em Técnicas Moleculares

A genética do câncer tem sofrido grandes modificações através do emergente campo dos genomas e dos recentes avanços nas técnicas utilizadas para determinar o perfil molecular, revolucionando e influenciando uma possível transformação da prática clínica ¹¹.

Recentes tecnologias aplicadas nos estudos de DNA, RNA, do perfil das proteínas, e da distribuição do genoma, podem ser usadas para retratar um fenótipo mais preciso do tumor ¹¹. Neste contexto, a caracterização sistemática e detalhada dos tumores em uma escala genômica pode ser correlacionada com informações clínicas, contribuindo, desta forma, para aumentar o entendimento das causas e progressões do câncer, assim como permite capacitar a descoberta de novos marcadores moleculares, possibilitando as intervenções terapêuticas ¹¹.

Com base nestes conhecimentos atuais, cabe ressaltar que as diversas entidades coletivamente chamadas de “câncer” têm em comum a origem, já que resultam do acúmulo de mutações, instabilidades cromossômicas e alterações epigenéticas ¹¹. Juntas, elas promovem um aumento da taxa de proliferação e do dano celular, que prejudicam progressivamente o detalhado e complexo sistema de regulação do crescimento e da morte celular ^{11,13}.

1.3.1. DNA *microarray*

Estudos com DNA *microarray* foram descritos pela primeira vez por Schena *et al* ³⁶ em 1995 e demonstraram o poder da hibridização em uma escala genômica, a partir de um sistema com alta capacidade para monitorar a expressão de muitos genes ³⁶. Para determinar o perfil de expressão gênica utilizando este método, são empregados polímeros de ácido nucléico imobilizados em uma superfície sólida, como pontos de DNA (chamados de probes) para sequenciar os genes ³⁷. Os probes podem ser pequenos oligonucleotídeos, *c-DNA* ou seqüências genômicas ³⁸. A

técnica mede o rendimento da expressão gênica em milhares de genes simultaneamente e pode ser empregada em um grande número de amostras dispostas paralelamente ³⁷. Os resultados podem ser utilizados para aprimorar o diagnóstico e a classificação molecular dos tumores ^{15, 39, 40}, estimar a probabilidade de metástases ⁴¹ e prever a resposta à quimioterapia combinada ⁴².

Neste sentido, salienta-se que, com o desenvolvimento de métodos com alta tecnologia, como o *c-DNA microarray*, e com o esclarecimento da estrutura da seqüência do DNA humano, ocorreram grandes mudanças estratégicas nas pesquisas relacionadas ao câncer ¹², tornando possível a análise da expressão do genoma, ao medir níveis de expressão de milhares de genes ao mesmo tempo, contrastando com a abordagem clássica gene a gene ⁴³.

Particularmente, ferramentas genômicas, como o DNA *microarrays*, possuem um grande potencial para decifrar os padrões moleculares dos tumores e para identificar novos e melhores marcadores clínicos ³⁵. Deste modo, a análise dos padrões de expressão gênica de milhares de genes usando DNA *microarrays* tem demonstrado a grande diversidade entre os tumores que têm uma aparente semelhança histopatológica ³⁵. Para validar os achados desta técnica molecular (*c-DNA microarray*) nos carcinomas de mama, tem sido utilizada a técnica denominada *Tissue Microarray* (TMA) ^{33, 44}.

1.3.2. *Tissue Microarray* (TMA)

Esta técnica (TMA) foi descrita pela primeira vez em 1998, causando uma evolução na trajetória da pesquisa na área de ciências biomédicas ⁴⁵. A sua utilização possibilitou validar novos marcadores tumorais ⁴⁵, correlacionar os resultados com a aplicação terapêutica ⁴⁶ e, conseqüentemente avaliar alvos moleculares em um grande número de amostras paralelas de tumor, num mesmo período de tempo ^{12, 33, 47, 48}. O campo de aplicação do TMA é muito amplo, e sua principal utilização é em pesquisas que necessitam analisar tecidos com técnicas *in situ*, como a imunohistoquímica (IHQ), a hibridização do RNA *in situ* (RNA-ISH) e a

hibridização fluorescente *in situ* (FISH), que são excelentes para o estudo de epidemiologia molecular ¹².

A análise de tecidos em grande escala tem custo elevado e é lenta e problemática quando métodos tradicionais de patologia são utilizados ¹². Desta maneira, o TMA permitiu a realização de experimentos nas mesmas condições técnicas com economia de tempo e de recursos ^{47, 48}.

1.4. Marcadores Imunoistoquímicos Utilizados em Carcinoma de Mama

Tradicionalmente, a imunoistoquímica (IHQ) é um dos principais métodos para determinar o perfil de expressão protéica em anatomia patológica ⁴⁹. A maioria dos marcadores utilizados na IHQ tem um papel bem estabelecido, ou presumido, ou ainda representam proteínas das quais a transcrição foi discriminada em estudos prévios de perfil gênico ³³. Sua caracterização na discriminação das proteínas pode fornecer novos marcadores úteis para análise, diagnóstico, prognóstico e monitoramento do câncer, e ajudará a desenvolver novos alvos moleculares para as drogas anti-tumorais ³³.

1.4.1. Receptores Hormonais

Os receptores hormonais (RH) são proteínas que se ligam aos hormônios circulantes, mediando os seus efeitos celulares ⁵⁰. Os mais estudados em carcinoma de mama são os receptores de estrógeno (RE) e os receptores de progesterona (RP) ⁵⁰.

Há mais de um século se conhece a associação do carcinoma de mama com os receptores de estrógeno ^{51, 52}, e durante décadas a análise de receptores hormonais foi realizada através de métodos bioquímicos ⁵³.

Avanços na técnica para detecção dos receptores hormonais possibilitaram a determinação mediante a realização de imunistoquímica ⁵⁴⁻⁵⁶. A descoberta dos receptores de estrógeno forneceu um poderoso marcador preditivo e prognóstico, e um eficiente alvo para o tratamento dos casos de carcinoma hormônio-dependente, com o uso de drogas antiestrogênicas ⁵².

Sommer e Fuqua ⁵² focalizaram a ação dos receptores de estrógeno em relação ao carcinoma de mama, delineando o importante papel dos receptores hormonais no desenvolvimento, progressão e tratamento da doença ⁵².

Tumores com receptor de estrógeno positivo, hormônio dependente apresentam melhor resposta à terapia anti-hormonal e podem ser tratados com tamoxifen ou com outras drogas alternativas que afetam a ação do estrógeno ⁵⁷. Contudo, alguns carcinomas de mama são ou podem tornar-se resistentes à terapia hormonal, mesmo que nestes casos expressem o receptor de estrógeno positivo ⁵⁷.

1.4.2. Fator de Crescimento Epidérmico

A família de receptores conhecidos como “fator de crescimento epidérmico”, é constituída por quatro receptores da tirosina-kinase, que são o receptor do fator do crescimento epidérmico (EGFR/HER1/c-erbB1), o receptor do fator de crescimento epidérmico humano (HER2/c-erbB2), o HER3 (c-erbB3) e o HER4 (c-erbB4) ⁵⁸.

1.4.2.1. EGFR (HER1/c-erbB1)

O gene do EGFR está localizado no cromossomo 7p11.2-p12 e compreende 28 exons ⁵⁹. Foi o primeiro receptor transmembrana a ser ligado diretamente com o câncer em humanos ⁵⁹. A amplificação deste gene tem sido descrita em diferentes tumores, principalmente no do sistema nervoso central, pulmão e estômago ^{49, 60-64}.

Recentemente, a expressão da proteína do EGFR foi descrita nos carcinomas de mama ^{58, 65-67}, sobretudo em um tipo especial de tumor relacionado ao fenótipo basal denominado carcinoma metaplásico, que embora seja menos freqüente (3,7% de todos os carcinomas da mama), encontra-se inserido na via de diferenciação da célula progenitora/mioepitelial da carcinogênese mamária ^{68 - 74}. Os carcinomas metaplásicos de mama são tumores de subtipo basal que apresentam superexpressão da proteína e amplificação do gene do EGFR (HER1/c-erbB1), e não exibem do HER2/c-erbB2, em análises de hibridização *in situ* cromogênica (CISH) e na imunoistoquímica ^{58, 68}.

1.4.2.2. HER2

O gene HER2 está localizado no cromossomo 17q21, sendo homólogo, porém distinto do receptor do fator do crescimento epidérmico (EGFR) e é codificado por uma proteína transmembrana que possui uma atividade de tirosina-kinase intracelular ^{75 - 80}.

A amplificação e a superexpressão do referido gene ocorrem em aproximadamente 15% dos carcinomas de mama ^{32, 81}, e foram relacionadas com maior agressividade da doença através da apresentação de menor tempo livre de doença e da sobrevida global, nas mulheres com esta alteração ^{75, 76, 78, 80}.

A amplificação do oncogene HER2 e concomitantemente a superexpressão de sua proteína é atualmente implicada como um importante biomarcador de prognóstico no carcinoma de mama ^{23, 24}. A importância clínica do diagnóstico do HER2 está associada com o desenvolvimento de uma droga anti-tumoral denominada *trastuzumab* (*Herceptin, Roche Ltd, Basel, Switzerland*), que é um anticorpo monoclonal humanizado que atua contra a porção extracelular do produto protéico do HER2 ^{10, 22, 24, 34}.

A grande maioria dos estudos relacionados ao HER2 se vale da imunoistoquímica para detectar a sua superexpressão protéica na membrana celular

⁸². Sem a amplificação deste oncogene, a expressão protéica é baixa e indetectável por tal método ⁸². Além disso, este método está sujeito a artefatos técnicos e diferenças de sensibilidade entre diferentes anticorpos e os tecidos pré-tratados ⁸². Por esta razão, métodos que avaliam a amplificação do gene parecem ser mais específicos ⁸². As duas principais técnicas utilizadas para esta avaliação são: a Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH) ⁸³ e a Hibridização Cromogênica *in situ* (CISH) ⁴⁹.

1.4.3. Marcadores de Células Basais

1.4.3.1. Citoqueratinas

As citoqueratinas (CK) são proteínas dos filamentos intermediários codificados por genes *KRT* que estão agrupadas em regiões do braço do cromossomo 12q (*KRT* 1-8) e 17q (*KRT* 9-25) ⁸⁴.

Estas proteínas podem ser distinguidas de duas formas, pela massa molecular em baixo peso e alto peso, e pelo ponto de vista isoelétrico, dividido pelo tipo I ácido (CK 10-20) e tipo II básico (CK1-9) ⁸⁴.

As CK são empregadas como marcadores específicos para diferenciar os tipos de células epiteliais, e estão sendo atualmente utilizadas com grande interesse para marcar as células da glândula mamária ^{29, 30, 84}.

Sabe-se que os anticorpos para citoqueratinas do tipo II (CK5 e 6) e do tipo I (CK14) coram as células basais e/ou mioepiteliais, ao passo que os anticorpos para citoqueratinas do tipo II (CK7 e 8) e do tipo I (CK 18 e 19) se associam com as células epiteliais luminais/glandulares ³⁰.

