

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CÂMPUS DE BOTUCATU**

Francisco Alves Moraes Neto

**ANÁLISE DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DA CLASSIFICAÇÃO
HISTOLÓGICA DOS CARCINOMAS DA MAMA DE TIPOS LOBULAR
E DUCTAL E SUA RELAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR**

Dissertação de Mestrado

Orientadora: Profa. Dra. Rozany Mucha Dufloth
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Landèr Schmitt

**Botucatu – SP
2014**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE MEDICINA
CÂMPUS DE BOTUCATU**

Francisco Alves Moraes Neto

**ANÁLISE DA RELEVÂNCIA CLÍNICA DA CLASSIFICAÇÃO
HISTOLÓGICA DOS CARCINOMAS DA MAMA DE TIPOS LOBULAR
E DUCTAL E SUA RELAÇÃO COM A CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR**

Exame geral de qualificação apresentado ao Programa de Pós-graduação em patologia, Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre, área de concentração Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Rozany Mucha Dufloth
Co-orientador: Prof. Dr. Fernando Carlos de Landèr Schmitt

**Botucatu – SP
2014**

Dedicatória

*À minha esposa Cíntia e meu filho Artur
pelo amor, compreensão e apoio.*

Agradecimientos

Agradeço em primeiro lugar a Deus que me deu saúde para fazer esse trabalho.

Aos meus orientadores Prof^a Dr^a Rozany M. Dufloth e Prof. Dr. Fernando C.L. Schmitt, pela oportunidade e confiança.

A toda a equipe do Laboratório de Patologia do Hospital Amaral Carvalho onde a maior parte deste trabalho foi realizado.

E a toda a equipe do IPATIMUP onde foi realizada a técnica de tissue microarray.

Resumo



INTRODUÇÃO: O valor prognóstico da classificação molecular do carcinoma de mama recentemente proposta tem sido validado por numerosos estudos. Entretanto, a maioria destes trabalhos estudou o tipo histológico mais comum denominado carcinoma ductal invasivo usual (CDI), uma entidade reconhecidamente heterogênea. Poucos estudos concentraram-se especificamente em outros tipos histológicos como o carcinoma lobular invasivo (CLI) que é o tipo especial mais frequente. O CLI apresenta-se com características clínico-patológicas e história natural bastante distintas do CDI sendo claramente entidades biológicas diferentes. Além disso, é uma doença relativamente frequente com aumento de sua incidência no mundo.

OBJETIVO: Estudar comparativamente os subtipos moleculares luminais A e B de dois grupos de pacientes com CLI e CDI da mama, bem como determinar o valor prognóstico independente da classificação molecular nestes tumores correlacionando os subtipos moleculares com a sobrevida específica por carcinoma de mama (BCSS) e a sobrevida global (OS).

SUJEITOS E MÉTODOS: Estudo do tipo transversal analítico. Foram selecionados blocos de parafina de mulheres com diagnóstico histopatológico de CLI e CDI no Laboratório de Patologia do Hospital Amaral Carvalho (HAC), Jaú, São Paulo, Brasil. Os respectivos prontuários médicos e o Registro Hospital de Câncer (RHC) do HAC foram consultados para a pesquisa das informações clínicas e de seguimento destas mulheres (média de 121,77 e 131,27 meses para o CLI e CDI, respectivamente), totalizando 186 casos. Dos blocos doadores, foram extraídas duas amostras de 2 mm de diâmetro e depositadas nos blocos de parafina receptores usando *Tissue Microarray Builder* ab1802 (Abcam®, Cambridge, UK). Nestes cortes foi feita a pesquisa dos seguintes marcadores imunoistoquímicos: receptor de estrógeno α (RE), receptor de progesterona (RP), *HER2* e Ki67. Os subtipos moleculares (luminal A, luminal B, *HER2* e triplo negativo) foram determinados com base no perfil imunoistoquímico de cada tumor. As características clínico-patológicas foram analisadas descritivamente em frequência absoluta (n) e relativa (%). Os testes de qui-quadrado de Pearson e Yates e o teste t de Student foram usados para as correlações dos subtipos moleculares e variáveis clínico-patológicas com os

tipos histológicos. Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier foram construídas para comparar os prognósticos dos subtipos moleculares do CLI e CDI da mama. **RESULTADOS:** O estudo baseou-se na análise de dois grupos de mulheres com CLI (n=76) e CDI (n=110) da mama. Todos os casos de CLI foram do subtipo luminal sendo 54 luminais A (71,1%) e 22 luminais B (28,9%). Os casos de CDI apresentaram distribuição mais heterogênea sendo 65 do subtipo luminal A (59,1%), 26 luminais B (23,6%), 6 *HER2* (5,5%) e 13 triplo negativos (11,8%). Comparando as curvas de sobrevida, observou-se diferença prognóstica estatisticamente significativa entre os subtipos moleculares luminais A e B do CDI. Por outro lado, os subtipos moleculares luminais A e B do CLI não apresentaram diferença prognóstica. **CONCLUSÕES:** Este estudo mostrou que todos os casos de CLI foram do subtipo luminal e que a distinção entre luminal A e B não é significativa clinicamente neste tipo histológico. A rigor, a classificação molecular do carcinoma de mama, recentemente proposta, tem valor prognóstico independente no tipo histológico CDI, mas não no tipo histológico especial mais comum, o CLI, no que diz respeito aos subtipos luminais. Mais estudos clínico-patológicos são necessários para pesquisa e validação de novos biomarcadores prognósticos no tipo histológico CLI do carcinoma da mama.

Palavras-Chave: câncer de mama, carcinoma da mama, carcinoma ductal invasivo, carcinoma lobular invasivo, classificação molecular, imunoistoquímica, subtipo luminal A, subtipo luminal B.

Abstract



INTRODUCTION: The prognostic value of the molecular classification of breast cancer recently proposed has been validated by many studies. However, the great majority of these studies has focused on invasive ductal carcinoma no special type (IDC), a widely recognized heterogeneous entity. Few papers have studied other special types of breast cancer such as invasive lobular carcinoma (ILC) the most common special type. ILC shows clinico-pathological features and natural history quite distinctive from IDC being clearly separate biologic entities. Moreover, ILC is relatively frequent and has been increasing in incidence over the recent years. **OBJECTIVE:** to study comparatively the luminal molecular subtypes A e B of two groups of patients with ILC and IDC and to determine the prognostic independent value of the molecular classification in ILC patients by correlating the molecular subtypes with clinical outcomes such as breast cancer specific survival (BCSS) and overall survival (OS). **MATERIALS AND METHODS:** archival paraffin blocks from women diagnosed with ILC and IDC at the Pathology Laboratory of Hospital Amaral Carvalho, Jau, Sao Paulo, Brazil, were retrieved. Patient's charts and the Hospital Amaral Carvalho Cancer Registry were consulted for obtaining the staging and follow-up information (median 121.77 and 131.27 months for ILC and IDC, respectively) and 186 patients were selected. Two samples from each paraffin block were extracted to mount tissue microarray (TMA) blocks by using a *Tissue Microarray Builder* ab1802 (Abcam®, Cambridge, UK). The following immunohistochemical markers were performed in the TMA blocks: estrogen receptor α , progesterone receptor, *HER2* and Ki67 protein. The intrinsic molecular subtypes (luminal A, luminal B, *HER2* and triple negative) were determined based on the immunohistochemical profile of each tumor. Prognostic clinico-pathological features were analysed in absolute (n) and relative frequency (%). The tests of qui-square de Pearson and Yates and Student's t test were used for correlating the molecular subtypes and the clinico-pathological features with the histological types. Kaplan-Meier's survival curves were constructed for comparison of the prognosis of the ILCs and IDCs molecular subtypes. **RESULTS:** This study were based on analysis of two groups of women with ILC (n=76) and IDC (n=110) of the breast. All cases of

CLI were shown to be of luminal subtype, 54 luminal A (71.1%) and 22 luminal B (28.9%). The cases of IDC were more heterogeneous regarding the molecular subtype : 65 luminal A (59.1%), 26 luminal B (23.6%), 6 HER2 (5.5%) and 13 triple negative (11.8%). By comparing the survival curves, this study found prognostic difference between the molecular subtypes luminal A and B of IDCs. Whereas the ILCs of the same molecular subtypes showed no statistically difference in survival. **CONCLUSÕES:** This study showed that all cases of ILC were of luminal molecular subtype and found that the distinction between luminal A and B in this histological type of breast cancer has no clinical significance. In summary, the molecular classification of breast cancer recently proposed has prognostic independent value regarding the IDC of luminal subtype but not in the most common histologic special type, the ILC. More studies will be necessary to search and validate news prognostic biomarkers in the ILC histological type of breast cancer.

Key Words: breast cancer, carcinoma of the breast, invasive ductal carcinoma, invasive lobular carcinoma, molecular classification, immunohistochemistry, luminal A subtype, luminal B subtype.

*Lista de Símbolos, Siglas
e Abreviaturas*

ASCO/CAP -	American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists
BCSS -	<i>breast cancer specific survival</i> – sobrevida específica por carcinoma de mama
BRCA1 -	<i>breast cancer 1</i>
CDI -	carcinoma ductal invasivo
CLI -	carcinoma lobular invasivo
FISH -	hibridação <i>in situ</i> por fluorescência
HAC -	Hospital Amaral Carvalho
HE -	coloração hematoxilina-eosina
HER2 -	receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
Ki67 -	marcador de proliferação celular
LVI -	invasão linfovascular
OS -	<i>overall survival</i> – sobrevida global
PNI -	invasão perineural
RE -	receptor de estrógeno α
RHC -	Registro Hospitalar de Câncer
RP -	receptor de progesterona
TFFIP -	tecido fixado em formalina e incluído em parafina
TMA -	<i>Tissue microarray</i>
TNM -	estadiamento de tumores da American Joint Committee on Cancer (AJCC)

Sumário

1. INTRODUÇÃO	17
1.1 Epidemiologia do carcinoma de mama.....	18
1.2 Classificação histológica do carcinoma de mama	19
1.3 Fatores prognósticos e preditivos do carcinoma de mama.....	20
1.4 Classificação molecular do carcinoma de mama.....	23
1.5 Técnica de <i>tissue microarray</i> (TMA).....	26
1.6 Justificativa do Estudo.....	27
2. OBJETIVOS	28
2.1 Objetivo geral	29
2.2 Objetivos específicos.....	29
3. SUJEITOS E MÉTODOS	30
3.1 Tipo de estudo	31
3.2 Seleção de sujeitos	31
3.3 Critérios de exclusão.....	32
3.4 Técnica de TMA.....	33
3.5 Técnica imunohistoquímica.....	34
3.6 Técnica hibridação <i>in situ</i> por fluorescência (FISH)	37
4. ANÁLISE ESTATÍSTICA	39
5. RESULTADOS	41
6. DISCUSSÃO	65
7. CONCLUSÕES	70
8. COMENTÁRIOS FINAIS	75
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77
10. ANEXOS	83
ANEXO I - Ficha de coleta de dados	84
ANEXO II – Comitê de Ética.....	87

1. Introdução

1.1. EPIDEMIOLOGIA DO CARCINOMA DE MAMA

O carcinoma invasivo da mama é o carcinoma mais comum em mulheres no mundo correspondendo a 23% de todos os carcinomas femininos¹. Existe grande variação geográfica da sua incidência sendo mais comum em países desenvolvidos (América do Norte, Europa e Austrália) onde 6% das mulheres desenvolvem carcinoma de mama antes dos 75 anos¹.

A incidência da doença aumentava anualmente no mundo até o início dos anos 1980 e continua a aumentar nos países em desenvolvimento. Nos países desenvolvidos no entanto as taxas estabilizaram-se e passaram a declinar como resultado principalmente do rastreamento mamográfico populacional e da redução do uso de terapia de reposição hormonal e atualmente apresentam uma incidência anual de 70-90 casos novos da doença a cada 100.000 habitantes¹.

O aumento da mortalidade por carcinoma de mama nos países desenvolvidos com alta incidência da doença até a década de 1980 foi revertido com a detecção precoce obtida pelo rastreamento populacional e a introdução de terapias sistêmicas adjuvantes (hormonioterapia e quimioterapia)¹. Nos países em desenvolvimento no entanto as taxas de mortalidade continuam elevadas devido principalmente ao diagnóstico da doença em estadios avançados e a falta ou ineficiência dos programas de rastreamento populacional².

No Brasil estima-se que em 2014 haverá 57.120 casos novos da doença com um risco estimado de 56 casos novos a cada 100.000 mulheres³. Em 2011, 13.225 mulheres morreram de carcinoma de mama no Brasil⁴.

O Hospital Amaral Carvalho (HAC), Jaú, São Paulo, Brasil é centro de referência em oncologia no interior do Estado de São Paulo atendendo pacientes referenciadas de cerca de 500 municípios da região centroeste paulista. Localizado na cidade de Jaú, foi o primeiro centro médico especializado em oncologia do interior. Desde 1996 mantém o Registro Hospitalar de Câncer (RHC), participando das estatísticas nacionais de câncer publicadas pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA). A incidência da doença na população atendida em Jaú foi de 55 casos novos a cada 100.000 habitantes. De 1996 a 2010 foram diagnosticados 6.650 casos novos de carcinoma de mama no HAC.

1.2. CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CARCINOMA DE MAMA

Classicamente, o carcinoma invasivo da mama é dividido em tipos histológicos englobando mais de vinte entidades com características clínico-patológicas, histórias naturais e respostas terapêuticas distintas¹.

O tipo histológico mais comum correspondendo a 50-80% dos casos é o carcinoma ductal invasivo usual (CDI). Este no entanto é essencialmente diagnóstico de exclusão de outros tipos histológicos denominados tipos

especiais. Consequentemente, trata-se de entidade bastante heterogênea muito possivelmente consistindo de várias doenças distintas¹.

O tipo histológico especial mais comum é o carcinoma lobular invasivo (CLI) que corresponde a 5-15% dos casos¹. Vários estudos mostram uma tendência de aumento de sua incidência nas últimas décadas⁵. Comparativamente ao CDI, o CLI apresenta características clínico-patológicas bastante distintas, acometem mulheres mais idosas, os tumores são maiores e apresentam frequência maior de multicentricidade e bilateralidade. Invasão linfovascular (LVI) é menos comum no CLI e o padrão de disseminação metastática notavelmente distinto com comprometimento de sítios incomuns como trato gastrintestinal, útero, meninges, ovário e superfícies serosas⁶. Caracteristicamente, o CLI mostra perda de expressão da molécula de adesão celular E-caderina em cerca de 86% dos casos⁷. Contrariamente, o CDI exibe expressão de E-caderina em virtualmente todos os casos embora com menor intensidade e distribuição nos tumores pouco diferenciados⁷.

