

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE**

**RELAÇÃO DOS FATORES
PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS NO
CÂNCER DE MAMA TRIPLO
NEGATIVO**

Autor:

Leônidas Souza Machado

Orientador:

Cláudio Galleano Zettler

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental**

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE PORTO ALEGRE

RELAÇÃO DOS FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS NO CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO

Autor:

Leônidas Souza Machado

Orientador:

Cláudio Galleano Zettler

**Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de Mestre em Patologia Experimental**

2010

AGRADECIMENTOS

- Ao Dr. Cláudio Galleano Zettler, pela confiança sempre a mim depositada desde o início de minha especialização e pela orientação deste trabalho.
- Aos colegas Felipe Carvalho, Luis Contin, Heloisa Kosminsky e Daniel Furian, pelo grande auxílio nas pesquisas aos prontuários médicos.
- A toda minha família, que soube compreender a minha ausência
- À Rosalva T. Meurer, pela sua disponibilidade e fundamental participação no auxílio do preparo das lâminas para análise imunistoquímica
- E a tantos outros que deram valiosas contribuições para a execução desta dissertação.

DEDICATÓRIA

*Dedico este trabalho à minha família, que me ensinou a ser o que sou em
minha essência.*

*Em especial, aos meus pais, João da Costa Machado Jr. (in memorian)
e Neygela Maria Maia Souza, e à minha esposa Juliana Lohmann Machado por
todo amor, carinho e compreensão em toda minha vida e nos momentos de
dificuldade de mais esta etapa.*

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO.....	1
1- REVISÃO DA LITERATURA.....	4
1.1- Epidemiologia.....	4
1.2.- Fatores de risco.....	4-5
1.3- Marcadores prognósticos e preditivos.....	6
1.4- Câncer de mama triplo negativo.....	11
2- REFERÊNCIAS.....	17
3- OBJETIVOS.....	22
3.1- Geral.....	22
3.2- Específicos.....	22
4- ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS.....	23
5- ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS.....	35
6- ANEXOS.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CK: Citoqueratinas

EGFR: Fator de crescimento epidérmico

EUA: Estados Unidos da América

INCA: Instituto Nacional do Câncer

HER-2: Receptor Human Epidermal growth factor R-type 2

IUCC: *International Union Against Cancer*

LS: Linfonodo Sentinela

NCCN: *National Comprehensive Cancer Network*

NTN: Não triplo negativo

OMS: Organização Mundial da Saúde

RH: Receptores Hormonais

RE: Receptores de estrogênio

RP: Receptores de progesterona

RT: Radioterapia

TN: Triplo negativo

INTRODUÇÃO

O câncer de mama na população mundial é uma doença altamente prevalente e de importante morbimortalidade. Desde a década de 50 vem ocorrendo um aumento nas taxas de incidência e mortalidade em muitos países; sendo observado tanto em países como China, Índia e Coréia, considerados de baixo risco para a doença, quanto em países ocidentais de alto risco (*Willett et al., 2002*). No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (*INCA, 2008*) a taxa de mortalidade apresentou um aumento considerável nos últimos anos. O número de casos novos estimados para 2008 foi em torno de 50.000, sendo em torno de 5.000 novos casos no Rio Grande do Sul. Esforços têm sido feitos para a implementação de programas de diagnóstico precoce e melhoria do acesso a tratamentos mais efetivos.

Inúmeros fatores prognósticos e preditivos vêm sendo estudados em relação ao câncer de mama. Os tratamentos utilizados baseiam-se atualmente em características clínicas das pacientes e critérios anátomo-patológicos dos tumores, assim como marcadores imunoistoquímicos - receptores esteróides e HER2 (*Barros et al., 2001*). O papel da idade de apresentação do carcinoma mamário como fator prognóstico ainda é controverso, porém a maior parte dos estudos sobre o assunto mostra que as mulheres com menos de 40 anos tendem a ter uma pior evolução clínica e tumores mais agressivos (*Chevallier et al., 1990; Gray, 1992; Lee et al., 1992; Nixon et al., 1994; Winchester et al., 1996; Sorlie et al., 2003; Han et al., 2004; Leong et al., 2004; Jayasinghe et al., 2005*).

Mais recentemente, Perou et al. (2000) sugeriram que a diversidade fenotípica dos tumores de mama deveria ser acompanhada por uma correspondente diversidade nos seus padrões de expressão gênica, o que foi confirmado através da técnica de *cDNA Microarray* (microarranjos com DNA complementar). Este estudo apontou uma nova taxonomia molecular dos tumores mamários baseada na investigação sistemática desses padrões de expressão gênica.

No estudo de Perou et al. (2000), pela primeira vez, o câncer de mama foi classificado baseado nas características da biologia molecular em quatro grupos: *RE+/luminal*, *basal*, *HER2-positivo* e *mama normal*. Uma importante implicação desse estudo é que os tumores clinicamente designados como receptor de estrogênio negativos abrangem pelo menos dois subtipos de tumores biologicamente (*basal* e *HER2-positivo*) que devem ser tratados de forma diferente um do outro.

No entanto, essa nova tecnologia ainda se encontra inacessível na maior parte dos centros que tratam pacientes com câncer de mama. A possibilidade de identificar os subtipos moleculares descritos nos estudos de análise da assinatura genética através de metodologias mais acessíveis e de menor custo, como com o uso de técnicas de imunistoquímica, é de fundamental importância, principalmente se levarmos em consideração as limitações econômicas encontradas em países como o Brasil. Além de potencialmente melhorar a determinação do prognóstico de pacientes com câncer de mama, o conhecimento mais detalhado desses subtipos pode levar ao desenvolvimento de novas classes de drogas com atividade subtipo-específica.