Os padrões de expressão das CK são conservados durante a oncogênese, desta forma, carcinomas de mama podem ser classificados de acordo com a expressão das suas citoqueratinas ⁸⁴.

1.4.3.2. Caderinas

As caderinas são uma superfamília de moléculas de adesão dependentes de cálcio e tem um importante papel na determinação do fenótipo epitelial, na migração e na diferenciação celular e na disseminação tumoral ⁸⁵.

As duas caderinas clássicas, E-(epitelial) e P-(placentária), encontram-se preferencialmente localizadas nas junções intercelulares, são do tipo aderente e têm uma estrutura básica comum, todavia com diferentes pesos moleculares, especificidade de ligação e distribuição tecidual ⁸⁵.

Na mama, a P-caderina é expressa nas células mioepiteliais e nas *cap cells*, putativas células-tronco da glândula mamária, enquanto que a E-caderina é expressa nas células mioepiteliais/basais e nas luminais ⁸⁶. Estas moléculas desempenham importantes papéis na determinação do fenótipo epitelial, na migração e diferenciação celular e na disseminação tumoral ⁸⁵.

Paredes *et al*, estudaram a P-caderina e sugeriram sua expressão num grupo de carcinomas de mama predominantemente de alto grau (GIII), receptor de estrógeno negativo, com níveis de proliferação mais elevados e com um comportamento mais agressivo ⁸⁵.

1.4.3.3. p63

O gene *TP63* decodifica pelo menos seis distintas isoformas, sendo que uma delas (Δ Np63) é expressa na população celular basal do epitélio, e é necessária para a manutenção da população somática basal ²⁸.

A proteína p63 é um fator de transcrição nuclear homólogo da p53, necessário para o desenvolvimento da mama, como mostrado em estudos experimentais com camundongos knockout ⁸⁷.

Esta proteína é expressa nas células basais/mioepiteliais do epitélio da mama ²⁸, e está relacionada com tumores do subtipo basal ²⁷.

1.5. Aspectos Histopatológicos

Apesar dos avanços nas pesquisas relacionadas aos métodos de diagnóstico utilizando a biologia molecular para a determinação de marcadores de expressão protéica, os fatores prognósticos tradicionais (tamanho tumoral, condição dos linfonodos e os parâmetros histopatológicos) ainda são observados rotineiramente.

Até o final da década passada, os fatores de prognóstico determinados no exame anátomo-patológico clássico tinham uma grande importância principalmente devido à maior tendência à conservação da mama nas cirurgias e à demonstração da eficácia do tratamento de quimioterapia no carcinoma de mama disseminado ⁵¹. Além disso, a determinação de componentes morfológicos possibilitava distinguir o carcinoma e correlacionar com determinantes de prognóstico ⁵¹.

Entretanto, em 1999, o Colégio Americano de Patologistas reuniu-se com um grupo multidisciplinar e avaliou os fatores prognósticos e preditivos da resposta terapêutica no carcinoma de mama ^{8, 88}. No consenso, publicado em julho de 2000, foi determinada a estratificação destes fatores em três categorias: categoria I são fatores já comprovados de importância prognóstica e úteis no tratamento clínico das pacientes; categoria II são os fatores extensamente estudados biológica e clinicamente, mas cuja importância necessita ser validada em estudos estatisticamente fortes; e a categoria III engloba todos os outros fatores que não foram estudados suficientemente para demonstrarem o seu valor prognóstico ^{8, 88}.

Deste modo, os fatores de prognóstico são determinados pelas características clínicas das pacientes e pelos aspectos patológicos/biológicos dos tumores, que permitem prever a evolução clínica da doença ou a sobrevivência da paciente no momento do diagnóstico inicial ⁸⁹. Por outro lado, os fatores preditivos são as características clínicas, patológicas e biológicas utilizadas para estimar a probabilidade de resposta do tumor a um tipo específico de terapia adjuvante ⁸⁹.

Dados publicados no consenso mostram que o envolvimento do linfonodo loco-regional por metástase de carcinoma de mama é um dos mais importantes fatores de prognóstico, capaz de prever a sobrevivência livre de doença e a sobrevivência global em carcinoma de mama ^{90, 91}. Somente 20-30% das pacientes com linfonodo

negativo poderão desenvolver recorrência da doença em 10 anos, comparado com cerca de 70% das pacientes com envolvimento axilar⁸⁸.

Em relação ao tamanho tumoral, este, é considerado um fator de prognóstico tempo dependente⁹², pois o componente invasivo do carcinoma de mama, identificado microscopicamente, é o melhor determinante preditivo do comprometimento linfonodal que o tamanho total do tumor (componente *in situ* e componente invasivo), uma vez que, somente o componente invasivo reflete a capacidade metastática do carcinoma⁵¹.

Quanto à graduação histológica, foi recomendada pelo protocolo do Colégio Americano de Patologistas a utilização do Sistema de Graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificada por Elston e Ellis, o qual emprega a graduação histológica combinada de Nottingham^{93, 94}.

Salienta-se que os carcinomas invasivos de mama, com exceção do carcinoma medular devem ser graduados e o sistema de graduação utilizado deve ser especificado no laudo anátomo patológico⁵¹.

Para a classificação dos carcinomas de mama, o protocolo do Colégio Americano de Patologistas preconizou ainda a utilização da classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS), não excluindo, contudo, o uso de outras classificações, tais como a publicada pelo Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP)^{95, 96}.

1.6. Considerações Finais

Em resumo, até o final da década passada, as pacientes que tinham o diagnóstico de carcinoma de mama eram tratados como doenças semelhantes, baseados principalmente numa classificação morfológica que impossibilitava justificar por que os casos com o mesmo diagnóstico e estadió podiam ter desfechos clínicos marcadamente diferentes.

As deficiências na investigação dos diferentes tipos tumorais, como doenças distintas, podem ser explicadas pelas presumíveis limitações da classificação vigente que utilizava somente critérios clínicos e morfológicos.

Hoje em dia, ninguém duvida da importância dos estudos do grupo de Stanford ¹⁴, que baseado em estudos com *cDNA microarrays*, impulsionou a classificação dos carcinomas de mama ao introduzir conhecimentos sobre o perfil molecular.

Porém, atualmente são descritos muitos marcadores de células basais, com diferenças na sensibilidade. Desta forma, mais estudos são necessários para categorizar o valor do desempenho dos marcadores de células basais para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama e orientar a conduta clínica destes pacientes.

Assim, um dos maiores desafios dos pesquisadores é melhorar os diagnósticos para direcionar condutas terapêuticas mais individualizadas, especialmente às pacientes com perfil basal, que estão relacionadas com um pior prognóstico e com um curso da doença mais agressivo, sem resposta à terapia utilizada.

Para tanto, optou-se por realizar o presente estudo para analisar o desempenho dos marcadores de células basais (EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina), para identificar o fenótipo basal e comparar com características morfológicas.

O emprego da técnica do TMA deveu-se para que todos os experimentos fossem realizados nas mesmas condições técnicas com economia de tempo e de recursos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o desempenho da expressão das proteínas EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina, para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama, através da técnica de *tissue microarrays*. Secundariamente, foram analisadas características morfológicas dos subtipos do carcinoma de mama.

2.2. Objetivos Específicos

1. Calcular a frequência dos subtipos do carcinoma de mama com base na classificação molecular.
2. Calcular a frequência da expressão das proteínas EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina com o fenótipo basal e não basal do carcinoma de mama.
3. Calcular a sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo e valor preditivo negativo da expressão das proteínas EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama.
4. Analisar a associação das características morfológicas com os fenótipos do carcinoma de mama.

3. SUJEITOS E MÉTODOS

3.1. Desenho do Estudo

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

3.2. Seleção de Sujeitos e Tamanho da Amostra

O tamanho amostral foi de 196 mulheres, selecionadas consecutivamente e que tiveram diagnóstico de carcinoma de mama no Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário (HU) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), no período de janeiro de 1994 a dezembro de 2004.

Todos os registros médicos das mulheres que foram submetidas a procedimentos cirúrgicos na mama e cujo material foi enviado ao SAP foram vistos pela mestrandia. Foram selecionadas mulheres admitidas no estudo por apresentarem no registro médico o diagnóstico de carcinoma de mama.

Para isso, foram revistos e separados para o presente estudo os laudos anátomo-patológicos, lâminas e respectivos blocos de parafina contendo material de carcinoma de mama e que estavam arquivados no SAP. Além disso, foram revistos todos os prontuários médicos, no Serviço de Arquivo Médico (SAME) do HU, das mulheres incluídas no estudo.

3.2.1. Critérios de inclusão:

- Mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma de mama.

3.2.2. Critérios de exclusão:

- Casos cujo material não foi encontrado ou não apresentou condições para a avaliação da expressão das proteínas através do método imunohistoquímico e casos que não continham os dados clínicos no prontuário médico.
- Casos com diagnóstico anátomo-patológico de carcinoma medular, porque este subtipo especial de carcinoma de mama faz parte da maioria dos casos do subtipo do fenótipo basal do carcinoma de mama⁹⁷.

Portanto, foram obtidos inicialmente 196 casos, em que foram excluídos 75 casos, sendo 6 cujos blocos de parafina não foram encontrados por terem sido retirados pelas pacientes, 15 sem informações clínicas nos prontuários, 10 impróprios para o estudo imunohistoquímico, 7 com diagnóstico de carcinoma medular, 37 com resultado indeterminado quando houve negatividade para RE e HER2 associada à negatividade para todos os marcadores (EGFR, CK5, CK14, p63 ou P-caderina) ou resultado indeterminado para RE ou para o HER2, restando, então, 121 casos, que correspondem ao nosso material do tamanho amostral final.

3.3. Variáveis e Conceitos

3.3.1. Variáveis

- 1) Subtipos do carcinoma da mama (subtipo Luminal A, subtipo Luminal B, subtipo Superexpressão do HER2, subtipo Basal).
- 2) Expressão do receptor RE (positivo/negativo/indeterminado).
- 3) Expressão da proteína HER2 (positivo/negativo/indeterminado).
- 4) Expressão das proteínas do EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina (positivo/negativo).
- 5) Grau histológico (G I, G II, G III).
- 6) Linfonodos (positivo/negativo).

3.3.2. Conceitos

- Subtipos do carcinoma de mama

Os subtipos do carcinoma de mama seguiram a classificação de Perou *et al*¹⁴, modificada por Sorlie *et al*²¹, e a caracterização do subtipo do fenótipo basal foi segundo critérios de Nielsen *et al* e Sorlie *et al*^{15, 20} encontram-se descritos na seqüência e apresentados no Quadro 1:

- **Subtipo Luminal A** quando houve positividade para o RE e negatividade para o HER2^{14, 21}.
- **Subtipo Luminal B** quando houve positividade para o RE e para o HER2²¹.