1.3. FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS DO CARCINOMA DE MAMA

Fator prognóstico refere-se a qualquer característica de uma mulher ou de seu tumor que prediz a história natural do tumor e fator preditivo refere-se a qualquer característica da mulher ou do tumor que se correlaciona com a resposta ou ausência de resposta a tratamento específico⁸.

O tratamento básico do carcinoma de mama consiste no controle locorregional da doença através de cirurgia (mastectomia ou cirurgia conservadora da mama), linfadenectomia axilar ou biópsia do linfonodo sentinela e radioterapia do leito tumoral e da axila. A terapia sistêmica (neoadjuvante, adjuvante ou paliativa) consiste de quimioterapia, hormonioterapia e terapia-alvo (trastuzumab e lapatinib). Os fatores prognósticos clássicos tradicionalmente usados por oncologistas e radioterapeutas para a seleção do tratamento da paciente têm sido o estadiamento TNM. O estadiamento TNM, publicado periodicamente pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e atualmente na sua 7ª edição⁹, consiste de três variáveis tempo-dependentes do tumor: o tamanho do tumor primário, número de linfonodos axilares comprometidos e presença de metástase.

Cabe destacar, que as taxas de sobrevida em dez anos para tumores menores que 1 cm (T1), 1 a 2 cm (T2) e 2 a 5 cm (T3) são de 90%, 75% e 60% respectivamente⁸. Com relação ao *status* nodal axilar, 70% das pacientes com linfonodos comprometidos apresentam recidiva da doença em dez anos comparado a 15 a 30% das mulheres com axila negativa⁸. No entanto, para tumores em estágio inicial, outros fatores prognósticos baseados nas características biológicas inerentes ao tumor são utilizados na escolha do tratamento tais como: tipo histológico¹⁰, grau histológico¹¹, índice de proliferação celular Ki67¹², presença de invasão linfovascular¹³, status das margens cirúrgicas, presença e extensão de carcinoma *in situ* bem como idade da paciente, história familiar e status de menopausa⁸.

Os fatores preditivos clássicos de resposta terapêutica no carcinoma de mama são o *status* hormonal e do receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER2*). Vale salientar, que estes biomarcadores são também fatores prognósticos⁸.

O RE é um fator de transcrição nuclear que tem sido estudado no carcinoma de mama desde o início dos anos 1970. Até meados dos anos 1990, sua expressão era determinada por métodos bioquímicos (*ligand-binding assays*) em extratos de tecido fresco congelado. Baseados nesta técnica vários estudos mostraram que a expressão de RE era um fator prognóstico favorável em pacientes com carcinoma de mama e principalmente um fator preditivo forte de resposta clínica à terapia endócrina (tamoxifeno)¹⁴.

Devido ao seu alto custo, a partir do início dos anos 1990 os métodos bioquímicos foram gradualmente substituídos pelo método imunoistoquímico em tecido fixado em formalina e incluído em parafina (TFFIP), que é atualmente o método empregado na avaliação da expressão do RE¹⁴.

A expressão do RP tem sido rotineiramente avaliada por imunoistoquímica. Sua expressão é regulada pelo RE e indicativa de integridade da via metabólica RE-RP¹⁴. A expressão do RP mostra alta correlação com o RE e a coexpressão de ambos em 50% dos casos de carcinoma de mama está associada a maior resposta ao tratamento hormonal. A não expressão de ambos correlaciona-se com falta de resposta terapêutica^{8,14}.

O gene *HER2* (ERBB2) localiza-se no cromossomo 17 e codifica um receptor de fator de crescimento na superfície das células epiteliais mamárias normais. Sua amplificação correlaciona-se com a sobre-expressão de uma proteína na membrana citoplasmática das células tumorais. O *status* do gene *HER2* é usualmente determinado por hibridação *in situ* por fluorescência (FISH) e da proteína por imunistoquímica, ambos em TFFIP. Estudos mostram que ambos os métodos apresentam eficácia clínica equivalente desde que seja seguida uma metodologia rigorosa para sua avaliação¹⁵. A sobre-expressão/amplificação do gene *HER2* é fator prognóstico desfavorável e preditivo de resposta terapêutica à terapia-alvo (trastuzumab e lapatinib)^{8,14}.

Comparativamente ao CDI, o CLI expressa mais frequentemente RE e RP (82-93%^{16,37} no CLI versus 75-80% no CDI¹⁴). Treze a vinte por cento dos CDIs exibem sobre-expressão/amplificação do gene *HER2*⁸. O CLI é em geral negativo para *HER2* mas pode mostrar expressão em até 15% dos casos, principalmente a variante pleomórfica⁵.

1.4. CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CARCINOMA DE MAMA

Recentemente, uma nova classificação do carcinoma de mama foi proposta baseada no perfil de expressão gênica dos tumores. A base conceitual do estudo pioneiro de Perou et al¹⁷ foi que a heterogeneidade fenotípica do carcinoma de mama pode ser melhor compreendida através do estudo simultâneo de centenas ou milhares de biomarcadores e não

individualmente como se fazia até então. Utilizando técnicas moleculares de alta performance (*high-throughput*) denominadas *microarrays* de DNA complementar (cDNA) [plataforma sólida com arranjo ordenado de moléculas de DNA de sequências conhecidas (sondas) obtidas a partir de amostras de RNA tumoral fresco congelado], novas técnicas de bioinformática (*hierarchical cluster analysis*) e baseados na expressão diferencial de um conjunto de 496 genes incluindo o gene do RE, os autores foram capazes de separar os tumores em quatro categorias distintas: luminal, *HER2*, *basal-like* e *normal breast*. O subtipo molecular luminal caracterizou-se por apresentar expressão aumentada do gene RE e de um conjunto de genes normalmente expressos em células epiteliais luminais mamárias; o subtipo *HER2* pela amplificação do gene *HER2* e de um conjunto distinto de genes; o subtipo *basal-like* mostrou expressão aumentada de genes associados às células epiteliais basais mamárias incluindo as citoqueratinas 5 e 7; e o subtipo *normal breast* apresentou alta expressão de genes característicos de células epiteliais basais e células adiposas e baixa expressão de genes associados a células epiteliais luminais. Vale salientar que os três últimos subtipos apresentavam expressão baixa ou ausente do gene RE.

Posteriormente, os mesmos autores, empregando metodologia semelhante à publicação original, estudaram 534 genes e baseados no padrão de expressão diferencial de conjuntos distintos destes genes, subdividiram o grupo luminal em duas categorias (luminais A e B) e comprovaram o valor prognóstico da classificação correlacionando os subtipos moleculares “intrínsecos” com a evolução clínica em amostras de dois grupos

independentes de pacientes¹⁸. O grupo luminal A apresentou o melhor prognóstico, os grupos *HER2* e *basal-like*, o pior, e o grupo luminal B prognóstico intermediário. O estudo revelou também forte correlação da mutação no gene *BRCA1* com o subtipo molecular *basal-like*.

Desde então a terminologia proposta por Perou et al foi gradualmente incorporada ao léxico de patologistas, mastologistas e oncologistas de todo o mundo. Subsequentemente, outros subtipos moleculares do carcinoma de mama foram descritos incluindo os subtipos apócrino¹⁹ e *claudin-low*²⁰.

Devido ao alto custo de técnicas moleculares, estudos posteriores buscaram identificar e validar marcadores imunoistoquímicos alternativos (*surrogate markers*)²¹. Em 2011 na Conferência Internacional de Consenso do Carcinoma de Mama St Gallen²², um painel de *experts* recomendou definições clínico-patológicas alternativas para os subtipos moleculares.

O subtipo luminal A caracterizou-se pela expressão de RE e/ou RP, *HER2* negativo e índice de proliferação celular Ki67 baixo (<14%). O subtipo luminal B diferia inicialmente do luminal A pelo Ki67 alto (≥14%) e/ou pela sobre-expressão/amplificação do gene *HER2*. O subtipo *HER2* apresentava ausência de expressão de RE e RP e sobre-expressão/amplificação do *HER2* e o subtipo *basal-like* caracterizava-se pelo perfil triplo negativo i.e. RE - /RP - /*HER2*-. A conferência mais recente (2013) modificou as definições para os subtipos moleculares luminais: luminal A seria apenas os tumores que coexpressam RE e RP, *HER2* negativos e com Ki67 baixo (<20%). Luminal B os tumores que expressam RE, muito pouco ou não expressam RP, *HER2* + ou - e com Ki67 alto (≥20%)²³.

A rigor, a maioria dos estudos analisou casos de CDI ou uma mistura de CDIs e tipos histológicos especiais e poucos estudaram especificamente os últimos. Bertucci et al²⁴ estudaram comparativamente 29 CDIs e 21 CLIs e demonstraram perfis de expressão gênica distintos. Jung et al²⁵ estudaram 83 pacientes com CLI e mostraram que o perfil imunoistoquímico da maioria dos casos era do subtipo luminal A.

1.5. TÉCNICA DE *TISSUE MICROARRAY* (TMA)

A técnica de *tissue microarray* (TMA) foi inicialmente descrita por Wan et al²⁶ em 1987 e popularizada em 1998 por Kononen et al²⁷. Consiste de bloco de parafina com arranjo ordenado de fragmentos teciduais obtidos de dezenas ou centenas de blocos de parafina convencionais. Trata-se de técnica de alta performance permitindo que a expressão de dezenas ou centenas de genes ou proteínas sejam estudadas através de hibridação *in situ* ou imunoistoquímica, respectivamente. Sua aplicação em pesquisa possibilita a correlação de biomarcadores com características clínico-patológicas ou desfechos clínicos em grande número de casos a um custo significativamente menor que a técnica tradicional em que um marcador é estudado em cada lâmina. Estudos mostram que a principal limitação do TMA, a perda de informação em uma amostra pequena devido à heterogeneidade tumoral, não compromete a eficácia da técnica quando grande número de casos são estudados²⁸.

1.6. JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Numerosos estudos têm validado o valor prognóstico independente da classificação molecular recentemente proposta para o CDI, o tipo histológico mais comum de carcinoma de mama. Alguns estudos mostram que o CLI, o tipo histológico especial mais frequente, exibe na grande maioria dos casos um perfil molecular do tipo luminal. No entanto não existem estudos mostrando o valor prognóstico independente dos subtipos moleculares no CLI da mama.

2. *Objetivos*

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar comparativamente os subtipos moleculares luminais A e B de dois grupos de pacientes com CLI e CDI da mama, bem como determinar o valor prognóstico independente da classificação molecular nestes tumores correlacionando os subtipos moleculares com os indicadores de sobrevida BCSS e OS.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 2.2.1 Determinar os subtipos moleculares do CLI e CDI da mama com base nos seguintes marcadores imunoistoquímicos: RE, RP, *HER2* e Ki67.
 - 2.2.2 Correlacionar os subtipos moleculares luminais A e B dos casos de CLI e CDI da mama com os seguintes fatores prognósticos clássicos: idade, estadiamento patológico, tamanho do tumor, status nodal, tipo de tratamento cirúrgico, tratamentos radioterápico, quimioterápico ou hormonal, grau histológico, invasão linfovascular (LVI) e invasão perineural (PNI).
 - 2.2.3 Determinar o valor prognóstico independente dos subtipos moleculares luminais A e B do CLI e CDI correlacionando estes subtipos moleculares com BCSS e OS.
-

3. Sujeitos e Métodos

3.1. TIPO DE ESTUDO

Este estudo foi do tipo transversal analítico e faz parte de linha de pesquisa em Oncopatologia do Programa de Pós-graduação em Patologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, São Paulo/Brasil e em colaboração com o Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), Porto/Portugal e a Universidade de Toronto, Canadá.

3.2. SELEÇÃO DE SUJEITOS

Os laudos dos exames anatomopatológicos de mulheres atendidas no HAC nos períodos de outubro de 1997 até outubro de 2009 (CLI) e janeiro de 2000 até abril de 2001 (CDI) foram consultados pelo pesquisador (FAMN), bem como os prontuários médicos destas pacientes e o RHC do HAC, onde foram obtidas as informações de estadiamento e seguimento das mulheres. Foram selecionadas consecutivamente 297 mulheres que foram admitidas no estudo por apresentarem diagnóstico de CLI (n=147) e CDI (n=150) primários da mama cujos laudos foram emitidos pelos médicos patologistas do Laboratório de Anatomia Patológica do HAC, sendo que aplicando-se os critérios de exclusão, foram incluídas no estudo 186 mulheres. Estas mulheres tinham entre 20 e 86 anos ao diagnóstico. Todas as lâminas de arquivo destes 186 casos foram examinadas e um ou dois blocos de parafina de cada caso foram selecionados constituindo os blocos doadores. Para confirmação diagnóstica, dois cortes histológicos de cada bloco foram feitos e corados pelas técnicas de

Hematoxilina-Eosina (HE) e imunohistoquímica para E-caderina utilizando-se uma placa fria (Leica 11 EG1160, Germany) e um micrótomo (Leica RM2255, Germany). Todos os casos foram reclassificados, graduados seguindo os critérios de Nottingham²⁸ e a presença ou ausência de LVI (peritumoral) e PNI foi determinada. Para o estadiamento patológico foi utilizado os critérios da AJCC TNM 7th Edition 2009⁹.

Os critérios para classificar os casos como CLI ou CDI foram as características histopatológicas de acordo com as definições da WHO¹ e a presença ou ausência de expressão imunohistoquímica em padrão membrana de E-caderina.

3.3. CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídas as mulheres que tinham doença metastática no momento da apresentação (CLI=10; CDI=2) ou tivessem recebido quimioterapia neoadjuvante (CLI=13; CDI=26), bem como as que não receberam tratamento curativo (portanto sem cirurgia e sem informação do *status* axilar) (CLI=4), e as mulheres com óbito por outro tipo de câncer ou causa indeterminada (CLI=1; CDI=4), sem dados ou seguimento inferior a 3 anos (CLI=9; CDI=4) e as com RE, RP, HER2, Ki67 desconhecidos por falta de informação do TMA (CLI=34; CDI=4).