A tendência atual no tratamento do câncer de mama é que este seja feito cada vez mais individualizado, levando-se em conta as características do tumor. Desta forma se torna fundamental avaliarmos se grupos etários específicos, que pela idade seriam poderiam ser considerados de melhor ou pior prognóstico realmente o são, para que terapêuticas mais adequadas sejam oferecidas a estas pacientes.

O uso desta classificação dos tumores de mama pode auxiliar de forma significativa na seleção das pacientes que teriam melhor indicação de uso de determinados tratamentos pré ou pós-cirurgia. Neste estudo buscamos caracterizar, de forma indireta através de um painel imunistoquímico já

validado na literatura, os fenótipos moleculares dos tumores de mama triplo negativo em grupos de idade diferentes, determinando a associação com o tamanho tumoral e o acometimento dos linfonodos axilares.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Câncer de mama

1.1.1. Epidemiologia

O conhecimento das causas e do tratamento do câncer de mama é de fundamental importância para a saúde pública e de grande interesse para os profissionais da saúde de diversas especialidades.

No Brasil o câncer de mama é a neoplasia maligna mais freqüente entre as mulheres. São estimados em torno de 50.000 novos casos por ano em todo o país, segundo o Instituto Nacional do Câncer (*INCA, 2008*). O número de óbitos chega a 22% dos casos de câncer, com taxa bruta de incidência de 53/100.000 mulheres. Nos Estados Unidos esta estimativa é ainda bem superior, estando uma incidência de 215.000 novos casos por ano, com uma taxa de 104/100.000 novos casos de câncer por ano (*INCA 2008*).

A sobrevivência tem aumentado nos últimos anos, principalmente devido à utilização da mamografia, que possibilita a detecção de casos de câncer de mama em fase precoce, proporcionando condições terapêuticas mais efetivas e aumentando, com isso, a sobrevivência das mulheres (*Anders C 2008*).

1.1.2 Fatores de Risco

À medida que foram surgindo estudos sobre os fatores de risco para o câncer de mama, foi observada uma variabilidade quanto à participação desses fatores no aumento da incidência da neoplasia (*Harris Et al 2002*).

As mulheres com história familiar de câncer de mama em primeiro grau (mãe ou irmã) apresentam um risco relativo, aproximadamente, duas vezes maior, em relação às mulheres que não apresentam antecedentes (*Fulford 2007*).

A atividade física tem sido considerada como fator protetor contra o câncer de mama (*Fadare et al 2008*). Essa associação estaria ligada à redução dos níveis de estrogênio e progesterona, assim como da atividade proliferativa das células da glândula mamária (*Bauer KR 2007*).

A relação entre o tabagismo e o câncer de mama permanece em discussão, porém mulheres que iniciam a fumar na juventude parecem ter aumento do risco de desenvolver câncer de mama quando comparadas com não usuárias (*Parikh RR et al 2008*).

Vários fatores reprodutivos estão relacionados com o câncer de mama. A menarca precoce, ou seja, a primeira menstruação antes dos 12 anos de idade, tem sido associada ao aumento do risco para câncer de mama, pois estas mulheres ficam mais tempo expostas aos estímulos estrogênicos. A nuliparidade, ou seja, nunca ter engravidado, e a primeira gestação após os 30 anos, são fatores determinantes para aumento do risco para câncer de mama. Ter filho é considerado fator protetor, assim como a amamentação (*Reis Filho 2008*).

A terapia hormonal vem sendo muito discutida, nos últimos tempos, em relação ao aumento do risco para câncer de mama. A Sociedade Brasileira de Ginecologia e a Federação Internacional de Ginecologia e Obstetrícia têm recomendado a terapia hormonal em casos muito selecionados, onde não existam fatores de risco, como história familiar ou pessoal de câncer de mama e a paciente apresente sintomas muito intensos relacionados com a carência hormonal no período da menopausa (*Reis Filho 2008*).

A relação entre álcool e câncer de mama está ligada à dose diária ingerida, quanto maior for a dose, maior será o risco (*Elsheik SE 2008*).

A dieta rica em gorduras e a obesidade são outros fatores que estão intimamente relacionados com câncer de mama, devido ao aumento dos níveis de estrogênio sanguíneo (*Fadare et al 2008*).

Outro fator de risco muito estudado nos últimos tempos é a associação dos anticoncepcionais orais (ACO) com o câncer de mama. Os estudos mais

recentes não mostram significância estatística nesta relação. Todavia o ACO não deve ser usado por um período maior que 10 anos e em doses baixas, se possível (*Dent R 2007*).

1.1.3 Marcadores prognósticos e preditivos.

O tratamento do câncer de mama, atualmente, está baseado em um conjunto de características da mulher e do tumor, os chamados fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama. Esse conjunto de fatores é individual e determinante para a maior ou menor eficácia de determinada estratégia terapêutica, além de identificar as pacientes com risco de recorrência da patologia. A utilização dos fatores prognósticos e preditivos tem sido realizada com maior eficácia na terapia do câncer de mama, mais que em qualquer outro tumor sólido (*Payne SJL,2008*).

Entende-se como fator prognóstico qualquer marcador, à época do diagnóstico ou do tratamento cirúrgico, que possa ser associado ao tempo livre de doença ou sobrevida global na ausência de terapia sistêmica adjuvante. Esses fatores podem ser usados para prever a história natural do tumor. O fator prognóstico irá selecionar as pacientes, que, provavelmente, terão recorrência sem terapia sistêmica e, por isso, se beneficiarão da implementação dessa estratégia, apesar da morbidade associada ao seu recurso (*Stockmans G, 2008*). A aplicação criteriosa de fatores prognósticos estabelecidos e validados é essencial para se aumentar a utilização de terapia sistêmica e, conseqüentemente, diminuir a mortalidade (*Payne SJL,2008*).