- **Subtipo Superexpressão do HER2** quando houve negatividade para o RE e positividade para o HER2 ^{15, 21}.
- **Subtipo Basal** quando houve negatividade para RE, HER2 e positividade para pelo menos um dos marcadores basais: EGFR, CK5, CK14, p63 ou P-caderina ^{14, 15, 20, 21}.

QUADRO 1. Classificação dos subtipos do carcinoma de mama

<i>Classificação do subtipo do carcinoma de mama</i>	<i>RE</i>	<i>HER2</i>	<i>Expressão das proteínas EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina</i>
Luminal A	positivo	negativo	negativo/positivo
Luminal B	positivo	positivo	negativo/positivo
Superexpressão HER2	negativo	positivo	negativo/positivo
Basal	negativo	negativo	positivo

- Expressões das proteínas RE, HER2, EGFR, CK5, CK14, CK8/18, p63 e P-caderina

A expressão imunoistoquímica para os marcadores moleculares P63 e RE foi observada pela marcação nuclear, e do CK5 e CK14 pela marcação citoplasmática, independentemente da intensidade da marcação. Considerou-se um caso positivo se mais de 10% das células marcaram com RE, P63, CK5 e CK14. Para a avaliação da marcação do HER2, EGFR e da P-caderina, levou-se em consideração a percentagem de células com marcação

membranas. A positividade do HER2 e do EGFR foi avaliada de acordo com o método recomendado pelo kit Hercepteste (DAKO) das quatro categorias (0, +, ++, +++), foi considerado positivo quando os resultados englobavam as categorias ++ e +++⁵⁸. Uma vez que a expressão da P-caderina é observada apenas nas células mioepiteliais da glândula mamária normal, qualquer nível de expressão da P-caderina foi considerado anormal e aberrante nos carcinomas de mama⁸⁵.

- Grau histológico

O grau histológico foi determinado segundo o Sistema de Graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis^{93, 94}, com pontuação para cada uma das seguintes características:

- Formação Tubular: escore 1 (na maior parte do tumor, > 75%), escore 2 (entre 10% e 75%) e escore 3 (em menos de 10%).
- Grau nuclear (pleomorfismo): escore 1 (núcleos pequenos, com pouco aumento ou variação no seu tamanho em comparação com os núcleos das células epiteliais ductais normais, com contornos regulares e uniformidade de cromatina nuclear), escore 2 (núcleos maiores do que os núcleos das células ductais normais, aspecto vesiculoso, nucléolos mais visíveis, geralmente únicos e com moderada variação no seu tamanho e forma) e escore 3 (variação acentuada no tamanho e forma nuclear; núcleos volumosos e bizarros, vesiculosos, com nucléolos grandes proeminentes, geralmente múltiplos).
- Índice mitótico: as figuras de mitose, contadas em dez campos de maior aumento na periferia do tumor, onde a atividade proliferativa é mais intensa.

Após a somatória dos valores dados para cada uma das características acima citadas, os carcinomas de mama invasivos foram classificados em três graus:

- Grau I, baixo grau (bem diferenciado): 3 a 5 pontos;
- Grau II, grau intermediário (moderadamente diferenciado): 6 a 7 pontos;
- Grau III, alto grau (pouco diferenciado): 8 a 9 pontos

- Linfonodos

Os linfonodos foram agrupados em duas categorias (positivo e negativo) quando da presença ou não de metástase em pelo menos 1 linfonodo.

3.4. Descrição dos Procedimentos Técnicos (IPATIMUP) (ANEXO 2)

3.4.1. Construção dos *Tissue Microarrays* (TMA)

3.4.1.1. Seleção dos Tecidos para a Construção do TMA

A partir dos blocos de tecidos doadores, foram realizados cortes histológicos de 4 μ m para coloração Hematoxilina-Eosina (HE). As novas lâminas foram seqüencialmente analisadas ao microscópio óptico por um patologista (D.S.C.V.), e duas áreas morfológicamente significativas do componente tumoral foram selecionadas na lâmina de vidro. Posteriormente, foram delimitados dois círculos (correspondentes às áreas significativas) em cada bloco doador sobrepondo as lâminas marcadas, para assim marcar a área de extração do material dos blocos doadores.

3.4.1.2. Montagem dos TMA

A partir do número de áreas selecionadas em cada bloco doador, foram construídos mapas com as coordenadas de localização de cada caso nos blocos receptores (APÊNDICE 1) que foi seguido criteriosamente durante a confecção dos TMA.

Os blocos receptores do *Tissue Microarrays* (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 apresenta uma marcação de 5mm, de acordo com o tamanho dos cilindros do molde do bloco receptor, para que os cilindros de tecido extraídos tenham todos a mesma altura.

Depois de depositados todos os cilindros, os 18 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 eram 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 (micra) de espessura, as lâminas foram envolvidas numa camada de parafina até à sua utilização no processo de imunistoquímica. Foi feita a coloração HE, do primeiro corte de cada TMA, para controle morfológico da presença de tumor.

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

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

3.4.2. Método Imunoistoquímico

Todos os casos foram processados de acordo com o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, tendo sido utilizado o kit comercial supracitado. 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).

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 hidrogénio a 3% (Panreac, Espanha) em metanol, (Sigma-Aldrich, Germany).

Em resumo, os cortes de TMA foram desparafinados, reidratados e submetidos à recuperação antigênica induzida pelo calor em banho a 98°C. Utilizou-se solução *Retrieval* (pH=6) e EDTA (pH=8) durante 30 minutos, onde aplicaram-se oito anticorpos primários monoclonais (Quadro 2). 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 2). Seguiu-se a incubação do anticorpo secundário e do complexo estreptavidina-biotina-peroxidase. A peroxidase foi revelada pelo DAB e o corte contrastado com Hematoxilina de Mayer.

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

QUADRO 2: Anticorpos monoclonais utilizados no método imunistoquímico:

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Tempo de incubação (min)	Antígeno de recuperação (min)
CK5	XM26	LabVision	1:50	60	30 - Tris EDTA (1:10)
p63	4A4	LabVision	1:150	60	30 – tampão citrato (1:100)
EGFR	31G7	Zymed	1:100	60	30 – solução de pepsina
CK14	LL002	Novocastra	1:400	60	30 - Tris EDTA (1:10)
P-cad	56	BD Transduction	1:50	60	30 - Tris EDTA (1:10)
RE	SP1	LabVision	1:150	30	30 – tampão citrato (1:100)
HER2	SP3	LabVision	1:80	30	30 – tampão citrato (1:100)

Nota: No EGFR, P-caderina e CK14 foi usado anticorpo secundário com o polímero, a exceção da P-caderina cuja recuperação antigênica foi realizada com EDTA.

3.4.3. Controles

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

3.5. Coleta de Dados

Foi elaborada uma ficha que não continha o nome das mulheres e foram numeradas em ordem seqüencial de acordo com a inclusão no estudo (APÊNDICE 2).

A coleta de dados iniciou após a aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UFSC.

3.6. Análise dos Dados

Os dados transcritos na ficha foram revisados manualmente, para a detecção de possíveis erros de seleção e preenchimento. Foi criado um banco de dados com codificação das variáveis utilizando Excel[®]. A digitação do banco foi realizada com conferência manual através da listagem dos dados, na ordem em que foram incluídos. A revisão da consistência dos dados foi feita mediante tabelas descritivas, e em seguida, o arquivo gerado foi transportado para o programa *Epi Info 3.3.2* (www.cdc.gov).

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

Foi utilizado o Teste Exato de Fisher para verificar a associação entre as variáveis estudadas e a classificação do subtipo tumoral.

Os marcadores foram avaliados em relação à detecção de subtipo basal através do Teste Exato de Fisher.

Calcularam-se medidas de acerto como sensibilidade, especificidade, valores preditivos positivos e negativos (VPP e VPN), com seus respectivos intervalos de confiança (IC 95%).

Definiu-se como sensibilidade a proporção dos indivíduos com a doença, que têm um teste positivo para a doença, a especificidade como a proporção dos indivíduos sem a doença, que têm um teste negativo, o valor preditivo positivo (VPP) do teste como a probabilidade de doença em um paciente com resultado positivo e o valor preditivo negativo (VPN) a probabilidade de não ter a doença com resultado negativo ⁹⁸.

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

3.7. Aspectos Éticos

O projeto deste trabalho foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, de acordo com a Resolução nº. 196/96, 251/97 e 292/99, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde, com parecer consubstanciado - Projeto nº 141/2005, aprovado em reunião do dia 30 de maio de 2005 (ANEXO 3), com ementa complementar aprovada em reunião do dia 08 de junho de 2006 (ANEXO 4).

4. RESULTADOS

Dos 121 casos deste estudo, 99 (82%) foram do subtipo não Basal (54,5% Luminal A, 6% Luminal B e 21,5% superexpressão do HER2). A freqüência do subtipo Basal foi observada em 18% dos casos estudados (Tabela 1).

TABELA 1 - Freqüência dos subtipos do carcinoma de mama.

Subtipo	RE	HER2	Marcador basal	Freqüência*
Luminal A	positivo	negativo	negativo/positivo	n = 66 (54,5%)
Luminal B	positivo	positivo	negativo/positivo	n = 7 (6%)
superexpressão HER2	negativo	positivo	negativo/positivo	n = 26 (21,5%)
Basal	negativo	negativo	positivo	n = 22 (18%)

* n= 121 (100%).

Em relação às características morfológicas, observou-se que predominaram os casos com grau histológico II (GII) em 55 casos (47%). A freqüência do comprometimento linfonodal mostrou que em 59 casos (52,2%), pelo menos 1 linfonodo mostrava presença de metástase (Tabela 2).

TABELA 2 - Freqüência das características morfológicas.

Características morfológicas	n	% valido	% sob 121
Grau histológico			
grau I	33	28,2%	27,3%
grau II	55	47%	45,5%
grau III	29	24,8%	24,0%
Linfonodos			
negativo	54	47,8%	44,6%
positivo	59	52,2%	48,8%

* n= 121 (100%).

Ao avaliarmos a frequência da expressão do RE, verificamos que houve negatividade em 39,2% dos casos válidos, e a ausência de superexpressão do HER2 foi observada na maioria dos casos estudados (72,7%) (Tabela 3).

TABELA 3 - Frequência da expressão do RE e do HER2.

Marcadores imunoistoquímicos	n	% <i>válido</i>	%sob 121
RE			
negativo	47	39,2%	38,8%
positivo	73	60,8%	60,3%
HER2			
negativo	88	72,7%	72,7%
positivo	33	27,3%	27,3%

* n= 121 (100%).

A frequência da expressão dos marcadores de células basais, detectados pela imunistoquímica, mostrou que a P-caderina foi positiva em 48 casos (39,7%), e o p63 e EGFR foram os marcadores que apresentaram menor frequência positiva (6,6% e 4,1% respectivamente) (Tabela 4).

TABELA 4 - Frequência da expressão dos marcadores de células basais.