3.4. TÉCNICA DE TMA

A técnica de TMA foi realizada no Instituto de Patologia e Imunologia Molecular da Universidade do Porto (IPATIMUP), seguindo protocolo padrão da instituição e descrito resumidamente a seguir: duas áreas representativas das lâminas coradas pelo HE e dos blocos de parafina correspondentes foram marcadas com caneta para delimitar as áreas de extração do tecido para composição dos blocos de TMA. Dessa forma, dois cilindros de 2 mm de diâmetro de cada caso foram extraídos dos blocos doadores e depositados nos blocos receptores de TMAs. Os blocos de parafina receptores de TMAs foram construídos no *Tissue Microarray Builder* ab1802 (Abcam®, Cambridge, UK), composto por um molde de vinte e quatro cilindros e por uma seringa extratora (*punch-extractor*). Em cada bloco receptor foi colocado um cilindro de tecido normal (próstata, tireoide, etc) para servir de controle interno das colorações imunohistoquímicas bem como para orientação espacial do TMA. Quatorze blocos de TMAs contendo duas amostras de cada caso de CLI foram construídos bem como quatorze blocos com duas amostras de cada caso de CDI. Foi confeccionada uma lâmina de cada bloco de TMA, corada em HE, para confirmação da presença de tumor.

3.5. TÉCNICA IMUNOISTOQUÍMICA

A pesquisa da expressão dos marcadores imunohistoquímicos estudados foi feita no Laboratório de imunohistoquímica do Departamento de Patologia do HAC por técnica imunohistoquímica manual nas lâminas obtidas pela técnica de TMA (exceto para o marcador E-caderina que foi utilizado cortes histológicos convencionais), seguindo protocolo padrão da instituição e descrito resumidamente a seguir: lâminas com revestimento adesivo próprias para coloração imunohistoquímica (Superfrost®Plus, Germany) contendo cortes histológicos de 3µ de cada bloco de TMA foram confeccionadas, desparafinizadas em estufa a 58°C por três horas, reidratadas em três banhos em xilol de 5' cada, dois banhos em álcool 96% e mais dois banhos em álcool 70% e submetidas à técnica de recuperação antigênica com panela de pressão Pascal® Dako (USA) em solução tampão citrato pH 7 (Target® Dako) ou EDTA pH 8 por 45'. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos monoclonais primários por 30'. Os clones, fabricantes, diluições e métodos de recuperação empregados estão descritos na tabela 1.

Tabela 1 - Anticorpos usados no estudo imunohistoquímico.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante	Recuperação
E-caderina	NCH-38	1:100	Dako	Citrato pH6
RE	SP1	1:100	Spring	Citrato pH6
RP	SP42	1:200	Spring	Citrato pH6
HER2	SP3	1:200	Spring	Citrato pH6
Ki67	MIB-1	1:200	Dako	EDTA

Após a incubação com os anticorpos primários, as lâminas foram então lavadas em solução salina tamponada (PBS) e incubadas com o polímero Histofine® Universal Immuno-peroxidase Polymer, Anti-Mouse and – Rabbit (Nichirei, Tokyo, Japan) por 30'. As lâminas foram novamente lavadas em PBS e incubadas com Diaminobenzidina (DAB, Dako, USA) por 1' para revelação da reação imunoistoquímica e contracoloradas com hematoxilina (30"). Controles positivos e negativos (omissão do anticorpo primário) externos foram incluídos para validação da reação imunoistoquímica. Todas as lâminas foram examinadas independentemente por dois patologistas *Senior* (RD e FAMN). As diferenças de interpretação foram solucionadas em microscópio óptico para múltiplos observadores (BX50 Olympus, Japan).

Para o RE e RP foi considerado positivo a marcação nuclear de qualquer intensidade em $\geq 1\%$ das células tumorais como preconizado pela ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists)²⁹. Para o *HER2* foram também utilizados os critérios estabelecidos pela ASCO-CAP e descritos na tabela 2. A E-caderina foi considerada positiva a marcação de membrana de qualquer intensidade das células tumorais.

Tabela 2 - Critérios estabelecidos pela ASCO-CAP para HER2.

HER2	Descrição
Escore 0	Nenhuma coloração observada ou coloração de membrana incompleta e fraca/pouco perceptível em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas
Escore 1+	Coloração de membrana incompleta e fraca/pouco perceptível em $> 10\%$ das células tumorais invasivas.
Escore 2+	Coloração de membrana circunferencial incompleta e/ou fraca/moderada em $> 10\%$ das células tumorais invasivas; ou coloração de membrana completa e circunferencial intensa em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas.
Escore 3+	Coloração de membrana circunferencial completa e intensa em $> 10\%$ das células tumorais invasivas

Ref: ASCO-CAP Test Guideline 2013.

O índice de proliferação celular Ki67 foi determinado através de contagem com retículo graduado inserido na ocular de um microscópio óptico (BX50 Olympus, Japan), considerando-se a porcentagem de células exibindo coloração nuclear de qualquer intensidade em 100 células tumorais na área mais proliferativa (“hot spot”). O *cut-off* de 20%, recentemente recomendado pela *13th St Gallen Consensus Conference 2013*²³, foi usado para dividir os casos em com baixo índice de proliferação celular ($< 20\%$) e alto índice de proliferação celular ($\geq 20\%$).

Os tumores foram classificados segundo a classificação molecular (*St Gallen Consensus Conference 2013*²³) em quatro subtipos mostrados na tabela 3.

Tabela 3 - Classificação molecular.

Subtipo molecular	RE	RP	HER2	Ki67
Luminal A	+	+	-	≤ 20%
Luminal B	+	+/-	-	> 20%
	+	+/-	+	qualquer
HER2	-	-	+	qualquer
Triplo-negativo	-	-	-	qualquer

RE (Receptor de estrógeno); RP(receptor de progesterona); HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2); Ki67 (índice de proliferação celular)
Ref: St Gallen Consensus Conference 2013.

3.6. HIBRIDAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

Todos os casos *HER2* positivos 2+ foram submetidos ao teste de FISH para pesquisa da amplificação do gene *HER2* conforme recomendação da ASCO-CAP¹⁵.

Foi utilizado o Kit *HER2* FISH® (Dako, USA). Os cortes histológicos foram desparafinizados e reidratados conforme descrição na imunistoquímica. As lâminas foram então mergulhadas por 3' na solução tampão de lavagem do kit e incubadas em banho maria a 95° com a solução de pré-tratamento do mesmo kit por 10'. As lâminas foram a seguir lavadas na solução tampão (dois banhos de 3' a temperatura ambiente). O excesso de solução tampão foi removido e 5 a 8 gotas de Pepsina foram aplicadas sobre os cortes histológicos e incubadas por 10' a temperatura ambiente. As lâminas foram novamente lavadas com a solução tampão (2 banhos de 3' a temperatura ambiente), desidratadas em três soluções de álcool a 70%, 85% e 96% por 2' cada e

deixadas secar ao ar livre. Aplicação de 10 µL da sonda de DNA e colocação de lamínula e selante em toda a periferia da lamínula. As lâminas foram então colocadas no Hibridizador (Hibridizer® Dako, USA) e submetidas a programa de desnaturação a 82° por 5' e hibridação overnight (18 horas) a 45°. Remoção do selante e da lamínula e incubação com a solução de estringência do kit a 65° por 10'. Lavagem das lâminas na solução tampão (2 banhos de 3' a temperatura ambiente), desidratação em três soluções graduadas de álcool 70%, 85% e 96% por 2' cada, secagem ao ar livre e por fim a aplicação de 15µL de meio de montagem fluorescente DAPI que acompanha o kit e cobertura da lâmina com lamínula para leitura no microscópio de fluorescência.

Foram utilizadas duas sondas de DNA de cores vermelha e verde correspondendo ao HER2 e ao centrômero do cromossomo 17 (CEN-17) respectivamente. Foi considerado amplificado quando a relação HER2/CEN-17 for superior a 2.2 conforme recomendação do ASCO-CAP¹⁵.

4. Análise Estatística

BCSS foi definida como o período de tempo entre as datas da cirurgia e da morte da mulher por carcinoma de mama ou censurado na data da última consulta ou do óbito da paciente por outras causas exceto câncer.

OS foi definida como o período de tempo entre as datas da cirurgia e da morte da mulher por qualquer causa ou censurado na data da última consulta.

Inicialmente foram comparadas diversas características clínico-patológicas segundo o tipo histológico (CLI ou CDI) utilizando-se o teste qui-quadrado de Pearson para tabelas de dimensão geral e o teste qui-quadrado de Yates (com correção de continuidade) para tabelas de dimensão 2x2. Para a comparação das médias de idade utilizou-se o teste paramétrico t-Student para grupos independentes³⁰. Em seguida foram comparadas as mesmas características segundo o tipo histológico, especificamente para pacientes com os subtipos moleculares luminais A e B, separadamente. O teste exato de Fisher foi utilizado quando o teste qui-quadrado de Yates para tabelas 2x2 não pode ser aplicado.

Para a análise do tempo até a ocorrência de óbito por carcinoma de mama ou de óbito por qualquer causa foi utilizado o método de Kaplan-Meier para estimar as taxas de sobrevida e a comparação entre os tipos histológicos foi feita utilizando-se o teste de *log rank*³¹. Em seguida, foram feitas análises específicas para os subtipos moleculares luminais A e B comparando-se os dois tipos histológicos, bem como análises específicas para os tipos histológicos CDI e CLI comparando-se os dois subtipos moleculares.

O nível de significância considerado foi de 5% ($\alpha=0,05$) e os softwares utilizados foram o SPSS v. 20.0 e o Stata v. 7.0.

5. Resultados

Após a aplicação dos critérios de exclusão, 186 dos 299 casos inicialmente admitidos permaneceram no estudo sendo 76 CLIs e 110 CDIs.

Setenta e sete casos de CLI (92,1%) foram negativos para E-caderina e 6 casos (7,9%) mostraram expressão deste marcador em padrão membrana. Todos os casos de CDI apresentaram expressão forte e difusa para E-caderina sendo que apenas um com < de 10% das células tumorais positivas.

Fotomicrografias representativas de casos de CLI e CDI dos subtipos moleculares luminais A e B são mostradas nas figuras 1 a 5.

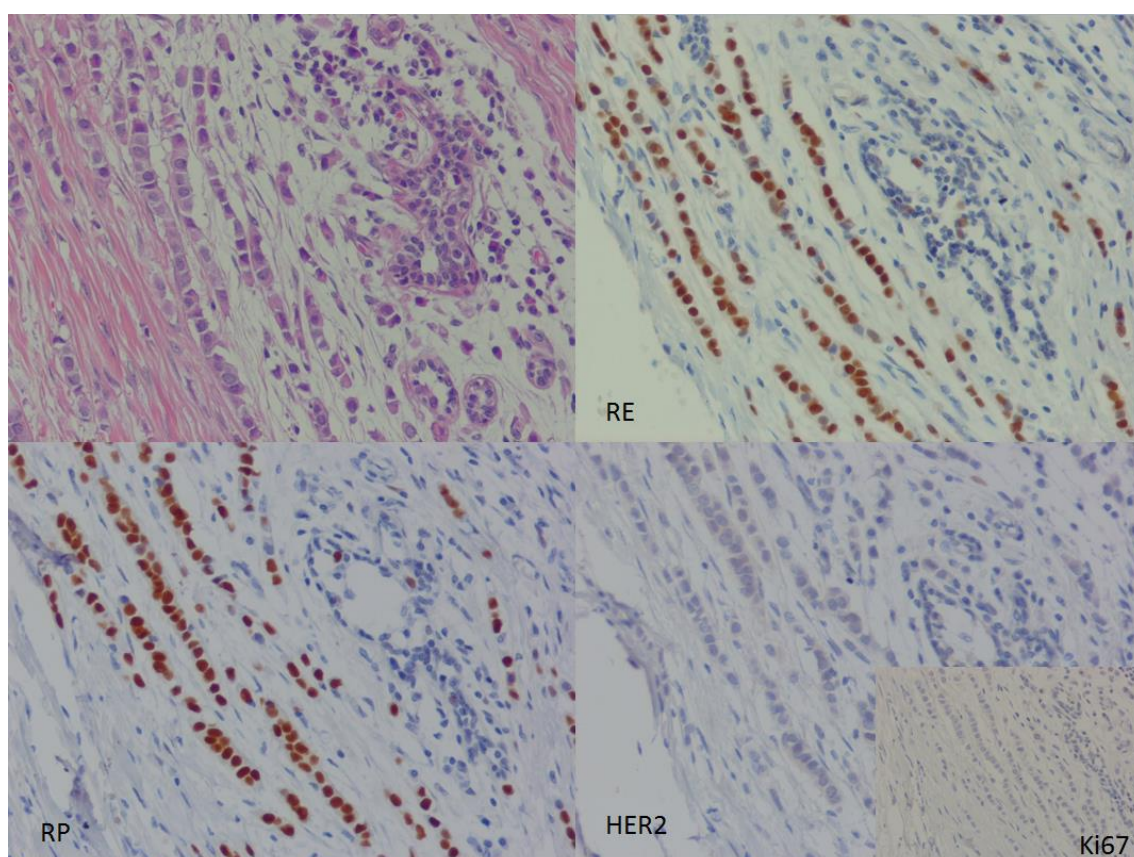


Figura 1 - CLI tipo clássico de subtipo molecular luminal A (200X).

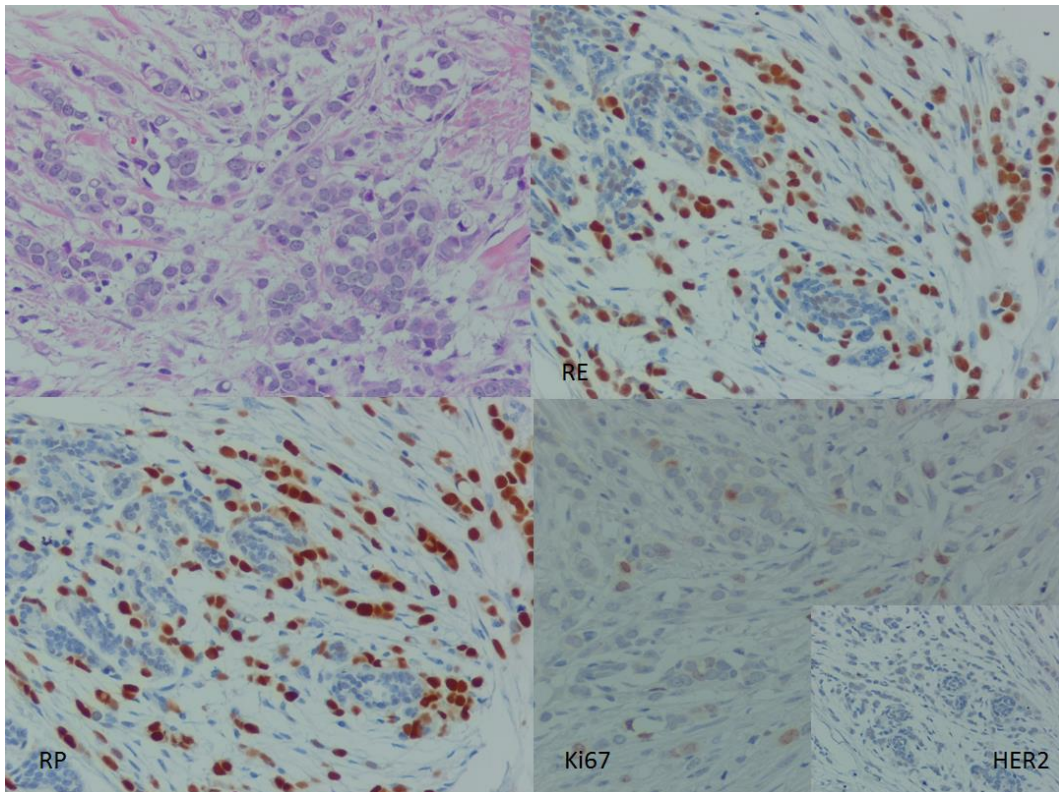


Figura 2 - CLI tipo clásico de subtipo molecular luminal B (Ki67=21%) (200x).