O fator preditivo representa qualquer marcador associado a uma resposta ou à sua falta em uma terapia específica, ou seja, ele seleciona a melhor terapia para cada paciente (*Bhargava R, 2008*).

Algumas variáveis podem ser, ao mesmo tempo, prognósticas e preditivas, o que confere maior complexidade à análise desses fatores. Classicamente, fatores que possuem essas duas características são os receptores hormonais e o Her-2, alvos deste estudo (*Fadare O, 2008*).

Os fatores preditivos e prognósticos mais importantes estão relacionados a seguir:

Idade: A idade da paciente à época do diagnóstico é importante por estar diretamente relacionada ao período da menopausa e, conseqüentemente, à ação hormonal no crescimento tumoral. Apesar das controvérsias vários estudos demonstram que mulheres mais jovens, principalmente antes dos 35 anos, têm um pior prognóstico em relação a mulheres mais velhas, na pós-menopausa. A sobrevida livre de doença em 10 anos é de 62% para mulheres com menos de 35 anos de idade e de 72% para mulheres com mais de 35 anos. A idade não é um fator determinante na conduta terapêutica, mas está associada com outros fatores que normalmente levam a uma terapia mais agressiva (*Arnes 2008*). O papel da idade de apresentação do carcinoma mamário como fator prognóstico ainda é controverso, porém a maior parte dos estudos sobre o assunto mostra que as mulheres com menos de 40 anos tendem a ter uma pior evolução clínica e tumores mais agressivos (*Chevallier et al., 1990; Gray, 1992; Lee et al, 1992; Nixon et al., 1994; Winchester et al., 1996; Sorlie et al., 2003; Han et al 2004; Leong et al., 2004; Jayasinghe et al ., 2005*).

Tamanho tumoral: O tamanho tumoral é uma variável essencial para estabelecer uma proposta terapêutica para a paciente. Existe uma relação direta entre tamanho tumoral, acometimento axilar, taxa de recorrência da doença e metástase à distância. Quanto maior o tumor, pior o prognóstico. A análise do tamanho tumoral é ainda mais importante nos casos de axila negativa, representando um forte indicador do tratamento. O risco de recidiva está diretamente relacionado ao tamanho tumoral, quanto maior o tamanho do tumor, maior a possibilidade de recidiva da doença, assim como de comprometimento axilar. (*Fisher et al., 1969; Palmer et al., 1982; Valagussa et al., 1978; Fulford LG,2008*).

Tipo Histológico: A maioria dos diagnósticos de câncer de mama é de tumores ductais ou lobulares invasores, em torno de 80% do total dos casos. Classicamente, os tumores ductais invasivos têm um pior prognóstico e maior incidência de acometimento axilar do que tumores infiltrativos menos comuns. Alguns tipos de tumores desenvolvem menos metástases axilares, e as pacientes possuem maior intervalo livre de doença. São eles: carcinoma tubular, carcinoma cribiforme, carcinoma mucinoso, carcinoma adenocístico, carcinoma medular, carcinoma túbulo-lobular, carcinoma papilar invasivo. A correlação desses subtipos histológicos com maior sobrevida deve-se, em parte, ao baixo grau histológico. Outro subtipo importante a ser destacado é o carcinoma inflamatório, que mais que um subtipo histológico pode ser considerado uma entidade anatomoclínica com características especiais e comportamento agressivo, com sobrevida menor se comparado aos demais subtipos de carcinoma mamário. (*Rakha EA, 2008*)

Grau Histológico: O grau histológico é um fator muito importante a ser analisado com associação significativa na sobrevida do câncer de mama ductal invasivo. O sistema de classificação mais comumente utilizado para avaliar o grau de diferenciação tumoral – *Scarff Bloom Richardson (SBR)*- que combina grau nuclear, formação tubular e frequência mitótica, foi adotado oficialmente pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1968 (*Scarff e Torloni, 1968*). Esta classificação foi posteriormente modificada em 1991 pelo grupo de Nottingham que introduziu algumas alterações no método SBR, na tentativa de tornar ainda mais objetivos os padrões de avaliação histológica. Três graus de diferenciação foram usados. Com essa classificação – SBR modificada – os autores, Elston e Ellis (1991), demonstraram uma forte correlação do grau histológico com o prognóstico do câncer de mama. Quanto maior for o grau histológico, pior será a sobrevida. A sua avaliação é indispensável para a estratégia terapêutica, ocorrendo uma dificuldade na subjetividade da análise das amostras pelos patologistas. Está relacionado com a resposta às drogas quimioterápicas, tendo assim ação preditiva. (*Bori R, 2008*)

Acometimento axilar: é considerado um dos fatores prognósticos mais importantes. A presença de metástases axilares é um fator independente e mostra uma característica mais agressiva do tumor. O número de linfonodos acometidos e o prognóstico da paciente têm uma relação direta. O acometimento axilar é uma das indicações de terapia sistêmica adjuvante, exceto quando se tem contra-indicação clínica (*Carter et al., 1989; Fisher et al., 1969*).

O risco dos linfonodos axilares estarem comprometidos é diretamente proporcional ao tamanho do tumor. Os tumores com até 1 cm de diâmetro apresentam a probabilidade média de 20 a 30 % de apresentar linfonodos envolvidos com a doença (*Carter et al., 1989; Fentiman et al., 1996*). Paciente com linfonodos axilares negativos necessitam de outros fatores prognósticos para determinar a estratégia terapêutica mais adequada, impulsionando pesquisas constantes em busca de fatores biológicos para essas pacientes.

Pacientes sem comprometimento metastático para linfonodos axilares apresentam um melhor prognóstico tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença, possuindo uma sobrevida global de 80% em 10 anos (*Valagussa et al., 1978*).