Marcadores de células basais	n	% válido	% sob 121
CK5			
negativo	92	76%	76%
positivo	29	24%	24%
p63			
negativo	113	93,4%	93,4%
positivo	8	6,6%	6,6%
P-caderina			
negativo	73	60,3%	60,3%
positivo	48	39,7%	39,7%
EGFR			
negativo	116	95,9%	95,9%
positivo	5	4,1%	4,1%
CK14			
negativo	111	92,5%	91,7%
positivo	9	7,5%	7,4%

* n= 121 (100%).

A associação do grau histológico com o subtipo tumoral mostrou que, entre os casos de carcinoma de mama subtipo basal, predominou o grau histológico III com 52,4% dos casos ($p < 0,0001$). A associação entre o comprometimento linfonodal e o subtipo do carcinoma de mama evidenciou que os subtipos Luminal A e Superexpressão do HER2 apresentaram maior número de casos com pelo menos um linfonodo comprometido com frequência de 54,1% e 56%, respectivamente (Tabela 5).

TABELA 5 - Associação entre o grau histológico e os linfonodos com os subtipos do carcinoma de mama

Características Morfológicas	Luminal A		Luminal B		Superex- Her2		Basal		Valor-p*
	n	%	n	%	n	%	n	%	
Grau histológico									
grau I	25	39,1	2	28,6	4	16,0	2	9,5	< 0,0001
grau II	34	53,1	4	57,1	9	36,0	8	38,1	
grau III	5	7,8	1	14,3	12	48,0	11	52,4	
não classificados	2		0		1		1		
Linfonodos									
positivo	33	54,1	2	40,0	14	56,0	10	45,5	0,8266
negativo	28	45,9	3	60,0	11	44,0	12	54,5	
ignorado	5		2		1		0		

* Teste Exato de Fisher.

Todos os casos do subtipo basal foram negativos para receptor de estrogênio e para a superexpressão do HER2 ($p < 0,0001$). Os marcadores que melhor mostraram magnitude de associação com o subtipo basal foram a p-caderina ($p < 0,0001$), a CK5 ($p = 0,0020$) e a CK14 ($p < 0,0001$) (Tabela 6).

TABELA 6 – Associação entre os marcadores imunoistoquímicos com os subtipos do carcinoma de mama.

Marcadores imunoistoquímicos	Luminal A		Luminal B		Superexp HER-2		Basal		Valor-p*
	n	%	n	%	n	%	n	%	
	RE								
Positivo	66	100,0	7	100,0	0	0,0	0	0,0	
Negativo	0	0,0	0	0,0	26	100,0	21	100,0	
HER2									< 0,0001
Positivo	0	0,0	7	100,0	26	100,0	0	0,0	
Negativo	66	100,0	0	0,0	0	0,0	22	100,0	
CK5									0,0020
Positivo	9	13,6	2	28,6	6	23,1	12	54,5	
Negativo	57	86,4	5	71,4	20	76,9	10	45,5	
p63									0,9290
Positivo	4	6	0	0,0	2	7,7	2	9,1	
Negativo	62	94	7	100,0	24	92,3	20	90,9	
P-caderina									< 0,0001
Positivo	13	20	3	42,9	19	73,1	13	59,1	
Negativo	53	80	4	57,1	7	26,9	9	40,9	
EGFR									0,0723
Positivo	1	1,5	0	0,0	1	3,8	3	13,6	
Negativo	65	98,5	7	100,0	25	96,2	19	86,4	
CK14									< 0,0001
Positivo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	9	40,9	
Negativo	65	100,0	7	100,0	26	100,0	13	59,1	

*Teste Exato de Fisher.

Ao avaliarmos a associação da expressão dos marcadores do fenótipo basal com o subtipo basal e não basal, observamos que 100% dos casos não basais foram negativos para CK14 ($p < 0,0001$). Entre os casos do subtipo basal, houve maior significância estatística ($p < 0,0001$) com os marcadores CK5 (54,5%) e a CK14 (40,9%) (Tabela 7).

TABELA 7 – Associação da expressão dos marcadores do fenótipo basal com os subtipos basal e não basal.

Marcadores	Basal		Não basal		Valor-p*
	n	%	n	%	
CK5					< 0,0001
Positivo	12	54,5	17	17,2	
Negativo	10	45,5	82	82,8	
p63					0,6360
Positivo	2	9,1	6	6,1	
Negativo	20	90,9	93	93,9	
P-caderina					0,0537
Positivo	13	59,1	35	35,4	
Negativo	9	40,9	64	64,6	
EGFR					0,0414
Positivo	3	13,6	2	2,0	
Negativo	19	86,4	97	98,0	
CK14					< 0,0001
Positivo	9	40,9	0	0,0	
Negativo	13	59,1	98	100,0	

*Teste Exato de Fisher.

Ao avaliarmos o desempenho da expressão dos marcadores para identificar o fenótipo basal, verificamos que a CK5 mostrou sensibilidade de 54,5% e especificidade de 82,8%, com valor preditivo negativo mais expressivo (89,1). A CK14 apresentou 100% de especificidade com o valor preditivo positivo mais expressivo (100%) (Tabela 8).

TABELA 8 - Desempenho dos marcadores na determinação dos subtipos basal e não basal

Marcadores	Sensibilidade % (IC95%)	Especificidade % (IC95%)	VPP*	VPN**
CK5	54,5 (33,7 - 75,4)	82,8 (75,4 - 90,3)	41,4	89,1
p63	9,1 (0,0 – 21,1)	93,9 (89,2 - 98,6)	25,0	82,3
P-caderina	59,1 (38,5 - 79,6)	64,6 (55,2 - 74,1)	27,1	87,7
EGFR	13,6 (0,0 - 28,0)	98,0 (95,2 - 100,0)	60,0	83,6
CK14	40,9 (20,4-61,5)	100,0 (100,0-100,0)	100,0	88,3

* VPP (valor preditivo positivo); ** VPN (valor preditivo negativo)

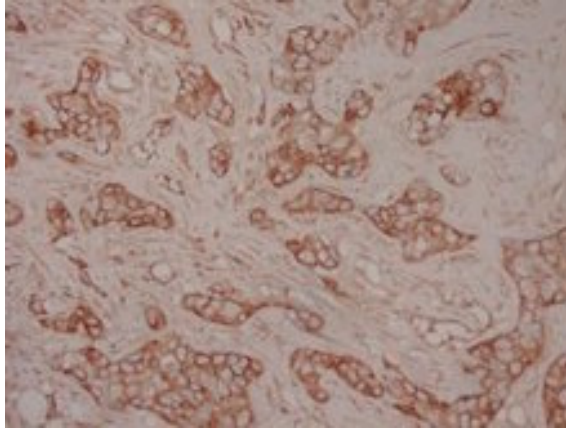


Figura 1. Carcinoma de mama: marcação positiva para CK5 (CK5, 20X).

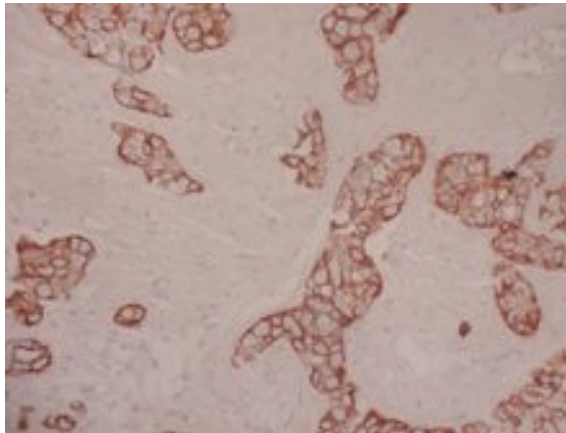


Figura 2. Carcinoma de mama: marcação positiva para CK14 (CK14, 20X).

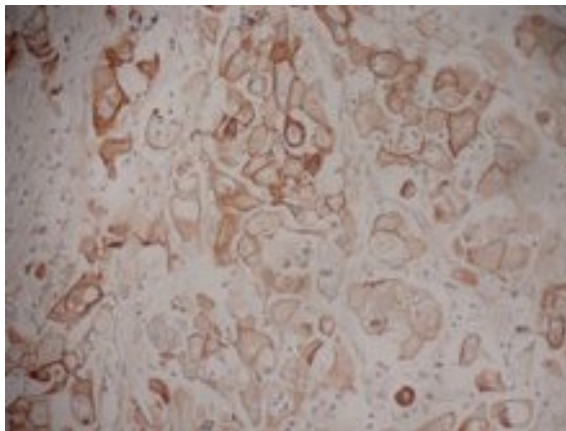


Figura 3. Carcinoma de mama: marcação positiva para EGFR (EGFR, 20X).

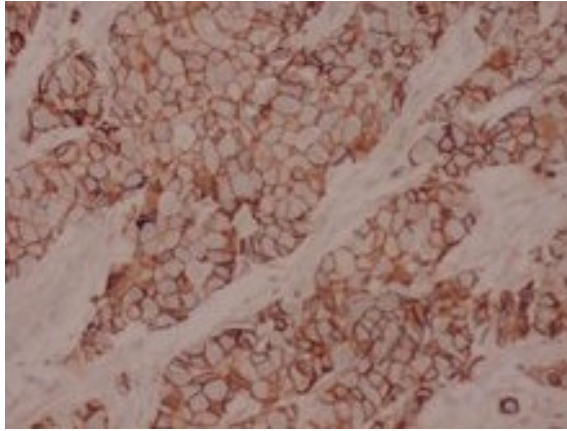


Figura 4. Carcinoma de mama: marcação positiva para P-caderina (P-caderina, 20X).

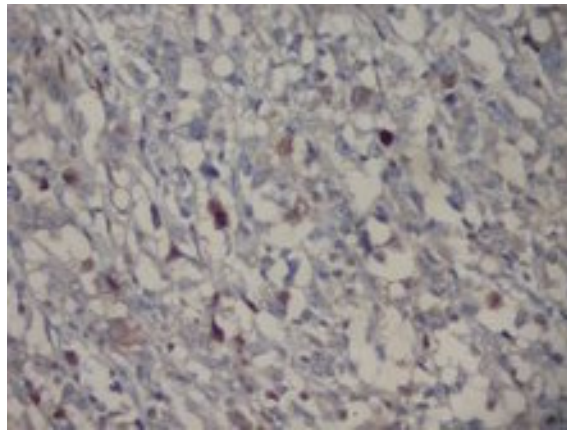


Figura 5. Carcinoma de mama: marcação positiva para p63. (p63, 40X).

5. DISCUSSÃO

O perfil de expressão gênica do carcinoma de mama invasivo identificou um grupo de tumores com pior prognóstico, onde estão incluídos os carcinomas de mama hereditários relacionados às mutações do gene *BRCA1*. Esse grupo de tumores tem sido chamado subtipo basal^{14, 15, 19, 26, 35}, é o mais agressivo e não tem, até agora, alvos terapêuticos específicos^{27, 33}. Atualmente, a missão dos patologistas e cientistas é entender os conhecimentos adquiridos na era oncogenômica e a complexidade dos mais recentes resultados das pesquisas em *microarrays*, traduzindo-os para a prática clínica. Assim sendo, nosso grupo vem mostrando especial interesse pelo subtipo basal do carcinoma de mama^{10, 27}. Neste caminho, através deste estudo, estamos nos propondo a avaliar o desempenho de marcadores imunoistoquímicos para identificar o fenótipo basal.