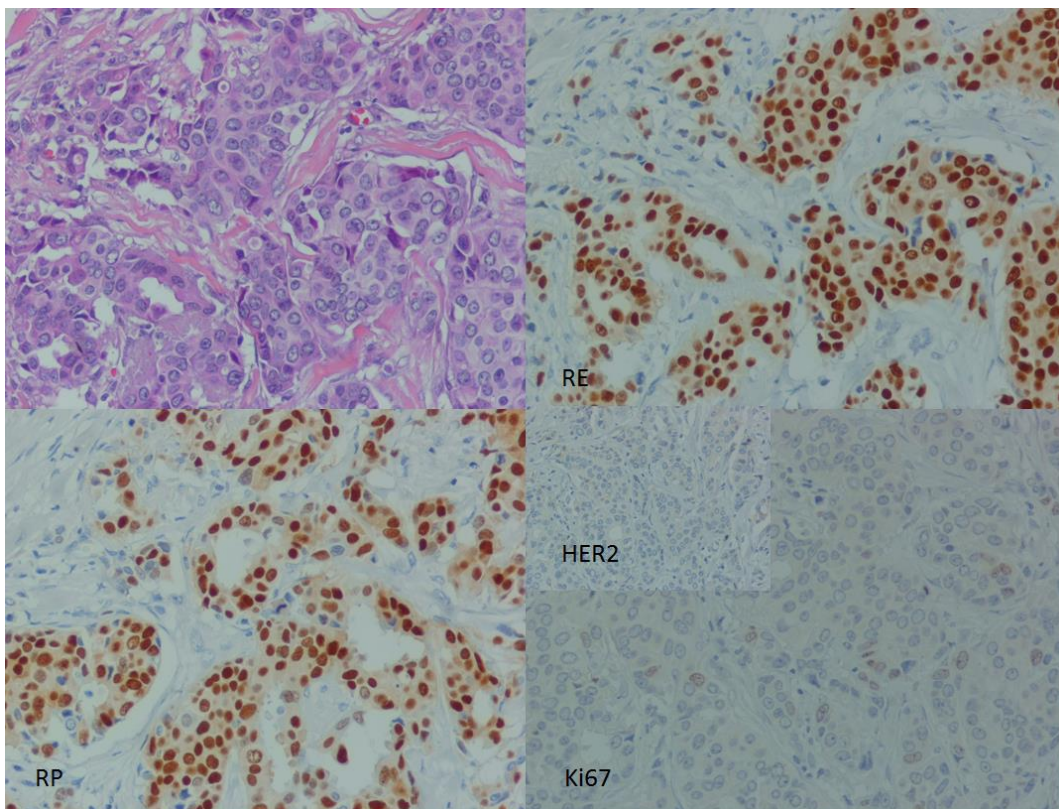


Figura 3 - CDI de subtipo molecular luminal A (200X).

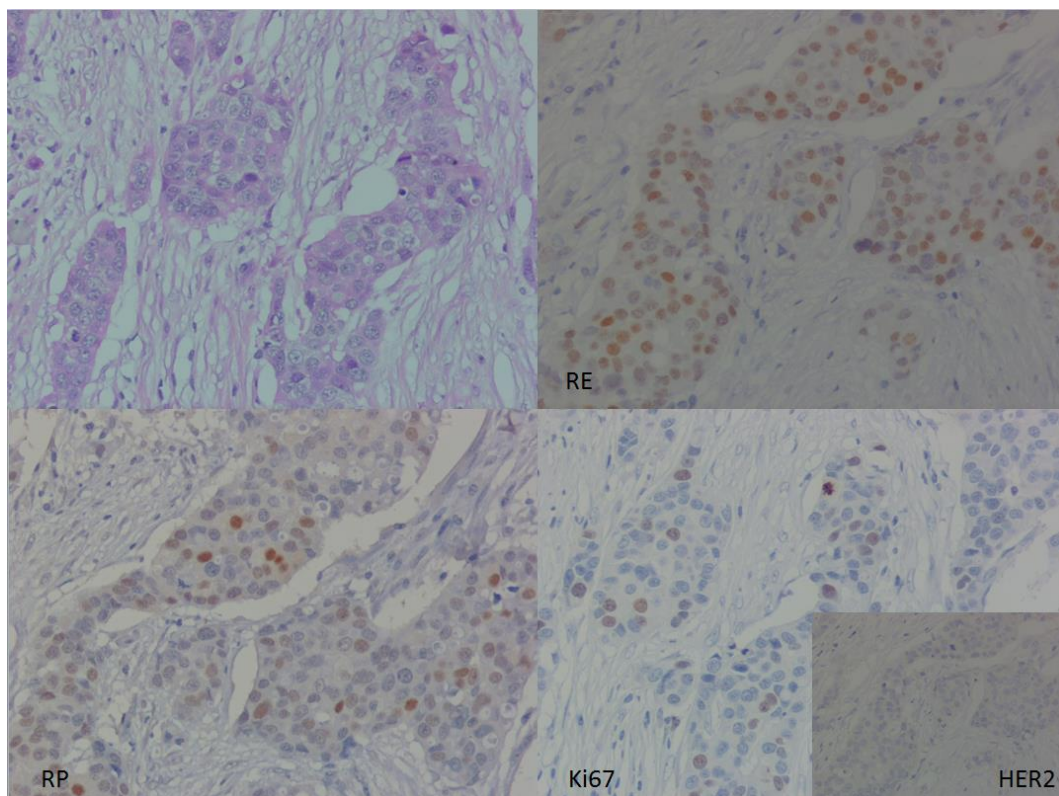


Figura 4 - CDI de subtipo molecular luminal B HER2- (Ki67=22%) (200X).

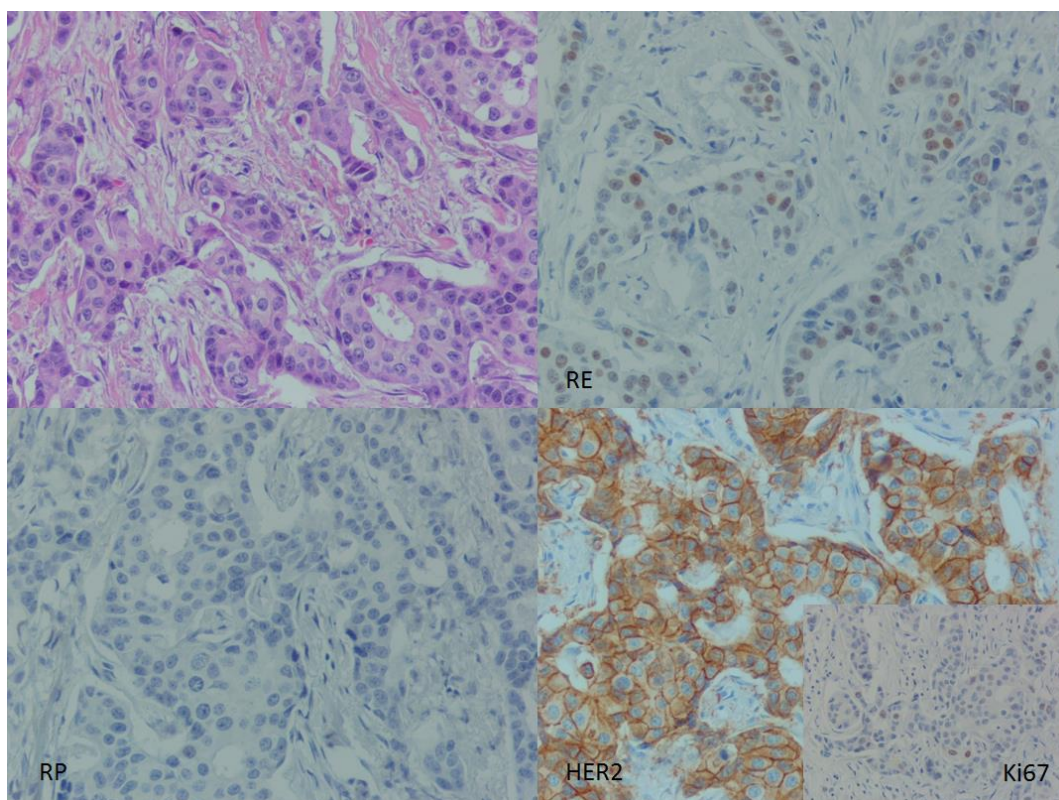


Figura 5 - CDI de subtipo molecular luminal B HER2+ (200X).

A distribuição nominal e percentual das variáveis clínico-patológicas e subtipos moleculares de acordo com o tipo histológico (CLI ou CDI) são mostradas na Tabela 1.

A idade média das pacientes com CLI (59,2) não mostrou diferença em relação às pacientes com CDI (57,7). Também não houve diferença estatisticamente significativa entre os dois tipos histológicos com relação ao estadio patológico, tamanho do tumor, status nodal, tipo de tratamento cirúrgico (mastectomia ou cirurgia conservadora), tratamentos radioterápico e quimioterápico, presença de PNI, status do RP e índice de proliferação celular Ki67. As pacientes com CLI receberam mais tratamento hormonal que as com CDI (90,8% versus 65,5%). Houve também diferença em relação ao grau histológico sendo que 65 de 76 casos (85,6%) de CLI foram graus 1 e 2 comparado com 59 de 110 casos (53,6%) dos CDIs; quase a metade dos CDIs (51/110=46,4%) e 11 de 76 (14,5%) CLIs eram grau histológico 3. Nenhum caso de CLI e 28 de 110 (25,5%) CDIs apresentaram LVI. Com relação ao status do RE e do *HER2* todos os 76 casos de CLI mostraram expressão de RE e nenhum mostrou sobre-expressão /amplificação do *HER2* enquanto 88 de 110 (80%) e 22 de 110 (20%) dos CDIs mostraram positividade para estes marcadores, respectivamente. Vinte casos de CDI foram positivos 3+ para *HER2* e 2 casos positivos 2+; estes 2 casos não mostraram amplificação do gene *HER2* por FISH (razão *HER2*/CEN-17 de 2,1 e 2,05). Todos os casos de CLI foram do subtipo luminal sendo 54 luminais A (71,1%) e 22 luminais B (28,9%) e nenhum caso *HER2* positivo ou triplo negativo. A distribuição dos casos de CDI de acordo com o subtipo molecular foi a seguinte: 65 luminais A (59,1%), 26 luminais B (23,6%), 6 *HER2* (5,5%) e 13 triplo negativos (11,8%).

Tabela 1 - Distribuição nominal e porcentual dos casos de CDI e CLI segundo diversas características clínico-patológicas.

Variável	Tipo histológico				Total		p*
	CDI (n=110)		CLI (n=76)		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Idade (anos)							0,525
≤ 50	36	32,7	19	25,0	55	29,6	
51-60	27	24,5	21	27,6	48	25,8	
> 60	47	42,7	36	47,4	83	44,6	
Média (DP)	57,7 (12,86)		59,2 (12,52)				0,442 •
Estadio patológico							0,590
I	34	30,9	29	38,2	63	33,9	
II	47	42,7	29	38,2	76	40,9	
III	29	26,4	18	23,7	47	25,3	
Tamanho do tumor							0,346
pT1	65	59,1	39	51,3	104	55,9	
pT2	38	34,5	28	36,8	66	35,5	
pT3, pT4	7	6,4	9	11,8	16	8,6	
Status nodal							0,369
pN0	51	46,4	43	56,6	94	50,5	
pN1	35	31,8	20	26,3	55	29,6	
pN2	14	12,7	5	6,6	19	10,2	
pN3	10	9,1	8	10,5	18	9,7	
Tratamento cirúrgico							0,272 #
Mastectomia	52	47,3	43	56,6	95	51,1	
Cirurgia conservadora	58	52,7	33	43,4	91	48,9	
Tratamento radioterápico							0,064 #
Sim	87	79,1	50	65,8	137	73,7	
Não	23	20,9	26	34,2	49	26,3	
Tratamento quimioterápico							0,476 #
Sim	76	69,1	57	75,0	133	71,5	
Não	34	30,9	19	25,0	53	28,5	
Tratamento hormonal							<0,001 #
Sim	72	65,5	69	90,8	141	75,8	
Não	38	34,5	7	9,2	45	24,2	

Tabela 1 - Continuação.

Variável	Tipo histológico				Total		p*
	CDI (n=110)		CLI (n=76)		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Grau histológico							<0,001
Grau 1	22	20,0	29	38,2	51	27,4	
Grau 2	37	33,6	36	47,4	73	39,2	
Grau 3	51	46,4	11	14,5	62	33,3	
Invasão linfovascular							<0,001 #
Ausente	82	74,5	76	100,0	158	84,9	
Presente	28	25,5	0	0,0	28	15,1	
Invasão perineural							0,490 #
Ausente	100	90,9	72	94,7	172	92,5	
Presente	10	9,1	4	5,3	14	7,5	
Status do RE							<0,001 #
Positivo	87	79,1	76	100,0	163	87,6	
Negativo	23	20,9	0	0,0	23	12,4	
Status do RP							0,559 #
Positivo	80	72,7	59	77,6	139	74,7	
Negativo	30	27,3	17	22,4	47	25,3	
Status HER2							<0,001 #
Positivo	22	20,0	0	0,0	22	11,8	
Negativo	88	80,0	76	100,0	164	88,2	
Ki67							0,077 #
≤20%	92	83,6	71	93,4	163	87,6	
>20%	18	16,4	5	6,6	23	12,4	
Subtipo molecular							<0,002
Luminal A	65	59,1	54	71,1	119	64,0	
Luminal B	26	23,6	22	28,9	48	25,8	
HER2 ou triplo negativo	19	17,3	0	0,0	19	10,2	

* Teste qui-quadrado de Pearson; # Teste qui-quadrado de Yates; • Teste t-Student para grupos independentes

As curvas de sobrevida de pacientes com CLI e CDI de subtipo molecular luminal não mostraram diferenças de sobrevida estatisticamente significantes entre os dois grupos (figuras 6a e 6b).