A maioria dos cânceres de mama drena para um ou dois linfonodos sentinela que podem ser identificados por radiotraçadores ou por corantes. O linfonodo sentinela é altamente preditivo da condição dos linfonodos remanescentes, poupando muitas mulheres da morbidade aumentada de uma dissecação axilar. (*Clark et al., 2002*). Com a evolução do tratamento cirúrgico do câncer de mama, a técnica de biópsia do linfonodo sentinela tornou-se o tratamento de escolha para a investigação axilar, exceto em casos de confirmação clínica de comprometimento por metástase neste local. (*Veronesi et al., 1997*)

Receptores Hormonais: Os receptores de estrogênio (RE) pertencem a uma superfamília de receptores nucleares de hormônios, que além de inúmeros outros receptores esteróides, inclui os receptores do hormônio tireoidiano, da vitamina D e do ácido retinóico. Essas proteínas receptoras

funcionam como fatores de transcrição quando se ligam aos seus respectivos ligantes. Os métodos utilizados para a determinação dos RE são baseados em duas estratégias diferentes. A primeira envolve a ligação competitiva de um ligante esteróide radioativamente marcado para detectar o receptor, enquanto a segunda faz o reconhecimento da proteína receptora por meio de anticorpos específicos. Muitos estudos compararam os dois métodos (ensaio de ligação do ligante x IHQ) mostrando que a relação entre eles é elevada entre 80 a 90% (*Reiner et al., 1986; Remmele et al., 1986; Charpin et al., 1988; Hanna e Mobbs, 1989; Allred et al., 1990; Stierer et al., 1993; Molino et al., 1997; Elledge et al., 1999*)

Devido a sua relativa simplicidade, não exigindo o uso de equipamentos especializados, a imunistoquímica tem se tornado o método de escolha para a medida de receptores hormonais na prática clínica (*Elledge e Fuqua, 2002*).

A determinação dos receptores hormonais - receptores de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (RP) - é atualmente uma estratégia fundamental para estabelecer o tratamento adequado para mulheres com câncer de mama. Receptores de estrogênio estão presentes em 75 a 80% dos carcinomas de mama, em proporção crescente com a idade. Os receptores hormonais são considerados, tanto fatores prognósticos quanto fatores preditivos. A presença de RE e RP é um forte fator preditivo ao tratamento hormonal, que é utilizado normalmente após o tratamento cirúrgico, quimioterápico e radioterápico, por um período de 5 anos.

A determinação dos *status* dos receptores hormonais é essencial para a seleção de pacientes que podem se beneficiar do uso de terapia hormonal, tornando-se, portanto, um fator preditivo importante para a consideração da terapêutica (*Knight et al., 1977*). Para mulheres que apresentam tumores que não expressam receptores hormonais, o tratamento com hormonioterapia não comprova benefício (*Bhargava R, 2008; Fulford LG, 2008*). Pacientes com tumores receptores hormonais positivos apresentam intervalos livre de doença mais longos. Dados do NSABP indicam que a vantagem da sobrevida livre de doença é de cerca de 10% em 5 anos (*Clark e Mc Guire, 1988*). Além disso, as concentrações de receptores aumentam linearmente com o aumento da idade (*Thomas et al., 1993*)

Oncogene HER 2/neu: O *HER2-human epidermal growth factor receptor 2* (receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano ou *c-erb B2* ou *neu*) é uma glicoproteína transmembrana envolvida no controle do crescimento celular (Hayes e Thor, 2002; Shawver et al., 2002). O gene *Her-2/neu* está localizado no cromossomo 17q21 e é transcrito em um RNAm de 4,5kb, que é traduzido em uma glicoproteína de 185kd (Clark, 2002). Atua como co-receptor dos fatores de crescimento múltiplos e não parece ter um ligante específico.

É considerado fator preditivo e prognóstico do câncer de mama. Está presente em 25% dos casos de câncer de mama, conferindo um pior prognóstico. Sua superexpressão está associada a uma maior agressividade tumoral, taxas de recorrência mais altas e maior número de linfonodos positivos. (Arnes JB, 2008, Bauer KR, 2007).

A avaliação do *HER2* é mais importante em determinar a resposta à terapia objetivada a esta proteína. O *Trastuzumab* é um anticorpo monoclonal humanizado direcionado ao *HER2/neu*, desenvolvido especificamente contra células-alvo tumorais, e é esperado que poupe células normais. Este é o primeiro agente terapêutico específico ao gene alvo de um tumor sólido e os resultados têm sido muito promissores (Laster, 2005).

Um grande estudo multicêntrico, o Herceptin Adjuvante (HERA), mostrou que as pacientes que usaram o anticorpo monoclonal humanizado contra o *HER2*, após o tratamento inicial com cirurgia e quimioterapia, apresentaram uma melhora significativa na sobrevida livre de doença (Piccart-Gebhart et al., 2005). Em 2007 o mesmo grupo publicou os resultados de dois anos de seguimento mostrando que além da melhor sobrevida livre de doença também houve benefício na sobrevida global (Smith et al., 2007)

1.1.4 Câncer de mama triplo negativo

O câncer de mama apresenta uma situação peculiar em oncologia, na qual marcadores específicos são utilizados para prever resposta da doença ao tratamento e consequente planejamento terapêutico (Payne Et al 2008). O

uso rotineiro dessa avaliação de marcadores prognósticos permitiu a identificação de um subgrupo especial de tumores, reconhecidos pela ausência de expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e de HER2, chamados carcinomas de mama triplo-negativos.

Estudos de *microarray* do grupo de Stanford (*Bori R, 2008*) demonstraram uma variação sistemática, permitindo classificar os tumores em cinco grupos principais, sendo dois com neoplasias que expressam receptores de estrogênio (luminal A e luminal B) e três com expressão negativa de receptores de estrogênio (*normal breast-like*, HER2 e *basal-like*). A grande maioria dos carcinomas de mama triplo-negativos é constituída pelo subgrupo de tumores de fenótipo basal (*basal-like*, pela classificação do grupo de Stanford).