Em nossa série do total de 121 casos de carcinoma de mama, identificamos 22 casos (18%) com subtipo do fenótipo basal, estando nossa casuística um pouco acima do observado na literatura atual, que varia de três a quinze por cento de todos os carcinomas de mama^{14, 99-101}.

O mais importante resultado deste estudo mostrou que os marcadores do fenótipo basal P-caderina, CK5 e CK14 demonstraram bom desempenho para distinguir este subtipo especial de tumores daqueles não basais, com sensibilidade de 59,1%, 54,5% e 40,9%, respectivamente. Dentre estes três marcadores fenotípicos, as citoqueratinas basais (CK5 e CK14) mostraram especificidade de 82,8% e 100% respectivamente, com significância estatística ($p < 0,0001$). Destes, o melhor valor preditivo positivo (VPP) foi do marcador CK14 (100%).

Assim, conforme apontou a análise estatística, se fossem escolhidos apenas o marcador CK5 ou o CK14 como alvos protéicos para identificar este subtipo especial, mais agressivo dentre os carcinomas de mama, a confirmação diagnóstica seria estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). Deve ser destacado que neste estudo, em todos os casos de subtipo não basal, a CK14 mostrou-se negativa, sendo, portanto altamente específica para identificar os casos verdadeiramente negativos daqueles do fenótipo basal ($p < 0,0001$) (IC 95%: 100 - 100). A rigor, os

padrões de expressão das CK são conservados durante a oncogênese, assim, carcinomas de mama podem ser classificados de acordo com a expressão das suas citoqueratinas⁸⁴. Por outro lado, há relatos sugerindo que a P-caderina identifica um grupo de carcinomas de mama que não expressam RE e que estariam correlacionados com características tumorais mais agressivas e com alto grau histológico⁸⁵.

A importância das citoqueratinas e da P-caderina, como marcadores imunoistoquímicos, para identificar o fenótipo basal já foi evidenciada em outros estudos^{10, 20, 21, 27 - 32, 85}. Embora falte uma melhor caracterização no sentido de compreender o carcinoma basal, publicações recentes atribuíram algumas características a este tipo de tumor: negatividade para o RE e para o HER2 (RE-/HER2-) com positividade para CK5/6 e/ou EGFR, com 76% de sensibilidade e 100% de especificidade^{20, 27}. Diferentes autores também estabeleceram outros marcadores para distinguir o subtipo do fenótipo basal utilizando, deste modo, a P-caderina, o p63, a CK14 e CK17, que são moléculas expressas nas células basais/mioepiteliais²⁷.

O outro resultado importante de nosso estudo se refere ao poder do EGFR em distinguir os verdadeiros casos negativos do fenótipo não basal daqueles basais. Tal associação foi estatisticamente significativa ($p=0,0414$) (IC95%: 95,2 a 100). Nos últimos anos, esta família de receptores, conhecidos como “fator de crescimento epidérmico” ou receptores ERBB, teve grande destaque⁵⁸, e tem sido estudada em vários tipos de tumores^{49, 59, 60, 62, 63}, entretanto este marcador raramente encontra-se expresso em estudos experimentais de carcinoma de mama. Por conseguinte, nossos resultados são concordantes com estudos que demonstram a inativação do gene EGFR no carcinoma de mama^{67, 102}. Por outro lado, este gene tem manifestado expressão nas células mioepiteliais/basais e mais amplos estudos são necessários para elucidar a via da carcinogênese mamária dependente do EGFR¹⁰².

A expressão da p63 mostrou baixa sensibilidade (9,1%), não sendo, assim, um bom marcador para identificar o perfil basal. Contudo, foi bom para excluir os verdadeiros casos negativos, com especificidade de 93,9% (89,2 - 98,6).

Estudos em imunoistoquímica demonstraram que a perda da expressão desta proteína está relacionada com o caminho de diferenciação das células progenitoras

em células luminais, e, a expressão aumentada relaciona-se com células mioepiteliais/basais ^{44, 103}. Deste modo, o p63, em associação com outros marcadores, como a P-caderina e CK5, também constitui um importante marcador molecular que pode ser usado para distinguir o fenótipo basal ¹⁰.

De especial atenção, destaca-se a concordância deste estudo com a classificação molecular inicialmente proposta por Perou ¹⁴, ao distinguir o fenótipo basal como sendo RE/HER2 negativo. Tais diferenças foram estatisticamente significantes para ambas as variáveis estudadas ($p < 0,0001$), e o resultado foi confirmado em cem por cento de nossa casuísta. A ausência destes produtos de expressão protéica e a caracterização deste subtipo como padrão basal, diferenciam estes carcinomas como mais agressivos, associando-os com um pior prognóstico ¹⁰.

Um outro aspecto a enfatizar no presente estudo é a análise das características morfológicas dos diferentes subtipos do carcinoma da mama. Foi interessante constatar que o subtipo basal estava presente em 52,4% dos casos de carcinoma de mama com grau III, estando este resultado de acordo com a literatura ^{10, 104}. Em relação aos linfonodos, não houve resultado estatisticamente significativo para esta variável estudada ($p = 0,8266$).

Este estudo demonstra que, usando um limitado número de marcadores, como a CK5 e a CK14, podemos caracterizar e distinguir o subtipo do fenótipo basal do carcinoma de mama. O p63 e o EGFR foram vagamente expressos neste subtipo de tumores, porém foram úteis para distinguir o subtipo do fenótipo não basal. Portanto, a categorização do valor do desempenho destes marcadores de células basais ajudou a identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama. Assim, a utilização desses marcadores específicos na rotina da patologia cirúrgica poderá ajudar a selecionar mulheres com alta probabilidade para serem portadoras de alterações genéticas com alta suscetibilidade do desenvolvimento do carcinoma de mama e outros relacionados.

6. CONCLUSÃO

6.1. Frequência dos subtipos do carcinoma de mama com base na classificação molecular:

- A frequência do subtipo Luminal A foi de 54,5%.
- A frequência do subtipo Luminal B foi de 6%.
- A frequência do subtipo Superexpressão do HER2 foi de 21,5%.
- A frequência do subtipo Basal foi de 18%.

6.2. Frequência da expressão das proteínas EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina com o fenótipo basal e não basal do carcinoma de mama:

- A frequência da expressão do EGFR foi de 13,6 % nos basais e 2,0 % nos não basais.
- A frequência da expressão da CK5 foi de 54,5 % nos basais e 17,2% nos não basais.
- A frequência da expressão da CK14 foi de 40,9% nos basais e 0,0% nos não basais.
- A frequência da expressão do p63 foi de 9,1% nos basais e 6,1% nos não basais.
- A frequência da expressão do P-caderina foi de 59,1% nos basais e 35,4% nos não basais.

6.3. Cálculo da sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da expressão das proteínas EGFR, CK5, CK14, p63 e P-caderina para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama:

- A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da expressão do EGFR foram de 13,6%, 98,0%, 60% e 83,6%, respectivamente, para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama.
- A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da expressão da CK5 foram de 54,5%, 82,8%, 41,1% e 89,1%, respectivamente, para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama.
- A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da expressão da CK14 foram de 40,9%, 100%, 100% e 88,3%, respectivamente, para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama.
- A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da expressão do p63 foram de 9,1%, 93,9%, 25,0% e 82,3%, respectivamente, para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama.
- A sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) da expressão da P-caderina foram de 59,1%, 64,6%, 27,1% e 87,7%, respectivamente, para identificar o fenótipo basal do carcinoma de mama.

6.4. Análise da associação das características morfológicas (grau histológico e linfonodos) com os fenótipos do carcinoma de mama:

- O grau histológico I (GI) teve maior associação com o subtipo Luminal A (39,1%).
- O grau histológico II (GII) teve maior associação com o subtipo Luminal B (57,1%).
- O grau histológico III (GIII) teve maior associação com o subtipo Basal (52,4%).
- Linfonodos: não houve resultado estatisticamente significativo para esta variável estudada ($p = 0,8266$).

6.5. Considerações finais:

O presente estudo revelou diferentes desempenhos imunoistoquímicos para identificar o fenótipo basal e o não basal do carcinoma de mama.

Os resultados mostraram relevante marcação das proteínas do fenótipo basal CK5 ($p < 0,0001$) e CK14 ($p < 0,0001$). Destes, a CK14 apresentou o melhor valor preditivo positivo (100%) ($p < 0,0001$). Cabe salientar que o EGFR mostrou um excelente desempenho para identificar o fenótipo não basal ($p = 0,0414$).

O aprimoramento para caracterizarmos o carcinoma basal como uma entidade biológica distinta do carcinoma não basal, pode constituir uma ferramenta útil para selecionarmos mulheres que deveriam submeter-se ao rastreamento de mutações gênicas (*BRCA1* e *BRCA2*).

7. REFERÊNCIAS

1. World Health Organization Classification of Tumours (WHO), International Agency for Research on Cancer (IARC), Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs. FA Tavassoli, P Devilee, Lyon 2003.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. Estimativa 2006: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2005. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br>>. Acesso em 02/09/2006.
3. Parkin D. Global cancer statistics in the year 2000. *Lancet Oncol.* 2001; 2: 533-43.
4. Parkin DM, Bray FI, Devesa SS. Cancer burden in the year 2000. The global picture. *Eur J Cancer.* 2001;8:54-66.
5. Brasil. Ministério da Saúde. Carcinoma no Brasil – Dados dos Registros de Base Populacional. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/regpop/> 2003>. Acesso em 12/06/2003.
6. Ries L, Eisner M, Kosary C. SEER Cancer statistics review, 1973-1998. Bethesda: National Cancer Institute; 2001.
7. INCA (Instituto Nacional de Câncer). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2001.
8. Patologia Diagnostica de Tumores. Billis A, Vassallo J. Campinas: Impressão Digital do Brasil Gráfica e Editora Ltda, 2004.
9. Instituto Nacional de câncer. Câncer de mama. Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/index.asp?link=tabela_estados.asp&UF=SC>. Acesso em 04/01/2007.

10. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. P63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* 2005;447(4):688-94.
11. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *European Journal of Cancer.* 2004;40: 2667-2675.
12. Simon R, Mirlacher M, Sauter G. *Tissue Microarrays* in cancer diagnosis. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2003;3(4):421-30.
13. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of Cancer. *Cell.* 2000;100:57-70.
14. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406:747-52.
15. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, *et al.*, Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications, *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001;98:10869–10874.
16. Bertucci F, Houlgatte R, Benziane A, Granjeaud S, Adelaide J, Tagett R, *et al.* Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2981- 91.
17. Bertucci F, Bernard K, Loriod B, Chang YC, Granjeaud S, Birnbaum D, *et al.* Sensitivity issues in DNA array-based expression measurements and performance of nylon microarrays for small samples. *Hum Mol Genet.* 1999;8:1715-22.
18. Martin KJ, Kritzman BM, Price LM, Koh B, Kwan CP, Zhang X, *et al.* Linking gene expression patterns to therapeutic groups in breast cancer. *Cancer Res.* 2000;60:2232-8.
19. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, *et al.* Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:9212-7.

20. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, *et al.* Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5367-74.
21. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al.* Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *PNAS.* 2003; 100(14): 8418-423.
22. Dufloth RM. Carcinoma de mama hereditário em mulheres brasileiras: mutações dos genes de BRCA1 e BRCA2, polimorfismos dos genes de reparo do DNA e caracterização imunoistoquímica pela técnica de *Tissue Microarray* [Tese de Doutorado]. Campinas: Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 2004.
23. Ross JS, Fletcher JA. HER-2/neu (c-erbB-2) gene and protein in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 1999; 112 (1): S53-67.
24. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, *et al.* A Practical Alternative for Fluorescence in situ Hybridization to Detect HER-2/neu Oncogene Amplification in Archival Breast Cancer Samples. *American Journal of Pathology.* 2000;157(5):1467-72.
25. Hedenfalk I, Duggan D, Chen Y, *et al.* Gene expression profiles in hereditary breast cancer. *N Engl J Med.* 2001; 344:539-48.
26. Van de Rijn, M., Perou, C. M., Tibshirani, R., Haas, P., Kallioniemi, O., Kononen, J., Torhorst, J., Sauter, G., Zuber, M., Kochli, O. R., *et al.* Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol.* 2002;161:1991–1996.
27. Paredes J, Albergaria A, Carvalho S, Schmitt FC. "Basal-like" breast carcinomas: identification by the expression of basal cytokeratins, P-cadherin, p63 and EGFR. *Applied Cancer Research* (in press).

28. Reis-Filho, J.S.; Simpson, P.T.; Martins, A. *et al.* Distribution of p63, cytokeratins 5/6 and 14 in 51 normal and 400 neoplastic human tissue samples using TARP-4 multi-tumor tissue microarray. *Virchows Arch.* 2003;443:122-32.
29. Böcker W, Moll R, Poremba C, Holland R, van Diest PJ, Dervan P, Burger H, *et al.* Common Adult stem cells in the human breast give rise to glandular and myoepithelial cell lineages: a new cell biological concept. *Lab Invest.* 2002;82:737-746, 2002.
30. Böcker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of Glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolf.* 2003;36:73-84.
31. van't Veer LJ, Dai HY, van de Vijver MJ, He YD, Hart AA, Mao M, *et al.* Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature.* 2002;415:530-6.
32. Paredes J, Lopes N, Milanezi F, Schmitt FC. P-cadherin and cytokeratin 5:museful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. *Virchows Arch* 2006 [Epub ahead of print].
33. Bertucci F, Birnbaum D, Gonçalves A. Proteomics of Breast carcinoma: Principles and Potential Clinical Applications. *Mol Cell Proteomics.* 2006;5(10):1772-86.
34. Shak S. Overview of the trastuzumab (Herceptin) anti-HER2 monoclonal antibody clinical program in HER2-overexpressing metastatic breast cancer. Herceptin Multinational Investigator Study Group. *Semin Oncol.* 1999;6:71–7.
35. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, *et al.* Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics.* 2006;7:127. Page 1 of 15 (page number not for citation purposes).

36. Schena M, Shalon D, Davis RW, Brown PO. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science*. 1995; 20:270:467-70.
37. Ramaswamy S, Golub TR. DNA microarrays in clinical oncology, *J Clin Oncol*. 2002;20:1932–1941.
38. Cooper SC. Applications of microarray technology in breast cancer research. *Breast Cancer Res*. 2001, 3:158-175.
39. Ramaswamy S, Tamayo P Rifkin R, *et al.*, Multiclass cancer diagnosis using tumor gene expression signatures, *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:15149–15154.
40. Yeoh EJ, Ross ME, Shurtleff SA, *et al.*, Classification, subtype discovery, and prediction of outcome in pediatric acute lymphoblastic leukemia by gene expression profiling, *Cancer Cell* . 2002;1:133–143.
41. Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors, *Nat Genet*. 2003; 33:49–54.
42. Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE, *et al*, Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling, *Nature*. 2000;403:503–511.
43. Santos PM, Teixeira MC, Sá-Correa I. A análise Proteómica Quantitativa na revelação de mecanismos de resposta a stresse químico em microrganismos. Lisboa: Boletim de Biotecnologia, 2004.
44. Mckeon F. P63 and the epithelial stem cell: more than status quo? *Genes Dev* 2004; 18: 465-9.
45. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, *et al.* *Tissue Microarray* for high-throughput molecular profiling of hundreds of specimens. *Nature Med*. 1998;4:844-7.

46. Zellweger T, Ninck C, Mirlacher M, Annefeld M, Glass AG, Gasser TC, *et al.* *Tissue Microarray Analysis Reveals Prognostic Significance of Syndecan-1 Expression in Prostate Cancer.* *The Prostate.* 2003;55:20 – 29.
47. Hidalgo A, Piña P, Guerrero G, Lazos M, Salcedo M. A simple method for the construction of small format tissue arrays. *J Clin Pathol.* 2003;56:144–6.
48. Kallioniemi O, Wagner U, Kononem J, Sauter G. Tissue macroarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Human Molecular Genetics.* 2001;10(7):657-62.
49. Marquez A, Wu R, Zhao J, Tao J, Shi Z. Evaluation of Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) by Chromogenic *In situ* Hybridization (CISH) and Immunohistochemistry (IHC) in Archival Gliomas Using Bright-Field Microscopy. *Diagn Mol Pathol.* 2004;13:1–8.
50. Rosen PP. *Breast Pathology.* Philadelphia: Lippincott-Raven, 1997.
51. Page DL, Jensen RA, Simpson JF. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. *Breast Cancer Research and Treatment.* 1998;51:195-208.
52. Sommer S, Fuqua SAW. Estrogen receptor and breast carcinoma. Seminars in cancer biology (Semin. cancer biol.) *Breast Cancer.* 2001;11(5):339-352.
53. Mansour EG, Ravdin PM, Dressler L. Prognostic factors in early breast carcinoma. *Cancer.* 1994;74: 381-400.
54. Henson DE, Fielding LP, Grignon DJ, Page DL, Hammond ME, Nash G, Pettigrew NM, Gorstein F, Hutter Rv, for the Cancer Committee CAP: College of American Pathologists Conference XXVI on clinical relevance of prognostic markers in solid tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 1995;119: 1109-1112.
55. Leong As-Y, Lee AKC. Biological indices in the assessment of breast cancer. *J Clin Pathol Mol Pathol.* 1995; 48: M221-M238.

56. Molino A, Micciolino R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, corgnati A, Sperotto L, Recaldin E, *et al.* Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancers: a comparison of imunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res Treat.* 1997;45: 241-249.
57. Inguarsson, S. Breast cancer: introduction. *Seminars in Cancer Biology.* 2001; 11:323-26.
58. Reis-Filho JS, Milanezi F, Carvalho S, Simpson PT, Steele D, Savage K, Lambros MBK, Pereira EM, Nesland JM, Lakhani SR, Schmitt FC. Metaplastic breast carcinomas exhibit EGFR, but not HER2, gene amplification and overexpression: immunohistochemical and chromogenic *in situ* hybridization analysis. *Breast Cancer Research.* 2005;7 (6): 1028-1035.
59. Hynes NE, Lane HA: ERBB receptors and cancer: the complexity of targeted inhibitors. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:341-354.
60. Fallon KB, Plmer CA, Roth KA, Nabors LB, Wang W, Carpenter M, *et al.* Prognostic value of 1p, 19q, 9p 10q, and EGFR-FISH analyses in recurrent oligodendrogliomas. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2004; 63:314-322.
61. Takehana T, Kunitomo K, Suzuki S, Kono K, Fujji H, Matsumoto Y, *et al.* Expression of epidermal growth factor receptor in gastric carcinomas. *Clin Gastroenterol Hepatol.*2003;1438-445.
62. Giaccone G. Epideral growth factor receptor inhibitors in the treatment of non-small-cell lung cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23: 3235-3242.
63. Cappuzo F, Hissch FR, Rossi E, Bartolini S, Ceresoli GL, Bemis L, *et al.* Epidermal growth factor receptor gene and protein and gefitinib sensitivity in non-small-cell lung cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:643-655.
64. Baselga J, Arteaga CL. Critical update and emerging trends in epidermal growth factor receptor targeting in cancer. *J Clin Oncol.* 2005; 23:2445-2459.

65. Corzo C, Tusquets I, Salido M, Corominas JM, Beller M, Suarez M, *et al.* Characterization of HER1 (c-erbB1) status in locally advanced breast cancer using fluorescence *in situ* hybridization and immunohistochemistry. *Tumour Biol.* 2005;26:25-30.
66. Al-Kuraya K, Schraml P, Torhorst J, Tapia C, Zahrieva B, Novotny H, *et al.* Prognostic relevance of gene amplifications and coamplifications in breast cancer. *Cancer Res.* 2004; 64:8534-8540.
67. Bhargava R, Gerald WL, Li AR, Pan Q, Lal P, Ladanyi M, Chen B: EGFR gene amplification in breast cancer: correlation with epidermal growth factor receptor mRNA and protein expression and HER-2 status and absence of EGFR-activating mutations. *Mod Pathol.* 2005;18:1027-1033.
68. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, *et al.* Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology.* 2006; in press.
69. Leibl S, Gogg-Kammerer M, Sommersacher A, Denk H, Moinfar F. Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation?: Immunohistochemical profile of the sarcomatoid subtype using novel myoepithelial markers. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:347-353.
70. Dunne B, Lee AH, Pinder SE, Bell JA, Ellis IO. An immunohistochemical study of metaplastic spindle cell carcinoma, phyllodes tumor and fibromatosis of the breast. *Hum Pathol.* 2003;34:1009-1015.
71. Popnikolov NK, Ayala AG, Graves K, Gatalica Z. Benign myoepithelial tumors of the breast have immunophenotypic characteristics similar to metaplastic matrix-producing and spindle cell carcinomas. *Am J Clin Pathol.* 2003; 120:161-167.
72. Reis-Filho JS, Steele D, Di palma S, Jones RL, Savage K, James M, *et al.* Distribution and significance of nerve growth factor receptor (NGFR/p75(NTR)) in normal, benign and malignant breast tissue. *Mod Pathol.* 2006;19:307-319.