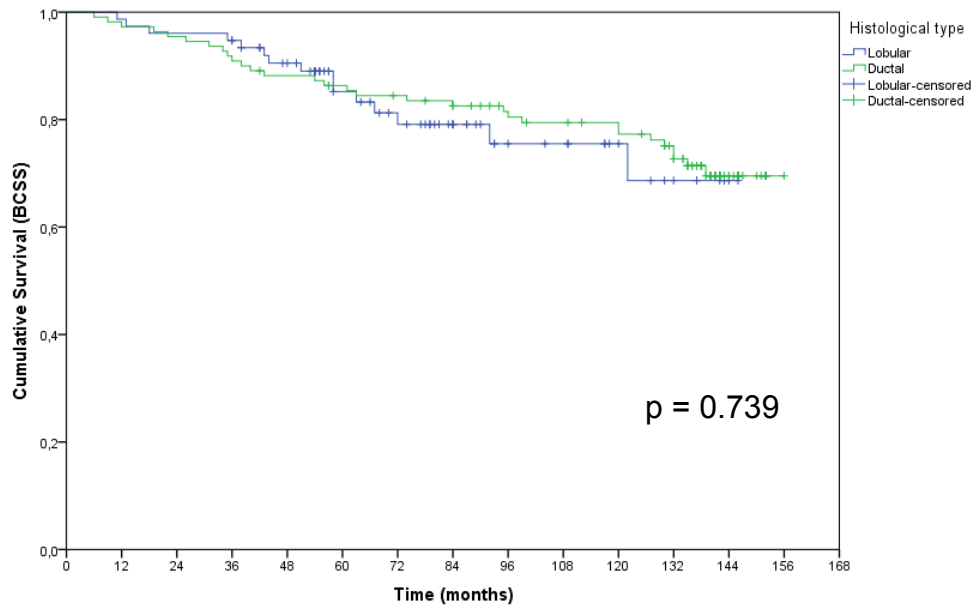


Figura 6a - Sobrevida específica de carcinoma de mama (BCSS) segundo tipo histológico.

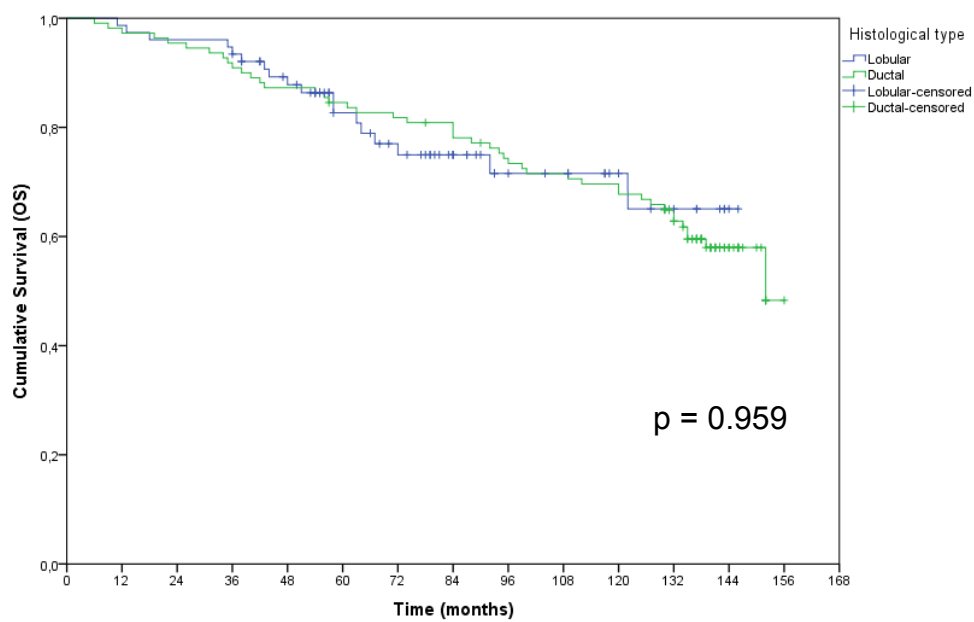


Figura 6b - Sobrevida global (OS) segundo tipo histológico.

A distribuição nominal e porcentual das variáveis clínico-patológicas de acordo com o tipo histológico para os casos luminais A é mostrada na tabela 2.

Não houve diferença estatisticamente significativa quanto a idade, estadio patológico, tamanho do tumor, status nodal, tipo de tratamento cirúrgico (mastectomia ou cirurgia conservadora), tratamentos radioterápico, quimioterápico e hormonal, bem como grau histológico e presença de PNI. Em nenhum dos 54 casos de CLI de subtipo molecular luminal A não se evidenciou a presença de LVI enquanto 17 de 65 (26%) dos casos de CDI do mesmo subtipo molecular mostraram a presença de LVI. Com relação ao RE e RP, por definição, todos os casos de CLI e CDI de subtipo luminal A mostraram expressão destes marcadores exceto 2 casos de CDI que foram negativos para RE. Também por definição, todos os casos de CLI e CDI luminais A foram negativos para HER2 e apresentaram Ki67<20%.

Tabela 2 - Distribuição nominal e porcentual dos casos de CDI e CLI de subtipo molecular A segundo diversas características clínico-patológicas.

Variável	Tipo histológico				Total		p*
	CDI (n=65)		CLI (n=54)		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Idade (anos)							0,934
≤ 50	20	30,8	15	27,8	35	29,4	
51-60	18	27,7	16	29,6	34	28,6	
> 60	27	41,5	23	42,6	50	42,0	
Média (DP)	57,8 (12,69)		58,4 (13,21)				0,782 •
Estadio patológico							0,840
I	21	32,3	20	37,0	41	34,5	
II	26	40,0	21	38,9	47	39,5	
III	18	27,7	13	24,1	31	26,1	
Tamanho do tumor							0,096
pT1	45	69,2	28	51,9	73	61,3	
pT2	17	26,2	19	35,2	36	30,3	
pT3, pT4	3	4,6	7	13,0	10	8,4	
Status nodal							0,235
pN0	27	41,5	29	53,7	56	47,1	
pN1	22	33,8	15	27,8	37	31,1	
pN2	10	15,4	3	5,6	13	10,9	
pN3	6	9,2	7	13,0	13	10,9	
Tratamento cirúrgico							0,159 #
Mastectomia	29	44,6	32	59,3	61	51,3	
Cirurgia conservadora	36	55,4	22	40,7	58	48,7	
Tratamento radioterápico							0,399 #
Sim	49	75,4	36	66,7	85	71,4	
Não	16	24,6	18	33,3	34	28,6	
Tratamento quimioterápico							0,301 #
Sim	40	61,5	39	72,2	79	66,4	
Não	25	38,5	15	27,8	40	33,6	
Tratamento hormonal							0,072 #
Sim	55	84,6	52	96,3	107	89,9	
Não	10	15,4	2	3,7	12	10,1	

Tabela 2 – Continuação

Variável	Tipo histológico				Total		p*
	CDI (n=65)		CLI (n=54)		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Grau histológico							0,232
Grau 1	20	30,8	22	40,7	42	35,3	
Grau 2	29	44,6	25	46,3	54	45,4	
Grau 3	16	24,6	7	13,0	23	19,3	
Invasão linfovascular							<0,001 #
Ausente	48	73,8	54	100,0	102	85,7	
Presente	17	26,2	0	0,0	17	14,3	
Invasão perineural							0,563 #
Ausente	57	87,7	50	92,6	107	89,9	
Presente	8	12,3	4	7,4	12	10,1	
Status do RE							0,500 &
Positivo	63	96,9	54	100,0	117	98,3	
Negativo	2	3,1	0	0,0	2	1,7	
Status do RP							@
Positivo	65	100,0	54	100,0	119	100,0	
Negativo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Status do HER2							@
Positivo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Negativo	65	100,0	54	100,0	119	100,0	
Ki67							@
≤20%	65	100,0	54	100,0	119	100,0	
>20%	0	0,0	0	0,0	0	0,0	

* Teste qui-quadrado de Pearson; # Teste qui-quadrado de Yates; & Teste exato de Fisher; @ Teste qui-quadrado inaplicável;
 • Teste t-Student (grupos independentes)

As curvas de sobrevida das pacientes com CLI e CDI de subtipo molecular luminal A não mostraram diferença estatisticamente significativa de sobrevida entre os dois grupos (Figuras 7a e 7b).

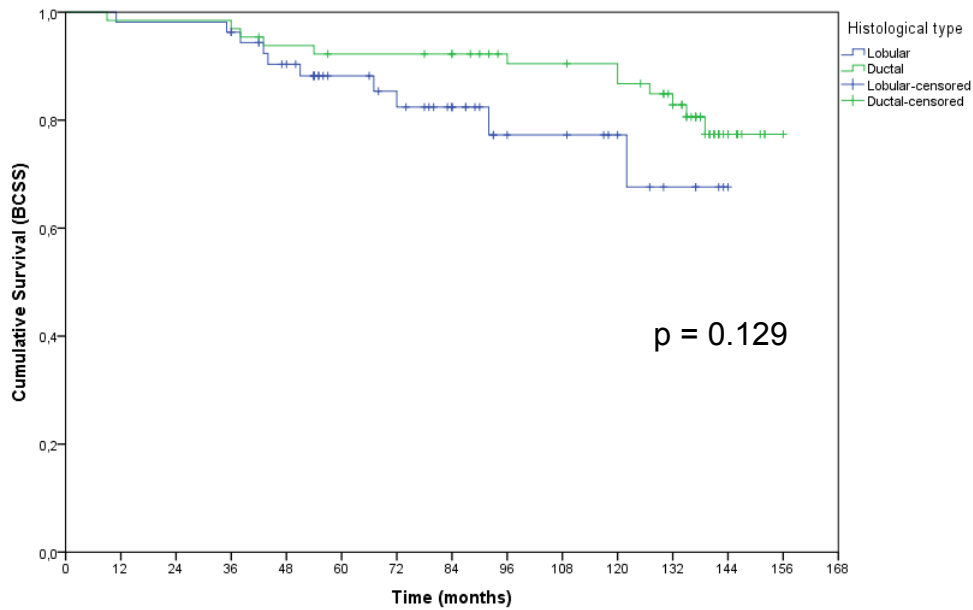


Figura 7a - Sobrevida específica de carcinoma de mama (BCSS) segundo tipo histológico em pacientes com subtipo luminal A (n=119)

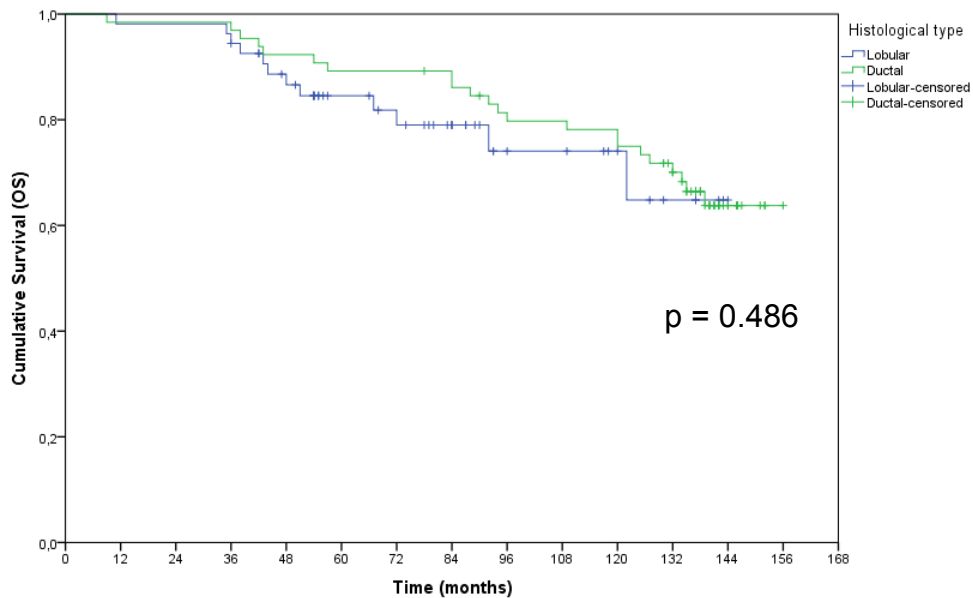


Figura 7b - Sobrevida global (OS) segundo tipo histológico em pacientes com subtipo luminal A (n=119).

A distribuição das variáveis clínico-patológicas de acordo com o tipo histológico para os casos luminais B pode ser visualizada na tabela 3.

Não se observou diferença em relação ao estadio patológico, tamanho do tumor, status nodal, tipo de tratamento cirúrgico (mastectomia ou cirurgia conservadora), tratamento radioterápico, quimioterápico ou hormonal, presença de invasão perineural, status do RE e Ki67. Houve diferença estatisticamente significativa entre os CLIs e CDIs do subtipo molecular luminal B quanto as seguintes características: idade, sendo que as pacientes com CLI tinham em média uma idade maior do que as pacientes com CDI; grau histológico, sendo que 18 de 22 (81,8%) CLIs foram graus 1 e 2 comparado com 7 de 26 (26,9%) CDIs de mesmo grau; e status do RP sendo que 15 de 26 (57,7%) e 5 de 22 (22,7%) dos casos de CDI e CLI, respectivamente, foram positivos. Com relação ao RE, os 22 casos de CLI luminal B mostraram positividade comparado a 24 de 26 (92,3%) dos CDIs de mesmo subtipo molecular. A mesma diferença observada nos luminais A em relação a LVI foi detectada nos luminais B sendo que 0 de 22 e 10 de 26 (38,5%) dos CLIs e CDIs, respectivamente, mostraram a presença de LVI. A expressão do *HER2* foi detectada em 16 de 26 (61,5%) dos CDIs luminais B e em nenhum CLI de mesmo subtipo molecular.

Tabela 3 - Distribuição nominal e porcentual de casos de CDI e CLI do subtipo molecular luminal B segundo diversas características clínico-patológicas.