A importância do reconhecimento de tais tumores reside no fato de que geralmente eles apresentam comportamento biológico mais agressivo do que os outros subgrupos. Além disso, tratamentos específicos para os carcinomas de mama triplo-negativos têm sido desenvolvidos e estão sendo estudados em ensaios clínicos, geralmente baseados em neoplasias de fenótipo basal. Deve-se, no entanto, fazer distinção entre os termos triplo-negativo e *basal-like*. (*Dent R, 2007*)

O câncer de mama triplo negativo é definido como um carcinoma da mama que não apresenta expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) nem de HER2 à imunoistoquímica ou estudo citogenético. Entre 10 a 17% dos carcinomas de mama são triplo-negativos (*Payne Et al 2008, Dent R, 2007, Bori R, 2008*). Tais tumores representam um desafio terapêutico ao oncologista, uma vez que não são responsivos ao tratamento hormonal ou à terapia direcionada ao HER2 (trastuzumab), deixando o papel terapêutico principal à quimioterapia (*Bori R, 2008*).

Epidemiologicamente, geralmente acomete mulheres mais jovens (<50 anos de idade) e são mais freqüentes nas pacientes afrodescendentes (*Stockmans G, 2008*). Podem mostrar associação com mutações no *BRCA1*. Apresentam comportamento biológico mais agressivo quando comparado a outros subgrupos, com um padrão de disseminação diferente, preferencialmente hematogênico (*Tischkowitz M, 2008*). As recidivas ocorrem geralmente nos primeiros três anos após o tratamento, sendo mais comuns os

casos de morte nos primeiros cinco anos (Anders C,2008). Histologicamente, geralmente esses tumores apresentam-se com grau histológico 3. A maioria é de tipo não especial, embora a incidência de carcinomas metaplásicos e medulares seja maior nos triplo-negativos do que nos outros subgrupos (Irvin WJ Jr,2008).

1.4.1 Carcinoma de mama *basal-like*

Há várias décadas é sabido que um subgrupo de neoplasias malignas da mama pode apresentar diferenciação mioepitelial significativa (Fadare O, 2008). Porém, a evolução até a utilização atual do termo “*basal-like*” (assim como os termos também encontrados na literatura e utilizados como sinônimos “fenótipo basal”, “basalóide” ou “*basal-type*”) foi associada diretamente ao padrão de expressão de citoqueratinas. Atualmente, carcinoma de mama *basal-like* é definido por citogenética ou imunoistoquímica. Como a citogenética ainda não tem sido utilizada em larga escala, a maioria dos estudos definiu esse tumor imunoistoquimicamente (Bhargava R, 2008). Entretanto, não existe a rigor consenso internacional a respeito da definição de tumores de mama com fenótipo basal nem a respeito dos marcadores que o definiriam. Outro ponto onde não há consenso é em relação à reatividade para receptores hormonais e HER2; alguns autores postulam a necessidade de negatividade para incluir o caso como *basal-like*, outros não estabelecem esse pré-requisito (Bhargava R, 2008).

Câncer de mama de fenótipo basal geralmente apresenta expressão de queratinas “basais” de alto peso molecular (34βE12, CK5, CK5/6, CK14 e CK17)(Bhargava R, 2008, Anders C,2008). Outros marcadores que têm sido demonstrados em estudos com tumores *basal-like* são p53, vimentina, p-cadherin, αB crystallin, fascin, caveolinas 1 e 2, c-kit e receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR)(Bhargava R, 2008, Anders C,2008). A expressão deste último tem tido maior importância em oncologia devido ao surgimento de estudos com terapia-alvo envolvendo EGFR com resultados promissores (Rakha EA, 2007).

Carcinoma *basal-like* geralmente acomete mulheres mais jovens, sendo mais comuns nas de descendência africana (Fadare O, 2008). As pacientes apresentam maior frequência de metástases, contudo tal fato pode dever-se mais a pouca eficácia terapêutica atual do que a uma propriedade intrínseca à neoplasia. Porém, parece que o padrão de disseminação é diferente quando comparado a outros subgrupos de tumores de mama, com pouca incidência de metástases linfonodais e ósseas, prevalecendo disseminação hematogênica principalmente para sistema nervoso central e pulmões (Stockmans G, 2008, Tischkowitz M, 2008).

Morfologicamente, carcinomas *basal-like* apresentam alto grau histológico, alto índice mitótico, presença de zonas necróticas centrais, bordas expansivas e infiltrado linfocítico. (Dent R, 2007)

São de certa forma relacionados com os carcinomas metaplásicos e medulares. Geneticamente, com frequência são associados a mutações no *BRCA1*, principalmente naquelas pacientes mais jovens e com história familiar (O'Malley FP, 2008).

1.4.2 Carcinomas de mama triplo-negativos x carcinomas de mama *basal-like*

Existe uma indubitável semelhança entre as principais características descritas na literatura dos tumores de mama triplo-negativos e de fenótipo basal. Em ambas as situações encontramos um perfil de expressão dos marcadores prognósticos semelhante. Os casos apresentam-se geralmente como um tumor grande em uma paciente jovem, afrodescendente, sem comprometimento linfonodal e apresentando metástases hematogênicas (Payne Et al 2008). Pacientes com carcinomas *basal-like* e triplo-negativos têm sobrevida significativamente mais curta após o primeiro episódio de metástase quando comparados a pacientes com tumores não-basais e não-triplo-negativos (Bhargava R, 2008, Anders C, 2008).

À primeira vista, pode parecer óbvio que o subgrupo de carcinomas triplo-negativos representa na verdade aqueles tumores de fenótipo basal.