73. Reis-Filho JS, Milanezi F, Paredes J, Silva P, Pereira EM, Maeda AS, *et al.* Novel and classic myoepithelial/stem cell markers in metaplastic carcinomas of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003;11:1-8.
74. Carter MR, Hornick JL, Lester S, Fletcher CDM. Spindle cell (sarcomatoid) carcinoma of the breast: a clinicopathologic and immunohistochemical analysis of 29 cases. *Am J Surg Pathol.* 2006;30:300-309.
75. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science.* 1987; 235; 177–182.
76. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, Slamon DJ, Murphy M, Novotny WF, Burchmore M, Shak S, Stewart SJ, Press M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2- overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002; 20: 719-26.
77. Tanner M, Jarvinen P, Isola J. Amplification of HER-2/neu and Topoisomerase II in primary and metastatic breast cancer. *Cancer Res.* 2001; 61: 5345-8.
78. Riou G, Mathieu MC, Barrois M, Le Bihan ML, Ahomadegbe JC, Benard J, Le MG. c-erbB-2 (HER-2/neu) gene amplification is a better indicator of poor prognosis than protein over-expression in operable breast cancer patients. *Int J Cancer.* 2001; 95: 266-70.
79. Yamauchi H, Stearns V, Hayes DF. When is a tumor marker ready for prime time? A case study of c-erbB-2 as a predictive factor in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2001; 19: 2334-56.
80. Carr JA, Havstad S, Zarbo RJ, Divine G, Mackowiak P, Velanovich V. The association of HER-2/neu amplification with breast cancer recurrence. *Arch Surg.* 2000; 135: 1469-74.

81. Ahr A, Holtrich U, Solbach C, Scharl A, Strebhardt K, Karn T, Kaufmann M. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol.* 2001;195:312-320.
82. Press MF, Hung G, Godolphin W, Slamon DJ. Sensitivity of HER-2/neu antibodies in archival tissue samples: potential source of error in immunohistochemical studies of oncogene expression. *Cancer Res.* 1994;54:2771-7.
83. Tanner M, Gancberg D, Di Leo A, Larsimont D, Rouas G, Piccart MJ, *et al.* A Practical Alternative for Fluorescence *in situ* Hybridization to Detect HER-2/neu Oncogene Amplification in Archival Breast Cancer Samples. *American Journal of Pathology.* 2000;157(5):1467-72.
84. Birnbaum D, Bertucci F, Ginestier C, Tagett R, Jacquemier J, Charafe-Jauffret E. Basal and luminal breast cancers: Basic or luminous? *Int J Oncol.* 2004;25:249-258.
85. Paredes, JCAF, Milanezi MFG, Reis-Filho JS, Leitão DRA, Athanazio DA, Schmitt FCL. Correlação entre as expressões de P-caderina e de receptores de estrógeno no carcinoma da mama. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial.* 2002;38(4): 307-313.
86. Daniel CW, Strickland p, Friedmann Y. Expression and functional role of E- and P-cadherins in mouse mmmary ductal morphogenesis and growth. *Dev. Biol.* 1995;169 (2): 511-9.
87. Levrero M, De Lsurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct funcions. *J Cell Sci.* 2000;113:1661-1670.
88. Fitzgibbons, P. L.; Page, D.L.;Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, *et al.* Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement, 1999. *Arch. Pathol. Lab. Med.*2000;124: 966-78.

89. Pharoah PD, *et al.* Family history and the risk of breast cancer: A systematic review and meta-analysis. *Int. J. Cancer.* 1997;71: 800-809.
90. Haagensen CD. *Diseases of the Breast.* WB Saunders, Philadelphia (1986).
91. Harris JR, Lippman ME, Morrow M, Hellman S. *Diseases of the Breast.* Lippincott-Raven, Philadelphia (1996).
92. Elston, C. W.; Ellis, I.O.; Pinder, S. E.. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Critical Reviews in Oncology/Hematology.* 1999;31(3):209-23.
93. 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;19:403-410.
94. Bloom, H.J.G.; Richardson, W.W. Histological Grading and prognosis in breast Carcinoma: a study of 1049 cases of which 359 have been followed for 15 years. *Br J Cancer.* 1957; 11: 359-377.
95. Rosen PP, Oberman HA. tumors of the mammary gland. Washington, DC: Armed Forces Institute of Pathology American Registry of pathology; 1993. Atlas of Tumor Pathology; 3rd series, fascicle 7.
96. World Health Organization International Classification of Tumours. Histological Typing of Breast Tumours. Second ed. Geneva, Switzerland 1981.
97. Page, DL. Special types of invasive breast cancer, with clinical implications. *Am J Surg Pathol.* 2003;27:882-835.
98. Epidemiologia Clínica – Elementos essenciais. Fletcher RH, Fletcher SW, Wagner EH. Ed. Artmed, 3 ed, 1996.
99. Dairkee SH, Puett M, Hackett AJ. Expression of basal and luminal epithelium-specific keratins in normal, benign, and malignant breast tissue. *J Natl Cancer Inst.* 1988;80:691-695.

100. Guelstein VI, *et al.* Monoclonal antibody mapping of keratins 8 and 17 and of vimentin in normal human mammary gland, benign tumors, dysplasias and breast carcinoma. *Int. J. Cancer.* 1988;42:147-153.
101. Nagle RB, *et al.* Characterization of breast carcinomas by two monoclonal antibodies distinguishing myoepithelial from luminal epithelial cells. *J Histochem. Cytochem.* 1986;34:869-881.
102. Reis-Filho JS, Pinheiro C, Lambros MBK, Milanezi F, *et al.* EGFR amplification and lack of activation mutations in metaplastic breast carcinomas. *J Pathol.* 2006; 209: 445-453.
103. Westfall MD, Pietenpol JA. p63: molecular complexity in development and cancer. *Carcinogenesis.* 2004;25(6):857-64.
104. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, Easton D, Lakhani SR. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Research.* 2007;9:1-11 (page number not for citation purposes).

8. NORMAS ADOTADAS

Ficha catalográfica (descritores):

BIREME – Centro Latino-Americano e do Caribe de informações em Ciências da Saúde.

DeCs – Descritores em ciência da saúde: lista alfabética 2.ed. Rev. Amp. São Paulo: BIREME, 1992. 111p.

Relatório:

Normas para elaboração de Dissertação do Curso de Mestrado em Ciências Médicas. Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Mestrado em Ciências Médicas. Florianópolis-SC, 2001.

Referências:

Normas do Comitê Internacional de Editores de Revistas Médicas (Vancouver)
International Committee of Medical Journal Editors. Uniform requirements for manuscripts submitted to biomedical journals. Ann Inter Med 1997, 126:36-47.

França, J.L.; Borges, S.M.; Vasconcellos, A.C.; Magalhães, M.H.A. – Manual para normatização de publicações técnico-científicas. 4^aed., Editora UFMG, Belo Horizonte, 1998. 213p.

APÊNDICES

APÊNDICE 1

TMA 1 Daniella					
Testículo	01A	03A	04A	05A	TN (187)
6A	7A	8A	9A	10A	11A
1B	3B	4B	5B	6B	7B
TN (187)	8B	9B	10B	11B	TN (187)

TMA 2 Daniella					
Testículo	12A	13A	14A	15A	TN (192)
16A	17A	19A	20A	21A	22A
12B	13B	14B	15B	16B	17B
TN (192)	19B	20B	21B	22B	TN (192)

TMA 3 Daniella					
Testículo	23A	25A	26A	27A	TN (190)
28A	29A	30A	31A	32A	33A
23B	25B	26B	27B	28B	29B
TN (184)	30B	31B	32B	33B	TN (184)

TMA 4 Daniella					
Testículo	35A	36A	37A	38A	TN (184)
40A	42A	43A	44A	45A	46A
35B	36B	37B	38B	40B	42B
TN (184)	43B	44B	45B	46B	TN (184)

TMA 5 Daniella					
Testículo	48A	49A	51A	52A	TN (59)
54A	55A	56A	57A	59A	60A
48B	49B	51B	52B	54B	55B
TN (59)	56B	57B	59B	60B	TN (59)

TMA 6 Daniella					
Testículo	62A	62A	64A	65A	TN (59)
66A	67A	68A	69A	70A	71A
62B	63B	64B	65B	66B	x
TN (59)	68B	69B	70B	71B	TN (59)

TMA 7 Daniella					
Testículo	72A	73A	74A	75A	TN (67)
76A	77A	78A	79A	80A	81A
72B	73B	74B	75B	76B	77B
TN (67)	78B	79B	80B	81B	TN (67)

TMA 8 Daniella					
Testículo	84A	86A	87A	88A	TN (84)
90A	91A	92A	94A	95A	96A
84B	86B	87B	88B	90B	91B
TN (84)	92B	94B	95B	96B	TN (84)

TMA 9 Daniella					
Testículo	97A	98A	99A	101A	TN (84)
102A	103A	104A	105A	106A	107A
97B	98B	99B	101B	102B	103B
TN (84)	104B	105B	106B	107B	TN (84)

TMA 10 Daniella					
Testículo	108A	109A	110A	111A	TN (97)
112A	113A	114A	115A	116A	117A
108B	109B	110B	111B	112B	113B
TN (92)	114B	115B	116B	117B	TN (98)

TMA 11 Daniella					
Testículo	118A	119A	120A	121A	TN (69)
122A	123A	125A	127A	128A	129A
118B	119B	120B	121B	122B	123B
TN (140)	125B	127B	128B	129B	TN (140)

TMA 12 Daniella					
Testículo	130A	131A	133A	134A	TN (140)
135A	136A	137A	139A	140A	141A
130B	131B	133B	134B	135B	136B
TN (67)	137B	139B	140B	141B	TN (140)

TMA 13 Daniella					
Testículo	142A	143A	144A	145A	TN (148)
146A	148A	149A	150A	151A	152A
142B	143B	144B	145B	146B	148B
TN (165)	149B	150B	151B	152B	TN (165)

TMA 14 Daniella					
Testículo	153A	154A	155A	156A	TN 06/559-
157A	158A	159A	160A	162A	163A
153B	154B	155B	156B	157B	158B
TN 06/559-	159B	160B	162B	163B	TN 06/559-

TMA 15 Daniella					
Testículo	164A	165A	166A	168A	TN 6/559-7
169A	170A	172A	173A	174A	175A
164B	165B	166B	168B	169B	170B
TN 06/559-	172B	173B	174B	175B	TN 06/559-

TMA 16 Daniella					
Testículo	176A	177A	179A	180A	TN 06/559
181A	182A	183A	184A	185A	186A
176B	177B	179B	180B	181B	182B
TN 06/559	183B	184B	185B	186B	TN 06/559

TMA 17 Daniella					
Testículo	187A	188A	189A	190A	TN 06/559
191A	192A	193A	196A	187B	188B
189B	190B	191B	192B	193B	196B
TN 06/559	x	x	x	x	TN 06/559

TMA 18 Daniella					
Testículo	x	2A	24A	82A	TN 06/559
85A	132A	161A	167A	2B	24B
82B	85B	132B	161B	167B	x
TN 06/559	x	x	x	x	TN 06/559

Ponto de orientação do bloco

APÊNDICE 2

Informação Das Doentes com Carcinoma da Mama

Nº Caso no estudo _____
Nº do registo no SAP _____
Nº do prontuário do HU _____

1ª PARTE

Data do diagnóstico _____
 Data da última consulta _____
 Idade do diagnóstico _____
 Recidiva do Tumor: Sim _____ Não _____ Não referido _____
 Data/...../.....