Variável	Tipo histológico				Total		p*
	CDI (n=26)		CLI (n=22)		n	%	
	n	%	n	%	n	%	
Idade (anos)							0,025 #
≤ 50	14	53,8	4	18,2	18	37,5	
> 50	12	46,2	18	81,8	30	62,5	
Média (DP)	53,5 (12,98)		61,0 (10,69)				0,036 •
Estadio patológico							0,387
I	6	23,1	9	40,9	15	31,2	
II	11	42,3	8	36,4	19	39,6	
III	9	34,6	5	22,7	14	29,2	
Tamanho do tumor							0,609 #
pT1	10	38,5	11	50,0	21	43,8	
pT2, pT3, pT4	16	61,5	11	50,0	27	56,2	
Status nodal							0,236 #
pN0	11	42,3	14	63,6	25	52,1	
pN1, pN2, pN3	15	57,7	8	36,4	23	47,9	
Tratamento cirúrgico							0,809 #
Mastectomia	15	57,7	11	50,0	26	54,2	
Cirurgia conservadora	11	42,3	11	50,0	22	45,8	
Tratamento radioterápico							0,181 #
Sim	22	84,6	14	63,6	36	75,0	
Não	4	15,4	8	36,4	12	25,0	
Tratamento quimioterápico							0,687 &
Sim	23	88,5	18	81,8	41	85,4	
Não	3	11,5	4	18,2	7	14,6	
Tratamento hormonal							0,260 #
Sim	15	57,7	17	77,3	32	66,7	
Não	11	42,3	5	22,7	16	33,3	
Grau histológico							<0,001 #
Grau 1, grau 2	7	26,9	18	81,8	25	52,1	
Grau 3	19	73,1	4	18,2	23	47,9	

Tabela 3 – Continuação.

Variável	Tipo histológico				Total		p*
	CDI (n=26)		CLI (n=22)		n	%	
	n	%	n	%			
Invasão linfovascular							<0,002 &
Ausente	16	61,5	22	100,0	38	79,2	
Presente	10	38,5	0	0,0	10	20,8	
Invasão perineural							>0,999 &
Ausente	25	96,2	22	100,0	47	97,9	
Presente	1	3,8	0	0,0	1	2,1	
Status do RE							0,493 &
Positivo	24	92,3	22	100,0	46	95,8	
Negativo	2	7,7	0	0,0	2	4,2	
Status do RP							0,031 #
Positivo	15	57,7	5	22,7	20	41,7	
Negativo	11	42,3	17	77,3	28	58,3	
Status do HER2							<0,001 #
Positivo	16	61,5	0	0,0	16	33,3	
Negativo	10	38,5	22	100,0	32	66,7	
Ki67							>0,999 #
≤20%	19	73,1	17	77,3	36	75,0	
>20%	7	26,9	5	22,7	12	25,0	

* Teste qui-quadrado de Pearson; # Teste qui-quadrado de Yates; & Teste exato de Fisher; • Teste t-Student (grupos independentes)

As curvas de sobrevida das pacientes com CLI e CDI de subtipo molecular luminal B (Figuras 8a e 8b) mostrou uma tendência a pior prognóstico dos CDIs mas sem atingir nível de significância estatística possivelmente devido ao tamanho amostral (n=48).

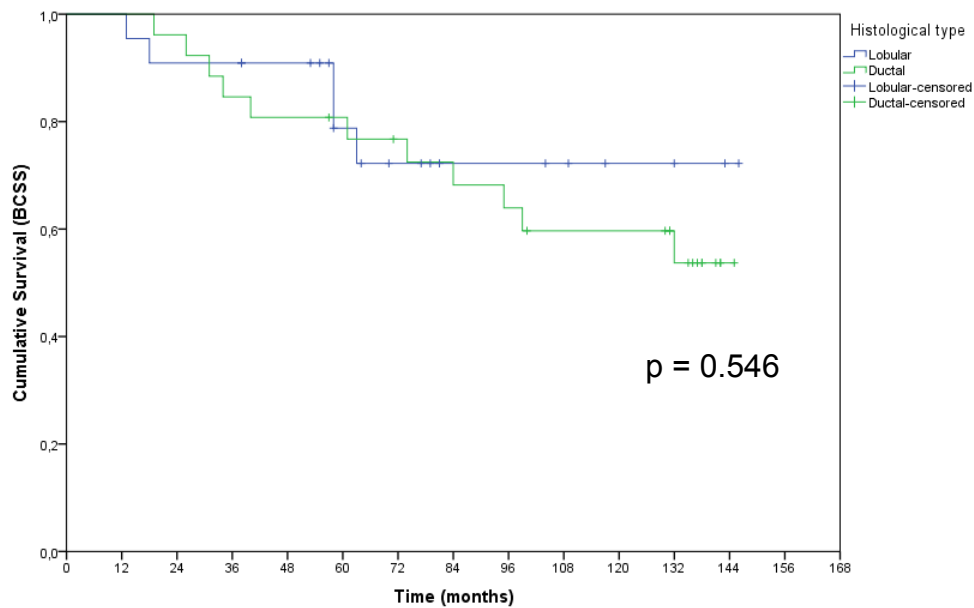


Figura 8a - Sobrevida específica de carcinoma de mama (BCSS) segundo tipo histológico em pacientes com subtipo luminal B (n=48).

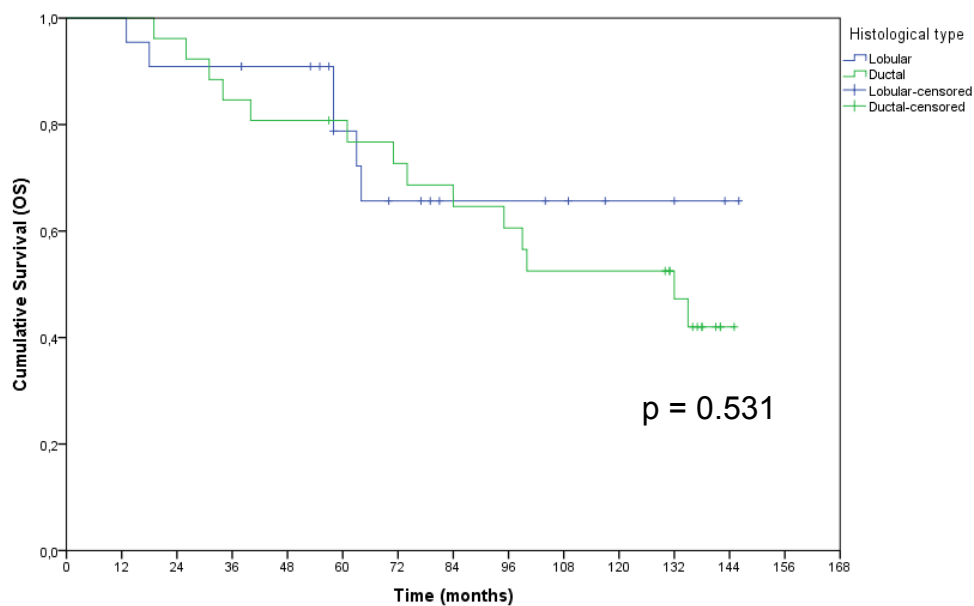


Figura 8b - Sobrevida global (OS) segundo tipo histológico em pacientes com subtipo luminal B (n=48).

A tabela 4 mostra a distribuição nominal e percentual das variáveis clínico-patológicas dos casos de CDI de subtipos moleculares luminais A e B, não se observando diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos com relação à idade, estadiopatológico, status nodal, tipo de tratamento cirúrgico, tratamento radioterápico, LVI e PNI. Houve diferença estatística entre os mesmos subtipos em relação as seguintes características : tamanho do tumor, tratamentos quimioterápico e hormonal, grau histológico e status do *HER2*. No que diz respeito ao tamanho, os tumores luminais B eram maiores que os luminais A sendo 16 de 26 (61,5%) versus 20 de 65 (30,8%), respectivamente, maiores que 2 cm. As pacientes com CDI luminal B receberam mais tratamento quimioterápico do que as pacientes com CDI luminal A (88,5% versus 61,5%). O inverso ocorreu com relação ao tratamento hormonal, recebido por 84,6% das pacientes com o subtipo luminal A versus 57,7% das com o subtipo luminal B. Notamos diferença também entre os dois subtipos quanto ao grau histológico sendo que 19 de 26 (73,1%) dos luminais B eram grau 3 comparado a 16 de 65 (24,6%) dos luminais A. Por definição, todos os casos de subtipo luminal A coexpressaram RE e RP exceto 2 casos que não expressaram RE provavelmente devido a heterogeneidade tumoral. Os casos luminais B mostraram expressão de RE e RP em 92,3% e 57,7%, respectivamente. Com relação ao *HER2*, por definição, nenhum caso de subtipo luminal A mostrou sobre-expressão/amplificação *HER2* enquanto 16 de 26 (61,5%) dos casos de subtipo luminal B foram positivos. Sete de vinte e seis (26,9%) dos CDIs luminais B mostraram $Ki67 \geq 20\%$ enquanto, por definição, todos os 65 casos luminais A apresentaram $Ki67 < 20\%$.

Tabela 4 - Distribuição nominal e porcentual das pacientes com CDI dos subtipos moleculares luminal A e luminal B segundo diversas características clínico-patológicas.

Variável	Subtipo molecular				Total		p*
	Luminal A (n=65)		Luminal B (n=26)		n	%	
	n	%	n	%			
Idade (anos)							0,083
≤ 50	20	30,8	14	53,8	34	37,4	
51-60	18	27,7	3	11,5	21	23,1	
> 60	27	41,5	9	34,6	36	39,6	
Média (DP)	57,8 (12,69)		53,5 (12,98)				0,148 •
Estadio patológico							0,651
I	21	32,3	6	23,1	27	29,7	
II	26	40,0	11	42,3	37	40,7	
III	18	27,7	9	34,6	27	29,7	
Tamanho do tumor							0,013 #
pT1	45	69,2	10	38,5	55	60,4	
pT2, pT3, pT4	20	30,8	16	61,5	36	39,6	
Status nodal							>0,999 #
pN0	27	41,5	11	42,3	38	41,8	
pN1, pN2, pN3	38	58,5	15	57,7	53	58,2	
Tratamento cirúrgico							0,371 #
Mastectomia	29	44,6	15	57,7	44	48,4	
Cirurgia conservadora	36	55,4	11	42,3	47	51,6	
Tratamento radioterápico							0,496 #
Sim	49	75,4	22	84,6	71	78,0	
Não	16	24,6	4	15,4	20	22,0	
Tratamento quimioterápico							0,024 #
Sim	40	61,5	23	88,5	63	69,2	
Não	25	38,5	3	11,5	28	30,8	
Tratamento hormonal							0,013 #
Sim	55	84,6	15	57,7	70	76,9	
Não	10	15,4	11	42,3	21	23,1	

Tabela 4 – Continuação.

Variável	Subtipo molecular				Total		p*
	Luminal A (n=65)		Luminal B (n=26)		n	%	
	n	%	n	%			
Grau histológico							<0,001
Grau 1	20	30,8	2	7,7	22	24,2	
Grau 2	29	44,6	5	19,2	34	37,4	
Grau 3	16	24,6	19	73,1	35	38,5	
Invasão linfovascular							0,364 #
Ausente	48	73,8	16	61,5	64	70,3	
Presente	17	26,2	10	38,5	27	29,7	
Invasão perineural							0,437 &
Ausente	57	87,7	25	96,2	82	90,1	
Presente	8	12,3	1	3,8	9	9,9	
Status do RE							0,322 &
Positivo	63	96,9	24	92,3	87	95,6	
Negativo	2	3,1	2	7,7	4	4,4	
Status do RP							<0,001 &
Positivo	65	100,0	15	57,7	80	87,9	
Negativo	0	0,0	11	42,3	11	12,1	
Status do HER2							<0,001 &
Positivo	0	0,0	16	61,5	16	17,6	
Negativo	65	100,0	10	38,5	75	82,4	
Ki67							<0,001 &
≤20%	65	100,0	19	73,1	84	92,3	
>20%	0	0,0	7	26,9	7	7,7	

* Teste qui-quadrado de Pearson; # Teste qui-quadrado de Yates; & Teste exato de Fisher

• Teste t-Student (grupos independentes)

Comparando as curvas de sobrevida de pacientes com CDIs de subtipos moleculares luminais A e B (figuras 9a e 9b) observou-se diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos sendo que os luminais A tiveram uma sobrevida maior que os luminais B.

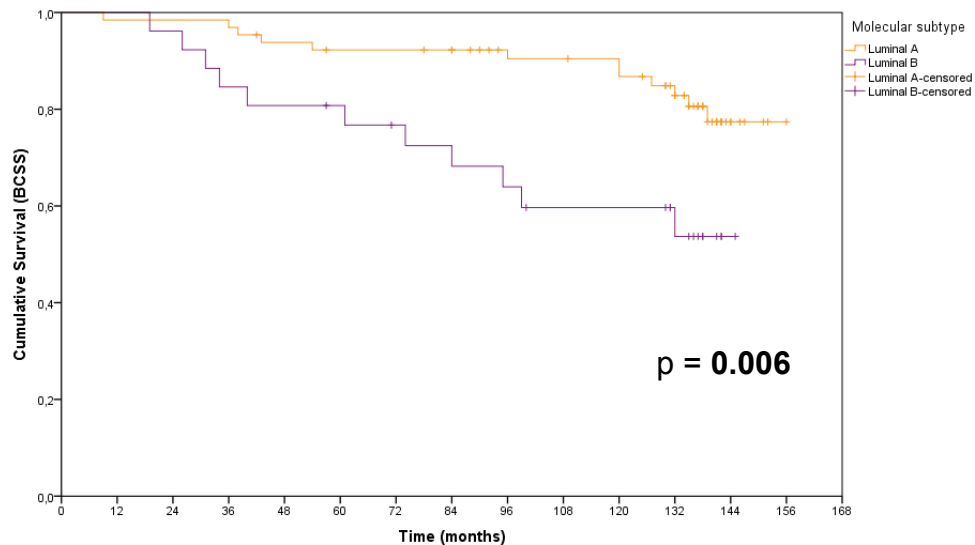


Figura 9a - Sobrevida específica de carcinoma de mama (BCSS) segundo subtipos luminais A e B em pacientes com CDI (n=91).