Entretanto, o grupo das neoplasias triplo-negativas é heterogêneo, não podendo ser considerado uma entidade única. Estudos avaliando expressão de queratinas “basais” e EGFR nos tumores triplo-negativos demonstraram positividade em apenas 56-84% dos casos (*Bhargava R, 2008, Anders C, 2008, Dent R, 2007*).

Além disso, pacientes com doença expressando fenótipo basal tiveram prognóstico diferente, apresentando sobrevida livre de doença significativamente menor do que aquelas com tumores triplo-negativos sem perfil imunoistoquímico basal (*Asklen LA. 2008*). Assim, deve-se ter cautela ao associar um carcinoma de mama triplo-negativo com fenótipo basal. Não se deve usar os termos como sinônimos.

Existe uma parcela menor, entretanto significativa, de tumores triplo-negativos que se apresentam clinicamente menos agressivos e com menor grau histológico. Essas neoplasias provavelmente correspondam a tumores de mama tipo glândula salivar ou a carcinomas apócrinos (*Elsheik SE, 2008*). Na maioria das vezes, pode-se fazer a distinção com bases morfológicas, entretanto há casos onde isso não é possível ser feito com segurança. Tais tumores geralmente não apresentam expressão de queratinas “basais” ou EGFR. Nas lesões apócrinas benignas e nos carcinomas apócrinos *in situ* foi demonstrada positividade para receptor de androgênio, apesar da negatividade para receptores de estrogênio e progesterona. Nos carcinomas apócrinos invasivos essa positividade foi mais variável (*Elsheik SE, 2008*). Assim, em um tumor triplo-negativo, um painel imunoistoquímico com queratinas basais, EGFR e receptor de androgênio pode ajudar a diferenciar carcinoma *basal-like* de carcinoma apócrino.

1.4.3 Aspectos terapêuticos

Carcinomas de mama triplo-negativos constituem em oncologia um dos grupos de câncer de mama mais desafiadores. A única terapia sistêmica atual disponível para tratamento desses tumores é a quimioterapia (*Dent R, 2008 Bhargava R, 2008, Anders C, 2008*). Além disso, as pacientes com frequência

não apresentam resposta completa após tratamento, tendo um prognóstico geralmente pobre, com recidivas precoces e curta sobrevida livre de doença.

Assim como outros tumores de mama associados ao *BRCA1*, o câncer de mama TN não mostra boa sensibilidade a taxanos mesmo tendo alto índice proliferativo, o que indicaria uma boa resposta a esses agentes (*Stockmans G, Deraedt K, Wildiers, 2008*). Uma vez que a maioria dos ensaios clínicos de tratamento dos carcinomas de mama inclui taxanos, são necessários mais estudos com outras drogas para o tratamento dos tumores triplo-negativos. Ensaio com terapias-alvo, incluindo receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e inibidores da poli (ADP-ribose) polimerase (PARP) estão em andamento (*Dent R, Trudeau M, 2008*).

Inibidores da tirosina-quinase têm se mostrado os agentes mais promissores em estudos. Dasatinib, um novo inibidor da tirosina-quinase, tem obtido boa resposta em estudos, preferencialmente nas pacientes com câncer de mama sem expressão de receptores hormonais e HER2 e que apresentam expressão de CK5 e CK17 (*Stockmans G, Deraedt K, Wildiers, 2008*).

A expressão de *c-kit* em tumores de mama negativos para receptores hormonais e HER2 sugeriu a possibilidade de uso de imatinib no tratamento dessas neoplasias. Entretanto há pouca evidência de mutação no gene *KIT* nos carcinomas de mama, que indicaria resposta ao imatinib (*Dent R, Trudeau M, 2008*).

Referências bibliográficas

Allred DC, Bustamante MA, Daniel CO, et al.. Immunocytochemical analysis of estrogen receptors in human breast carcinomas. *Arch Surg* 1990;125:107.

Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2008. 11,1233-1239.

Arnes JB, Bégin LR, Stefansson IM, Brunet JS, Nielsen TO, Foulkes WD, Asklen LA. Expression of EGFR in relation to BRCA1 status, basal-markers and prognosis in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2008.

Barros ACSD, Barbosa EM, Gebrim LH. Diagnóstico e tratamento do câncer de mama. In: Projeto e Diretrizes. Associação Médica Brasileira e Conselho Federal de Medicina. 2001.

Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen-receptor (ER)-negative, progesterone-receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer registry. *Cancer*. 2007. **109**; 1721-1728

Bhargava R, Beriwal S, McManus K, Dabbs DJ. CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008. **130(5)**; 724-730.

Bori R, Cserni G. Basal phenotype in breast carcinoma occurring in women aged 35 or younger. *Pathol. Oncol. Res.* 2008.

Carter CL, Allen C, Henson DE. Relation of tumor size, lymph node status and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7.

Charpin C, Martin P, De Victor B, et al.. Multiparametric study (SAMBA 200) of estrogen receptor immunocytochemical assay in 400 human breast carcinomas: *Cancer Res* 1988;48:1578.

Chevallier B, Mosseri V, Dauce JP, et al.. A prognostic score in histological node negative breast cancer. *Br. J Cancer* 1990; 61:436-40.

Clark GM, McGuire WL. Steroid receptors and other prognostic factors in primary breast cancer. *Semin Oncol* 1988;15:20.

Clark GM. Fatores prognósticos e preditivos. In: Harris JR et al.: *Doenças da Mama*, 2a ed. Rio de Janeiro, Ed MEDSI, 2002, pág. 587-620.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI *et al.* Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2007. **13**;

Elledge RM, Fuqua SAW. Receptores de estrogênio e progesterone. In: Harris JR et al.: *Doenças da Mama*, 2a ed. Rio de Janeiro, Ed. MEDSI, 2002, pág. 565-86.