Local da recidiva: _____

Óbito:

Sim _____ Não _____ Não referido _____

Data/...../.....

Tempo livre do doença:

Sim _____ Não _____ Não referido _____

Data/...../.....

Grupo étnico _____

Idade da Menarca _____

Idade Menopausa _____

História reprodutiva (Nº de gestações) _____

História familiar positiva para carcinoma de mama
 Sim _____ Não _____ Não referido _____

Determinar os membros da família com cancer de mama: _____

Quimioterapia pré-operatória:

Sim _____ Não _____ Não referido _____

2ª PARTE

Local de comprometimento:

Mama direita _____ Mama esquerda _____ Bilateral _____

Tamanho tumoral _____

Tipo Histológico _____

Presença de sinais de autólise

Sim _____ Não _____

Grau Histológico _____

Presença de invasão peri-neural

Sim _____ Não _____ Não referido _____

Presença de invasão vascular

Sim _____ Não _____ Não referido _____

Número de linfonodos isolados _____

Número de linfonodos comprometidos _____

Margem tumoral comprometida

Sim _____ Não _____ Não referido _____

Especificar a margem _____

Margem tumoral liver

Sim _____ Não _____ Não referido _____

Comprometimento de pele

Sim _____ Não _____ Não referido _____

Especificar o tipo de comprometimento _____

Classificação do subtipo tumoral _____

Resultado do estudo imunoistoquímico:

resultado	RE	c-erbB2	CK5	P63	P-caderina	EGFR	CK14
positivo							
negativo							

Observações _____

Estado:

VivoSemEvidênciaCânc VivoComEvidênciaCâncer Perda de Segmento

MortoSemEvidênciaCâncer MortoComEvidênciaCâncer

ANEXOS

ANEXO 1



Diretório dos Grupos de Pesquisa no Brasil



Grupo de Pesquisa Cagima



Identificação

Recursos Humanos

Linhas de Pesquisa

Indicadores do Grupo

Identificação

Dados básicos

Nome do grupo: Cagima

Status do grupo: **certificado pela instituição**

Ano de formação: 2000

Data da última atualização: 04/09/2006 11:01

Líder(es) do grupo: Luiz Carlos Zeferino - lczeferino@terra.com.br

Sophie Françoise Mauricette Derchain - derchain@supernet.com.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: 37889516

E-mail: zeferino@caism.unicamp.br

CEP: 13083881

UF: SP

Fax: 37889302

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: 13

[Cecilia Maria Roteli-Martins](#)

[Glauce Aparecida Pinto](#)

[Jose Vassallo](#)

[Julio Cesar Teixeira](#)

[Maria Salete Costa Gurgel](#)

[Rita Goreti Amaral](#)

[Rozany Mucha Duffloth](#)

[Silvia Helena Rabelo dos Santos](#)

[Liliana Aparecida Lucci De Angelo Andrade](#)

[Luís Otávio Zanatta Sarian](#)

[Luiz Carlos Zeferino](#)

[Sophie Françoise Mauricette Derchain](#)

[Sylvia Michelina Fernandes Brenna](#)

Estudantes	Total: 15
Adriana Cássia Paiva Santos	Nathalia Ellovitch
Amanda Olivia de Arruda	Raphael Augusto Pioli de Freitas
Anne Melina Ambrósio Avelar	Renata Clementino Gontijo
Claudia Cristina Camisão	Rosana Franco
Eliana Borin Lopes Montemor	Sabas Carlos Vieira
Joana Froes Bragança Bastos	Tatiane Fernandes
Karen Vicência Pingarilho Lombardelli	Vera Lúcia Rezende
Marcela Ponzio Pinto Silva	

Técnicos	Total: 10
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	

Linhas de pesquisa	Total: 3
<ul style="list-style-type: none">• Avaliação dos Procedimentos Diagnósticos e Terapêuticos do Câncer Ginecológico e Mamário• Epidemiologia e Prevenção do Câncer Ginecológico e Mamário• Mecanismos Celulares e Moleculares Envolvidos na Patogênese e na Progressão do Câncer Ginecológico e Mamário.	

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

Indicadores de recursos humanos do grupo	
Integrantes do grupo	Total
Pesquisador(es)	13
Estudante(s)	15
Técnico(s)	10

ANEXO 2



Instituto de Patologia e Imunologia Molecular
da Universidade do Porto

Rua Dr. Roberto Frias, s/n - 4200 PORTO - PORTUGAL

CERTIFICADO

Para os devidos efeitos certifico que a Dr^a Daniella Serafin Couto Vieira estagiou no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP) de 1 a 28 de Novembro de 2006.


Conforme pode se verificar no Relatório em Anexo, em todo o seu estágio a Dr^a Daniella Serafin Couto Vieira cumpriu um plano de trabalho com ênfase na construção de um banco de tumores de casos de carcinoma da mama através da técnica de Tissue Microarrays. Este banco de tumores será posteriormente utilizado em vários trabalhos de investigação conjuntos entre o IPATIMUP e o Departamento de Patologia e Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina. Este material também será utilizado no estudo da dissertação de mestrado da Dra. Daniella.

Para além do trabalho de construção do banco de tumores, a Dr^a Daniella Vieira participou activamente nas reuniões do Grupo de Patologia Mamária do IPATIMUP, perfazendo um total de 160 horas de estágio.

Em todas estas actividades a Dr^a Daniella Vieira mostrou um aproveitamento **MUITO BOM**.

Para finalizar, cumpre-me ainda referir as notáveis qualidades humanas reveladas pela a Dr^a Daniella no seu estágio entre nós.

Porto, 28 de Novembro de 2006


Prof. Fernando Coutinho
Professor, Assenteado, com agregação da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto
Investigador Sênior e Líder do Grupo de Patologia Mamária do IPATIMUP

**RELATÓRIO DE ATIVIDADES da Dra. Daniella Serafin Couto Vieira no
IPATIMUP**

Período: 1 a 28 de Novembro de 2006

- Atividades relacionadas ao estágio no *Cancer Genetics Lab – Breast Pathology*, Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP): Criação de Banco de tumores pela técnica de *Tissue Microarray* (TMA) dos casos selecionados para a dissertação de mestrado:

- Revisão de lâminas de tumores de mama e marcação de blocos correspondentes.
- Construção dos TMAs.
- Análise das lâminas em Hematoxilina e Eosina (HE) dos blocos de TMAs.
- Realização de Imunoistoquímica (IHC) dos blocos de TMAs.
- Leitura das lâminas de IHC.
- Revisão e atualização da Base de Dados.
- Decodificação da Base de Dados.
- Revisão de literatura atualizada, com ênfase em carcinoma da mama e a biologia molecular.
- Redação final do artigo de revisão intitulado: **CARCINOMA DA MAMA: NOVOS CONCEITOS NA CLASSIFICAÇÃO ANATOMO PATOLÓGICA**, a ser encaminhado para publicação na revista da Associação Médica Brasileira, como artigo de revisão, no início de 2007.

-Atividades relacionadas a rotina do Instituto de Patologia e Imunologia da Universidade do Porto (IPATIMUP):

- Participação em reunião semanal do grupo de Patologia mamária do *Cancer Genetics Lab*, IPATIMUP.
- Participação em reunião semanal do "Seminário Interno".
- Participação em reunião semanal no *Journal Club*.
- Participação no *II Gene Meeting*, Grupo de Estudo dos Tumores Neuroendócrinos, nos dias 17 e 18 de Novembro de 2006, IPATIMUP.



ASSOCIAÇÃO MÉDICA BRASILEIRA

São Paulo, 18 de janeiro de 2007.

Ilm^a. Sra.
Dra. Rozany Mucha Dufloth

Comunicamos que em 08 de janeiro de 2007 recebemos o artigo intitulado **“CARCINOMA DA MAMA: NOVOS CONCEITOS NA CLASSIFICAÇÃO ANATOMO PATOLÓGICA”**, protocolado sob o n.º 6614, de sua autoria, e que o mesmo será analisado pelo Conselho Editorial da Revista da Associação Médica Brasileira para possível publicação.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Bruno Caramelli
Editor da Revista da Associação
Médica Brasileira

ANEXO 3



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

PARECER CONSUBSTANCIADO - PROJETO Nº 141/2005

I - IDENTIFICAÇÃO

Título do projeto: "Expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais no carcinoma de mama: análise retrospectiva no período de 1994 a 2004, no serviço de anatomia do hospital universitário".

Área: Ciência da saúde

Pesquisador Responsável: Prof.^a Jodo Péricles da Silva Junior

Pesquisador Principal: Daniella Senafin Couto Vieira

Data da coleta dos dados: junho de 2005 a agosto de 2005

Instituição em que será realizado o estudo: Serviço de Anatomia Patológica (SAP) do Hospital Universitário - SC

II - Objetivos

Geral: Avaliar a expressão imuno-histoquímica dos marcadores hormonais no carcinoma de mama, nos blocos de parafina de material arquivado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Universitário da Universidade Federal de Santa Catarina, no período de 1994 a 2004, confrontando os dados obtidos com os achados regionais e dados da literatura.

III - SUMÁRIO DO PROJETO: Trata-se de um projeto de pesquisa do Programa de Pós-graduação na área de concentração de anatomia patológica. A mestranda realizará um estudo retrospectivo utilizando os blocos de parafina do banco de dados do serviço de anatomia patológica do Hospital Universitário da UFSC de pacientes com carcinoma de mama que foram submetidas à cirurgia de ressecção do tumor no período de 1994 a 2004.

IV - COMENTÁRIO: A pesquisa proposta no projeto possui relevância científica. O protocolo da pesquisa contém os documentos necessários para sua análise e exigidos pela legislação. Apresenta um orçamento, cronograma de atividades e os procedimentos experimentais da análise dos dados. Os pesquisadores listados no projeto possuem currículo condizente com o tema de investigação proposto. A pesquisa não necessita do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), mas apresenta a liberação do banco de dados da pessoa responsável.

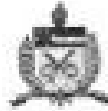
V - Parecer Final: Aprovado

Informamos que o parecer dos relatores foi aprovado por unanimidade, em reunião deste Comitê na data de 30 de maio de 2005.

Prof. Washington Péricles da Silva
Coordenador do Comitê de Controle
do Processo de Pesquisa - PROAP/UFSC

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

ANEXO 4



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Pré-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Fone: (048) 331-9206 - Fax: (048) 331-9599

Ofício nº 009/CEP/2005.

Florianópolis, 08 de junho de 2006.

Do: Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
Prof. Washington Portela de Souza

À: Dr. João Péricles da Silva Junior

Em maio de 2006 este comitê recebeu dos pesquisadores do projeto 141/05 intitulado "Expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais no carcinoma de mama: análise retrospectiva no período de 1994 a 2004, no serviço de anatomia do hospital universitário", ementa complementar. Este comitê acata e aprova o documento acima discriminados.

Atenciosamente,

Prof. Washington Portela de Souza

Prof. Washington Portela de Souza
Coordenador

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.