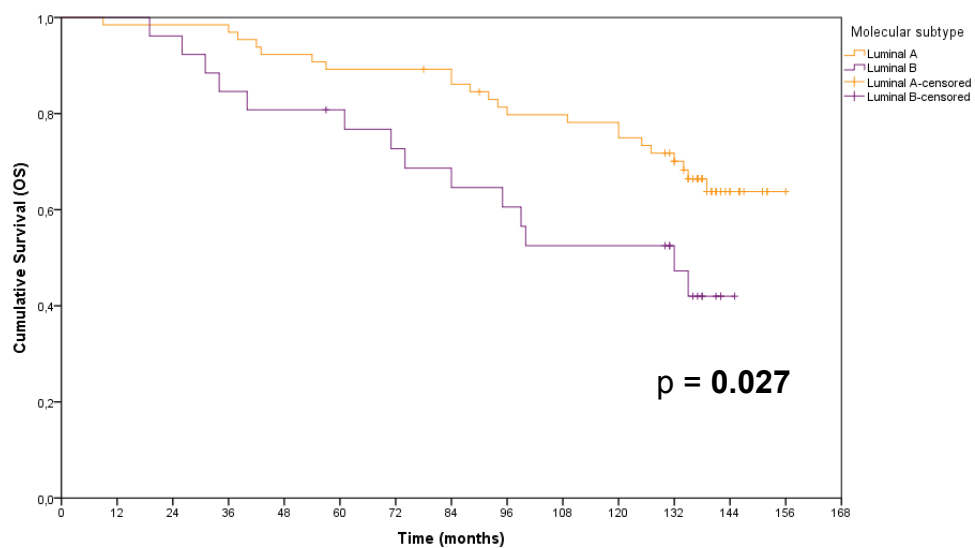


Figura 9b - Sobrevida global (OS) segundo subtipos luminais A e B em pacientes com CDI (n=91).

A tabela 5 mostra a distribuição nominal e percentual dos casos de CLI dos subtipos moleculares luminais A e B em relação a todas as variáveis clínico-patológicas estudadas. Os dois subtipos de CLI não mostraram diferença estatisticamente significativa com relação as seguintes características: idade, estadió patológico, tamanho do tumor, status nodal, tipo de tratamento cirúrgico, tratamentos radioterápico e quimioterápico, grau histológico, LVI, PNI e status do RE e do HER2. Houve diferença estatística entre os dois subtipos em relação ao tratamento hormonal, recebido por mais pacientes com o subtipo luminal A (96,3%) do que com o subtipo luminal B (77,3%). Por definição todos os 54 casos de CLI de subtipo molecular luminal A coexpressaram RE e RP. Os 22 casos luminais B mostraram expressão de RE e RP em 100% e 22,7% (5/22), respectivamente. Com relação ao Ki67, por definição todos os casos luminais A tinham Ki67 < 20%. Dezesete de vinte e dois (77,3%) dos casos de subtipo luminal B apresentavam Ki67 < 20% e 5 de 22 (22,7%) Ki67 ≥ 20%.

Tabela 5 - Distribuição nominal e percentual das pacientes com CLI de subtipos moleculares luminais A e luminal B segundo diversas características.

Variável	Subtipo molecular				Total		p*
	Luminal A (n=54)		Luminal B (n=22)		n	%	
	n	%	n	%			
Idade (anos)							0,418
≤ 50	15	27,8	4	18,2	19	25,0	
51-60	16	29,6	5	22,7	21	27,6	
> 60	23	42,6	13	59,1	36	47,4	
Média (DP)	58,4 (13,21)		61,0 (10,69)				0,432 •
Estadio patológico							0,951
I	20	37,0	9	40,9	29	38,2	
II	21	38,9	8	36,4	29	38,2	
III	13	24,1	5	22,7	18	23,7	
Tamanho do tumor							0,841
pT1	28	51,9	11	50,0	39	51,3	
pT2	19	35,2	9	40,9	28	36,8	
pT3, pT4	7	13,0	2	9,1	9	11,8	
Status nodal							0,591 #
pN0	29	53,7	14	63,6	43	56,6	
pN1, pN2, pN3	25	46,3	8	36,4	33	43,4	
Tratamento cirúrgico							0,629 #
Mastectomia	32	59,3	11	50,0	43	56,6	
Cirurgia conservadora	22	40,7	11	50,0	33	43,4	
Tratamento radioterápico							>0,999 #
Sim	36	66,7	14	63,6	50	65,8	
Não	18	33,3	8	36,4	26	34,2	
Tratamento quimioterápico							0,559 #
Sim	39	72,2	18	81,8	57	75,0	
Não	15	27,8	4	18,2	19	25,0	
Tratamento hormonal							0,019 &
Sim	52	96,3	17	77,3	69	90,8	
Não	2	3,7	5	22,7	7	9,2	

Tabela 5 – Continuação.

Variável	Subtipo molecular				Total		p*
	Luminal A (n=54)		Luminal B (n=22)		n	%	
	n	%	n	%			
Grau histológico							0,717
Grau 1	22	40,7	7	31,8	29	38,2	
Grau 2	25	46,3	11	50,0	36	47,4	
Grau 3	7	13,0	4	18,2	11	14,5	
Invasão linfovascular							@
Ausente	54	100,0	22	100,0	76	100,0	
Presente	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Invasão perineural							0,317 &
Ausente	50	92,6	22	100,0	72	94,7	
Presente	4	7,4	0	0,0	4	5,3	
Status do RE							@
Positivo	54	100,0	22	100,0	76	100,0	
Negativo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Status do RP							<0,001 &
Positivo	54	100,0	5	22,7	59	77,6	
Negativo	0	0,0	17	77,3	17	22,4	
Status do HER2							@
Positivo	0	0,0	0	0,0	0	0,0	
Negativo	54	100,0	22	100,0	76	100,0	
Ki67							<0,002 &
≤20%	54	100,0	17	77,3	71	93,4	
>20%	0	0,0	5	22,7	5	6,6	

* Teste qui-quadrado de Pearson; # Teste qui-quadrado de Yates; & Teste exato de Fisher; @ Teste qui-quadrado inaplicável

• Teste t-Student (grupos independentes)

As curvas de sobrevida dos CLIs de subtipos luminais A e B são mostradas nas figuras 10a e 10b. Não se observou diferença prognóstica estatisticamente significativa entre os dois subtipos moleculares.

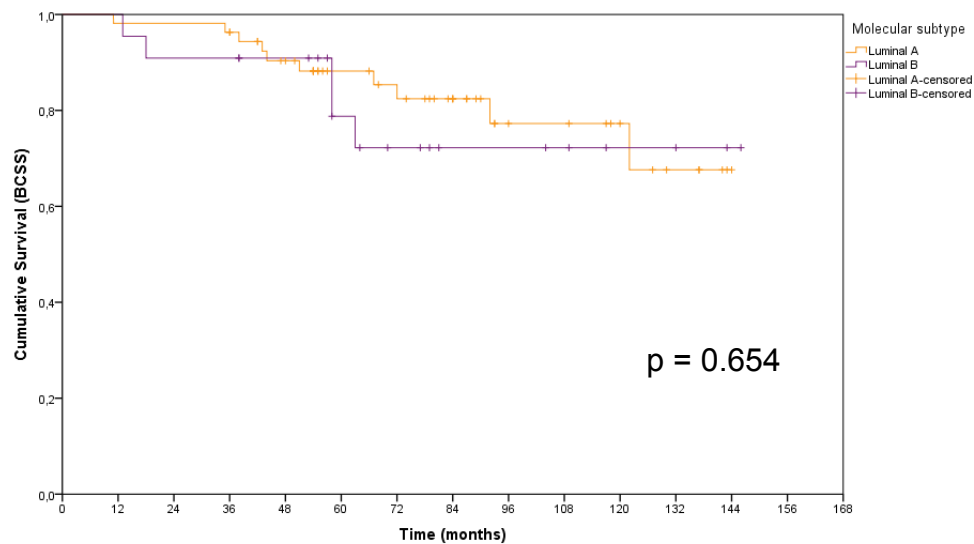


Figura 10a - Sobrevida específica de carcinoma de mama (BCSS) segundo subtipos luminais A e B em pacientes com CLI (n=76).

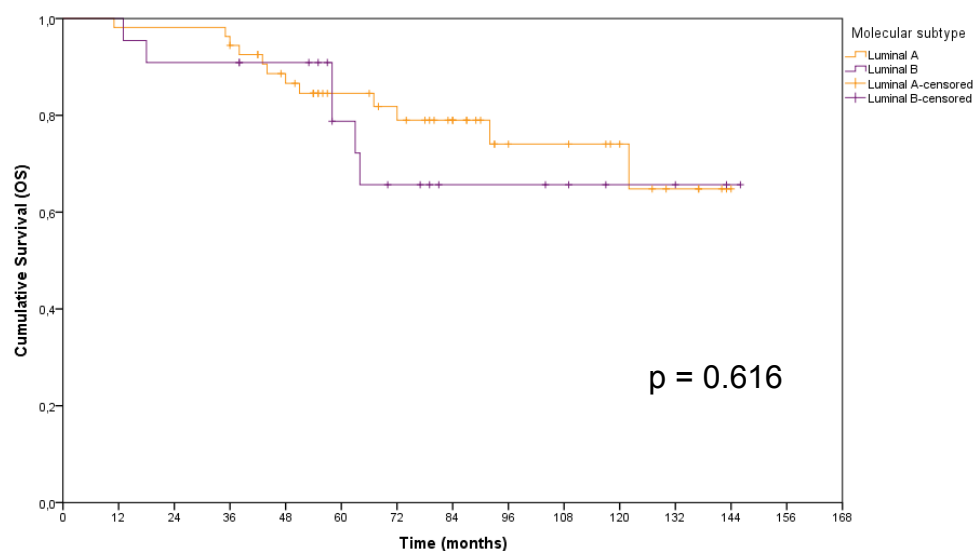


Figura 10b: Sobrevida global (OS) segundo subtipos luminais A e B em pacientes com CLI (n=76).

6. *Discussão*

Nossos resultados comparando dois grupos de carcinomas de mama de tipos histológicos CLI e CDI mostraram que o CLI foi exclusivamente do subtipo molecular luminal (luminal A = 54; luminal B = 22) e não houve diferença prognóstica entre estes dois subtipos moleculares no CLI. Por outro lado, e consistente com a maioria dos estudos^{18,21}, o grupo controle de pacientes com CDI foi constituído pelos principais subtipos moleculares e apresentou diferença prognóstica entre os subtipos moleculares luminais A e B.

Com relação aos casos de subtipo molecular luminal A (n=119) dos CLIs (n=54) e CDIs (n=65) não foram observadas diferenças prognósticas estatisticamente significantes entre os dois tipos histológicos. Embora tenha havido uma tendência a pior prognóstico dos casos de CDI de subtipo molecular luminal B (n=26) em relação aos CLIs de mesmo subtipo (n=22), as curvas de sobrevida não mostraram diferenças estatisticamente significantes possivelmente devido ao tamanho amostral (n=48).

Estudos recentes de perfil de expressão gênica (*GEP-gene expression profiling*) baseados em cDNA *microarrays* do carcinoma de mama têm demonstrado o valor prognóstico e preditivo de grupos de tumores exibindo padrões de expressão semelhantes e reprodutíveis, denominados subtipos moleculares intrínsecos^{17,18}. Basicamente quatro subtipos moleculares têm sido propostos: luminal A, luminal B, HER2 e triplo negativo^{17,32}.

Devido ao alto custo associado a estudos moleculares, painéis de marcadores imunoistoquímicos substitutos têm sido testados e validados para definir esses grupos moleculares prognósticos em estudos prévios com ênfase

principalmente no subtipo basal-*like* (triplo negativo) devido ao pior prognóstico associado com este subtipo e a falta de opções terapêuticas^{33,34,35}.

Entretanto, a maioria destes estudos analisou grupos de pacientes com CDIs que corresponde ao tipo histológico mais comum (80-85%)¹ e poucos concentraram-se em tipos histológicos especiais³⁶. O CLI é o tipo histológico especial mais comum (5-15%) e apresenta características clínico-patológicas, história natural e resposta terapêutica bastantes distintas do CDI. Recentemente, estudos mostraram que na grande maioria dos casos o CLI apresenta um perfil molecular do tipo luminal A com coexpressão de RE e RP, baixo índice de proliferação celular Ki67 e ausência de expressão/amplificação do HER2^{24,25}. No entanto faltam estudos comparando os subtipos moleculares do CLI com a evolução clínica das pacientes para testar o valor prognóstico da classificação molecular neste tipo de tumor.

Nesta série de 76 casos de carcinoma de mama do tipo histológico CLI, todos os casos expressaram RE comparado com 87 de 110 casos (79,1%) do tipo histológico CDI. O percentual de expressão do RE observado nos nossos casos foi consistente com a literatura que mostra expressão de RE em 75-80% dos casos de CDI e em > 90% dos CLIs¹⁴.

Com relação ao RP os estudos mostram expressão em 60 a 70% dos CDIs e em > 90% dos CLIs¹⁴. Neste estudo observamos percentual de expressão menor (79%) do RP do que o descrito na maioria dos estudos, porém maior do que o de Jung et al²⁵ que demonstrou expressão de RE e RP em 83 CLIs em 90,4% e 71,1%, respectivamente. O tipo histológico CDI neste

mesmo estudo apresentou positividade para RE e RP em 64,4% e 50,1%, respectivamente.

Com relação ao *HER2* observamos sobre-expressão em 22 de 110 (20%) casos de CDI consistente com a maioria dos estudos que mostram valores variando de 15 a 20%¹⁴. Todos os nossos 76 casos de CLIs foram negativos para *HER2* inclusive oito casos de CLI pleomórfico. De acordo com a literatura até cinquenta por cento dos casos do tipo histológico CLI pleomórfico podem apresentar sobre-expressão/amplificação do *HER2*¹⁴.

Com relação ao índice de proliferação celular Ki67 nos casos deste estudo, observamos valores < 20% em 73 de 76 (96%) e em 93 de 110 (84,5%) dos casos de CLI e CDI, respectivamente. Dos 17 casos de CDIs com Ki67 ≥ 20%, oito foram do subtipo triplo negativo, seis luminais B e três do subtipo *HER2*.

De todas as variáveis clínico-patológicas prognósticas clássicas analisadas a única que mostrou diferença entre os grupos estudados (CLI e CDI), tanto do subtipo molecular luminal A quanto do luminal B, foi a presença de LVI, observada em 28 de 110 (25,5%) dos casos do tipo histológico CDI e em nenhum caso do tipo histológico CLI. Orvieto et al¹⁶ observou a presença de LVI em 7,5% (40/530) da sua série de casos de tipo histológico CLI.

Os luminais B do CDI mostraram sobre-expressão/amplificação do *HER2* em 16 de 26 casos (61,5%) comparado a nenhum dos casos de CLI de mesmo subtipo molecular. Isto explica o pior prognóstico dos casos CDI luminal B em relação aos CDIs luminais A e também a tendência a pior prognóstico

observada nos casos CDIs luminais B em relação aos CLIs luminais B, embora não tenha sido estatisticamente significativa devido ao tamanho amostral. O estudo de uma amostra ampliada poderia confirmar essa tendência observada. O grau histológico mais alto dos CDIs luminais B em relação aos CLIs de mesmo subtipo molecular é explicado pelo fato do esquema de graduação histológica no CLI ser uma adaptação do empregado no CDI (sistema Nottingham) e portanto não comparáveis, embora estudos mostrem seu valor prognóstico independente³⁷. Por exemplo, todos os CLIs são graduados como escore 3 no quesito formação tubular e escore 1 ou 2 no quesito atipia nuclear (exceto os pleomórficos que são escore 3).