Elsheik SE, Green AR, Rahka EA *et al.* Caveolin 1 and Caveolin 2 are associates with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotype. *Br. J. Cancer.* 2008. **99(2)**; 327-334.

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;19:403-10.

Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv. Anat. Pathol.* 2008 **14**; 358-373.

Fentiman IS, Hyland D, Chaudary MA, Gregory WM. Prognosis of patients with breast cancer up to 1 cm in diameter. *Eur J Cancer* 1996;32A:417-20.

Fischer B, Slack NH, Bross IDJ. Cancer of the breast: size of neoplasm and prognosis. *Cancer* 1969;24:1071-80.

Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K *et al.* Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res.* 2007. **9**; R4.

Gray RJ. Flexible methods for analyzing survival data using alpines, with applications to breast cancer prognosis. *J Am Stat Assoc* 1992;87:942-51.

Han W, Kim SW, Park IA, et al.. Young age: an independent risk factor for disease free survival in women operable breast cancer. *BMC Cancer* 2004;4:82.

Hanna W, Mobbs B. Comparative evaluation of ER-ICA and enzyme immunoassay for the quantitation of estrogen receptors in breast cancer. *AM J Clin Pathol* 1989;91:182.

Harris J, Lippman M. *Doenças da mama*. 2º edição. MEDSI.

Instituto Nacional do Câncer (INCA). *Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde. 2008

Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur. J. Cancer*. 2008.

Jayasinghe UW, Taylor R, Boyages J. Is age at diagnosis an independent prognostic factor survival following breast cancer? *ANZ J Surg* 2005;75(9): 762-7.

Knight WAL, Livingston RB, Gregory EJ, et al.. Estrogen receptor as an independent prognostic factor for early recurrence in breast cancer. *Cancer Res* 1977;37:4669.

Lee CG, McCormick B, Mazumdar M, et al.. Infiltrating breast carcinoma in patients age 30 years and younger: long term outcome for life, relapse, and second primary tumors. *Int J Radiat Oncol Biol Phys* 1992;23:969-75.

Leong C, Boyages J, Jayasinghe UW et al.. Effects of margins on ipsilateral breast tumor recurrence after breast conservation therapy for lymph node-negative breast carcinoma. *Cancer* 2004;100:1823-32.

Liu NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*. 2008. **113**; 2638-2645.

Molino A, Miceiolo R, Turassa M, et al..Prognostic significance of estrogen receptors in 405 primary breast cancer: a comparison of immunohistochemical and biochemical methods. *Breast Cancer Res Treat* 1997;45:241.

Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Asklen LA. Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women. *APMIS*. 2008. **116 (6)**; 515-525.

Nixon AJ, Neuberg D, Hayes DF, et al.. Relationship of patient age to pathologic features of the tumor and prognosis for patients with stage I or II breast cancer. *J Clin Oncol* 1994;12:888-94.

O'Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. *Histopathology*. 2008. **52**; 3-10.

Palmer MK, Lythgoe JP, Smith A. Prognostic factors in breast cancer. *Br J Surg* 1982;69:697-8.

Parikh RR, Housman D, Yang Q, Toppmeyer D *et al*. Prognostic value of triple-negative phenotype at the time of locally recurrent, conservatively treated breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys*. 2008. **72(4)**; 1056-1063.

Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology*. 2008. **52**; 82-90.

- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000. **406**; 747–752.
- Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2- positive breast cancer. *N Engl J Med* 2005;353(16):1659-72.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007. **50**; 434-438.
- Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR *et al.* Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007. **109**; 25-32.
- Reiner A, Sponza J, Reiner G. Estrogen receptor analysis on biopsies and fine-needle aspirates from breast carcinoma. *Am J Pathol* 1986;125:443
- Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008. **52**; 108-118
- Remmele W, Hildebrand U, Hienz H, et al..Comparative histological, histochemical and biochemical studies on estrogen receptors, lecithin receptors, and Barr bodies in human breast cancer. *Virchows Arch* 1986; 409:127.
- Scarff R & Torloni F. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors. N 2. Geneva: World Health Organization, 1968.
- Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. Smat drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 2002; 1:117.
- Smith I, Procter M, Gelber RD. 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomized controlled trial. *Lancet* 2007;369(9555):29-36.
- Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2001. **98**; 10869–10874.
- .Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2003. **100**; 8418–8423.
- Stierer M, Rosen H, Weber R, et al.. Immunohistochemical and biochemical measurement of estrogen and progesterone receptors in primary breast cancer. *Ann Surg* 1993;218:13.
- Stockmans G, Deraedt K, Wildiers H, Merman P, Paridaens R. Triple- negative breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2008. **20**; 614-620.

Tischkowitz M, Brunet JS, Bégin LR *et al.* Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007. **7**; 134.

Thomas M, Noguchi M, Kitagawa H, *et al.*. Poor prognostic value of proliferating cell nuclear antigen labeling index in breast carcinoma. *J Clin Pathol* 1993;46:525.

Valagussa P, Bonadonna G, Veronesi U. Patterns of relapse and survival following radical mastectomy. Analysis of 716 consecutive patients. *Cancer* 1978;41(3):1170.

Veroseni U, Paganelli G, Galimbert V *et al.*, Sentinel node biopsy to avoid axillary dissection in breast cancer with clinically negative lymph-node. *Lancet*, 1997, 349 (9060), 1864-1867.

Willet WC *et al.* .. Epidemiologia e causas não genéticas do câncer de mama. In: Harris JR *et al.*. *Doenças da Mama*, 2ª Ed. Rio de Janeiro, Ed MEDSI, 2002; 205-259.

Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. The national cancer database report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer* 1996;78:1838-43.

OBJETIVOS

Objetivo Principal

Determinar a associação entre os fatores prognósticos e preditivos no câncer de mama triplo negativo e dos carcinomas não triplo negativos.