7. Conclusões

Objetivo 1: Determinar os subtipos moleculares dos tipos histológicos CLI e CDI da mama com base nos seguintes marcadores imunoistoquímicos: RE, RP, *HER2* e Ki67.

Conclusão 1: O CLI mostrou um perfil molecular luminal em 100% dos casos (n=76) sendo 54 luminais A (71,1%) e 22 luminais B (28,9%) e nenhum caso de *HER2* ou triplo negativo. A distribuição dos casos de CDI de acordo com o subtipo molecular foi a seguinte: 65 luminais A (59,1%), 26 luminais B (23,6%), 6 *HER2* (5,5%) e 13 triplo negativos (11,8%).

Objetivo 2: Correlacionar os subtipos moleculares luminais A e B dos casos de CLI e CDI da mama com os seguintes fatores prognósticos clássicos: idade, estadió patológico, tamanho do tumor, status nodal, tipo de tratamento cirúrgico, tratamentos radioterápico, quimioterápico ou hormonal, grau histológico e invasão linfovascular e perineural.

Conclusão 2: O estudo comparativo entre os casos de CLI e CDI de subtipo molecular luminal A não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação a todas as variáveis analisadas exceto LVI, sendo que em nenhum dos 54 casos de CLI luminal A não se evidenciou a presença de LVI enquanto 17 de 65 (26%) dos casos de CDI de mesmo subtipo molecular mostraram a presença de LVI.

A análise comparativa entre os casos de CLI e CDI do subtipo molecular luminal B não mostrou diferença em relação a todas as variáveis clínico-patológicas exceto idade sendo que as pacientes com CLI tinham em média uma idade maior do que as pacientes com CDI e grau histológico sendo que 18

de 22 (81,8%) CLIs foram graus 1 e 2 comparado com 7 de 26 (26,9%) CDIs de mesmo grau. A mesma diferença observada nos luminais A em relação a LVI foi detectada nos luminais B sendo que 0 de 22 e 10 de 26 (38,5%) dos CLIs e CDIs, respectivamente, mostraram a presença de LVI. A expressão do *HER2* foi detectada em 16 de 26 (61,5%) dos CDIs luminais B e em nenhum caso de CLI de mesmo subtipo molecular.

O estudo comparativo entre os casos de CDI de subtipos moleculares luminais A e B não mostrou diferença em relação a todas as características estudadas exceto tamanho sendo que os tumores luminais B eram maiores que os luminais A. Dezesesseis de vinte e seis (61,5%) versus 20 de 65 (30,8%), respectivamente, eram maiores que 2 cm. As pacientes com CDI luminal B receberam mais tratamento quimioterápico do que as pacientes com CDI luminal A (88,5% versus 61,5%). O inverso ocorreu com relação ao tratamento hormonal, recebido por 84,6% das pacientes com o subtipo luminal A versus 57,7% das com o subtipo luminal B. Notamos diferença também entre os dois subtipos quanto ao grau histológico sendo que 19 de 26 (73,1%) dos luminais B eram grau 3 comparado a 16 de 65 (24,6%) dos luminais A. Os subtipos moleculares luminais A e B do CDI diferiram quanto à expressão de RP observada em todos os 65 casos luminais A e em 15 de 26 (57,7%) dos luminais B. Com relação ao *HER2*, por definição, nenhum dos 65 casos de subtipo luminal A mostrou sobre-expressão/amplificação do *HER2* enquanto 16 de 26 (61,5%) dos casos luminais B apresentaram sobre-expressão/amplificação *HER2*. Por fim, 7 de 26 (26,9%) CDIs luminais B mostraram $Ki67 \geq 20\%$ enquanto todos os 65 casos de CDI luminal A, por definição, apresentaram $Ki67 < 20\%$.

Por fim, a análise comparativa dos casos CLI de subtipos luminais A e B não mostrou diferença estatisticamente significativa em relação a todas as variáveis exceto tratamento hormonal, recebido por mais pacientes com o subtipo luminal A (96,3%) do que com o subtipo luminal B (77,3%). Os subtipos luminais A e B diferiram também quanto à expressão de RP (100% versus 22,7%, respectivamente) e Ki67 (Ki67 \geq 20% em 0% versus 22,7%, respectivamente).

Objetivo 3: Determinar o valor prognóstico independente dos subtipos moleculares luminais A e B dos tipos histológicos CLI e CDI correlacionando estes subtipos moleculares com BCSS e OS.

Conclusão 3: As curvas de sobrevida das pacientes com CLI e CDI de subtipos moleculares luminais não mostraram diferenças de sobrevida estatisticamente significantes entre os dois grupos (figuras 6a e 6b).

A análise comparativa das curvas de sobrevida das pacientes com CLI e CDI de subtipo molecular luminal A não mostrou diferenças de sobrevida entre os dois grupos (Figuras 7a e 7b).

As curvas de sobrevida das pacientes com CLI e CDI de subtipo molecular luminal B (Figuras 7a e 7b) mostraram uma tendência a pior prognóstico dos CDIs mas sem atingir nível de significância estatística possivelmente devido ao tamanho amostral (n=48).

Comparando as curvas de sobrevida de pacientes com CDIs de subtipos moleculares luminais A e B (figuras 8a e 8b) observou-se diferença

estatisticamente significante entre os dois grupos sendo que os luminais A tiveram uma sobrevida maior que os luminais B.

No entanto, o estudo comparativo das curvas de sobrevida das pacientes com CLI de subtipos moleculares luminais A e B não mostrou diferença prognóstica estatisticamente significante entre os dois grupos.

8. Comentários Finais

Este estudo baseado na correlação do perfil de expressão imunofenotípica de dois grupos de CLIs e CDIs com a sobrevida em mulheres acompanhadas por um longo período de tempo mostrou que a recentemente proposta classificação molecular do carcinoma de mama tem valor prognóstico independente no CDI, mas não no tipo histológico especial mais comum, o CLI.

Demonstramos que todos os casos de tipo histológico CLI foram do subtipo luminal e a distinção entre luminal A e B não foi significativa clinicamente neste tumor.

Portanto, entendemos que há necessidade de que novos biomarcadores prognósticos para o tipo histológico CLI sejam testados e validados clinicamente em futuros estudos, visto que, segundo os resultados deste estudo, os atuais parecem insuficientes para entender a biologia deste tipo histológico de carcinoma da mama.

9. Referências Bibliográficas

1. LAKHANI S.R. et al. WHO Classification of Tumours of the Breast 4th Edition, p.14, 2012.
 2. SILVA T.B. Difficulties in implementing an organized screening program for breast carcinoma in Brazil with emphasis on diagnostic methods. *Rural and Remote Health* v.13, 2321, 2012.
 3. Estimativa 2014: Incidência de carcinoma no Brasil. Instituto Nacional do Câncer (INCA), 2014.
 4. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (DATASUS). Sistema de Informações sobre Mortalidade-SIM. <http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>.
 5. GEYER F.C., REIS-FILHO J.S., DABBS D.J. Lobular neoplasia and invasive lobular carcinoma. In *Breast Pathology*, Elsevier Saunders, 2012.
 6. PESTALOZZI B.C. et al. Distinct clinical and prognostic features of infiltrating lobular carcinoma of the breast: combined results of 15 international breast cancer study group clinical trials. *J Clin Oncol* v26, p.3006-3014, 2008.
 7. MOLL R. et al. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol* v.143, p.1731-1742, 1993.
 8. RAKHA E.A ; ELLIS I.O. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. *Adv Anat Pathol* v.18, p.255-267, 2011.
 9. AJCC Cancer Staging Manual 7th Edition, Springer, 2010.
-

10. ELLIS I.O. et al. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology* v. 20, p. 479-489, 1992.
 11. RAKHA E.A. et al. Prognostic significance of Nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. *J.Clin.Oncol.* v.19, p3153-3158, 2008.
 12. ALESKANDARANY, M.A. et al. Prognostic value of proliferation assay in the luminal, HER2-positive, AND triple-negative biologic classes of breast cancer. *Breast Cancer Research* v.14, R3, 2012.
 13. MOHAMMED R.A.A et al. Objective assessment of lymphatic and blood vascular invasion in lymph node-negative breast carcinoma: finding from a large case series with long-term follow-up. *J.Pathol.* v.223, p.358-365, 2011.
 14. ALLRED, D.C.; BHARGAVA R.; DABBS D.J. Predictive and prognostic marker testing in breast pathology: immunophenotypic subclasses of disease. In *Breast Pathology*, Elsevier Saunders, 2012.
 15. WOLFF C.A. et al. Recommendations for Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Update. *J.Clin.Oncol.* 2013.
 16. ORVIETO, E. et al. Clinicopathologic characteristics of invasive lobular carcinoma of the breast: results of an analysis of 530 cases of a single institution. *Cancer* v.113, p.1511-1520, 2008.
-

17. PEROU, C.M. et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature*, v.406, p.747-752, 2000.
 18. SORLIE T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl Acad Sci USA*, v.100, p.8418-8423, 2003.
 19. FARMER P. et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* v. 24, p. 4660-4671, 2005.
 20. HERSCHKOWITZ J.I. et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol.* v. 5 (R76), 2007.
 21. BLOWS, F.M. et al. Subtyping of breast cancer by immunohistochemistry to investigate a relationship between subtype and short long term survival: a collaborative analysis of data for 10,159 cases from 12 studies. *PLoS Med.* v. 7, p.1-11, 2010.
 22. GOLDHIRSCH, A. et al. Strategies for subtypes-dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2011. *Ann. Oncol.* v. 22, p. 1736-1747, 2011.
 23. GOLDHIRSCH, A. et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2013. *Ann. Oncol.* v. 24, p. 2206-2223, 2013.
-

24. BERTUCCI F. et al. Lobular and ductal carcinomas of the breast have distinct genomic and expression profiles. *Oncogene*, v.27, p. 5359-5372, 2008.
 25. JUNG, S-Y et al. The invasive lobular carcinoma as a prototype luminal A breast cancer: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*, v.10:664, p. 1-8, 2010.
 26. WAN W.H. et al. A rapid and efficient method for testing immunohistochemical reactivity of monoclonal antibodies against multiple tissue samples. *J.Immunol.Methods*, v. 103, p.121-129.
 27. KONONEN J. et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat. Med.* v.4, p.844-847, 1998.
 28. ELSTON C.W.; ELLIS I.O. Pathological prognostic factors in breast cancers.I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*, v. 19, p. 403-410, 1991.
 29. HAMMOND, M.E.H et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol* v. 28 (16), 2010.
 30. ALTMAN D.G. *Practical statistics for medical research*. Boca Raton: Chapman & Hall/CRC, 1999.
 31. LEE E.T. *Statistical methods for survival data analysis*. Belmont: Lifetime Learning Publications, 1980.
-

32. Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature* v. 490, p.61-70, 2012.
 33. NIELSEN, T.O. et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* v.10, p.5367-5374, 2004.
 34. CAREY, L.A et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina breast cancer study. *JAMA* v. 295 (21), p. 2492-2502.
 35. MATOS I. et al. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch.* v. 447, p.688-694, 2005.
 36. ALVARENGA C.A. et al. Reappraisal of immunohistochemical profiling of special histological types of breast carcinomas: a study of 121 cases of eight different subtypes. *J.Clin.Pathol.* v. 65, p.1066-1071, 2012.
 37. RAKHA E.A. et al. Histologic grading is an independent prognostic factor in invasive lobular carcinoma of the breast. *Breast Cancer Res. Treat.* v. 111, p. 121-127, 2008.
-

8. *Anexas*

ANEXO I – FICHA COLETA DE DADOS

NOME:

RGP:

Nº CASO:

1. Data da 1ª consulta no HAC:

2. Data de nascimento:

Nº Bloco parafina:

3. Tipo histológico:

(1) Carcinoma ductal invasivo (2) Carcinoma lobular invasivo

4. Nº linfonodos com metástase:

5. Tamanho do tumor:

6. Comprometimento de pele:

(0) Não (1) Sim

7. Invasão linfovascular

(0) Não (1) Sim

8. Invasão perineural

(0) Não (1) Sim

9. Estadiamento TNM:**10. Tratamentos:**

14.1. Cirurgia:

(1) Conservadora (2) Mastectomia

Data da cirurgia:

14.2. QT neoadjuvante:

(1) Sim (2) Não

14.3. QT adjuvante:

(1) Sim (2) Não

14.4. Radioterapia:

(1) Sim (2) Não

14.5. Hormonioterapia:

(1) Sim (2) Não

12. Tumor na mama contralateral no seguimento:

(1) Sim (2) Não

data diagnóstico ____/____/____

13. Recidiva local:

(1) Sim (2) Não

data diagnóstico ____/____/____

14. Recidiva regional:

(1) Sim (2) Não

data diagnóstico ____/____/____

15. Recidiva à distância:

(1) sim (2) Não

data diagnóstico ____/____/____

16. Situação na última consulta:

(1) Vivo sem evidência carcinoma

(2) Vivo com evidência carcinoma

(3) Óbito pela doença

(4) Óbito por outra causa

17. Data última consulta:

18. Data do óbito:/...../.....

ANEXO II – COMITÊ DE ÉTICA



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu – S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 07 de maio de 2012

Of. 232/2012

Ilustríssima Senhora
Prof^ª. Dr^ª. Rozany Mucha Dufloth
Departamento de Patologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dr^ª. Rozany,

Informo que o Projeto de Pesquisa (Protocolo CEP 4117-2012) Análise da relevância clínica da classificação histológica dos carcinomas da mama de tipo lobular e ductal e sua relação com a classificação molecular de tipo luminal, a ser conduzido por Francisco Alves Moraes Neto (Dissertação Mestrado), orientado por Vossa Senhoria, com a colaboração dos Prof. Drs. Flávio de Oliveira Lima, Mariângela Esther Alencar Marques, Gilberto Uemura e Dr. Fernando Carlos de Lánder Schmitt. O presente projeto de pesquisa conta sub-projeto I de (Iniciação científica), cujo título denomina-se "Critérios citomorfológicos preditivos do fenótipo luminal em mulheres com carcinoma de mama" que será conduzido por Karina Janoti dos Santos, receberam do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 07/05/2012.

Situação do Projeto: APROVADO. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "Relatório Final de Atividades".

Atenciosamente,

Prof. Dr. Trajano Sardenberg
Coordenador do CEP