Objetivos Específicos

Determinar a associação entre a idade e metástases axilares no grupo de pacientes com câncer de mama triplo negativo, em grupos de faixa etária diferentes em relação ao grupo não triplo negativo.

Determinar a prevalência do câncer de mama triplo negativo.

ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS:**Association between age and axillary metastases in triple-negative breast cancer**

Leônidas Souza Machado*, Cláudio Galleano Zettler**

*Graduated in Mastology from European Institute of Oncology, Milan, Italy; Adviser of Medical Residency in Gynecology and Obstetrics at Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA); Master's student in the Graduation Program in Pathology from Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil.

**Adjunct Professor of Pathology and Professor of the Graduation Program in Pathology at UFCSPA; pathologist at CHSCPA, Brazil.

Correspondence:

Leônidas Souza Machado

Rua Ramiro Barcelos 1323/ apt. 702

CEP: 90035-006

Porto Alegre – RS – Brazil

Phone: + 55 51 3346-4973

E-mail: leonidassm@hotmail.com

ABSTRACT

INTRODUCTION: Triple-negative breast cancer has a poor prognosis when compared with cases of non-triple-negative breast cancer. Young patients are most frequently affected by this type of tumor than patients older than 60 years. The presence of axillary metastases is more prevalent in this type of triple-negative tumor. This study aimed to investigate the association of such factors in these groups of patients.

METHODS: A retrospective study examining a total of 495 patients. Data were collected from patients who underwent surgery for breast cancer between 2003 and 2007 at Hospital Luterano and Hospital Santa Rita, in Porto Alegre, southern Brazil.

RESULTS: A higher incidence of triple-negative breast cancer was observed in younger patients (21.2%, $p = 0.023$) aged up to 40 years, and a lower incidence (12%, $p = 0.023$) in patients older than 60 years. Regarding lymph node involvement, we verified a trend toward the presence of lymph node metastases in patients older than 50 years.

CONCLUSION: Triple-negative breast cancer is not so rare and tends to a very aggressive clinical course, thus becoming increasingly intriguing and the topic of several investigations. Younger patients are most frequently affected by this type of tumor, whereas patients older than 50 years tend to show higher axillary involvement by lymph node metastases. The systematic analysis of molecular subtypes might better discriminate the tumors, broadening our knowledge of staging and conventional pathological analysis.

KEYWORDS: triple-negative breast cancer, age, axillary lymph nodes, lymph node involvement.

INTRODUCTION

Breast cancer is a highly prevalent disease in the world population, as well as a major source of morbidity and mortality. Since the 1950s, breast cancer incidence rates have increased in many countries. In Brazil, data from the National Cancer Institute (INCA) show that the mortality rate for this disease increased considerably between 1979 and 2000, rising from 5.77 to 9.74/100000 women.¹

Breast cancer represents a peculiar situation in oncology, in which specific markers are used to predict disease response to treatment and subsequent treatment planning.^{2,3} The routine use of these prognostic markers enabled the identification of a particular tumor subtype, distinguished by absent expression of hormone receptors (estrogen and progesterone) and HER2, the so-called triple-negative breast cancer. Microarray experiments (using complementary DNA microarrays) carried out by the Stanford group²⁻⁹ demonstrated a systematic variation, allowing classification of tumors into five main groups, two of them with neoplasms that express estrogen receptors (luminal A and luminal B) and three with negative expression of estrogen receptors (normal breast-like, HER2 and basal-like). Most triple-negative breast carcinomas are composed of the basal-like phenotype tumor subgroup (according to the Stanford classification).¹⁰⁻¹⁶ The importance of identifying such tumors lies in the fact that they usually show a more aggressive biological

behavior than that of other subgroups.¹⁷⁻²⁴ Furthermore, specific-targeted therapies for triple-negative breast cancer have been developed and tested in clinical trials,¹⁷⁻¹⁹ usually based on basal-like phenotype tumors. However, a distinction between the terms “triple-negative” and “basal-like” should be made.

Nevertheless, the above-mentioned technology (microarray) is still unavailable in most breast cancer centers. The possibility of identifying the molecular subtypes described in the studies of genetic signature analysis through more accessible, less expensive methodologies, such as those using immunohistochemical techniques, is of paramount importance, particularly when considering the economic restraints faced by several countries, including Brazil.

The use of this breast tumor classification can significantly aid in patient selection, who would have better indication for the use of certain adjuvant therapies after surgery. Therefore, it becomes important to determine the distribution of the different molecular phenotypes among younger and older female patients, whether they have axillary lymph node involvement or not, since many of these patients are likely to receive more or less aggressive treatment solely due to the age group they belong to.

The objective of this study was to investigate the association between age and axillary lymph node involvement in patients with triple-negative and non-triple-negative breast cancer.

MATERIALS AND METHODS

Study population

A retrospective cross-sectional study examining a total of 495 patients diagnosed with breast cancer, who underwent mastectomy at Hospital Luterano and Hospital Santa Rita, in the city of Porto Alegre, southern Brazil, between 2003 and 2007. Data were abstracted from the patients' electronic medical records concerning the variables under study: age, lymph node metastases, and presence of triple-negative markers by immunohistochemical assay.

Data were entered into a Microsoft® Excel database, without using data collection instruments, by interns using a single data entry model and stored as Excel files in two different computers at the Department of Pathology of Hospital Luterano. After data entry, all data were printed out and compared with the original data from the collection questionnaires. After quality control, data were analyzed for coherence and consistency. Conflicting data were double-checked for accuracy. The study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil, under the protocol no. 1815/08.

Statistical analysis

For statistical purposes, data were expressed as absolute (n) and relative (%) frequencies. Statistical analysis was performed using SPSS 10.0 statistical software, through the chi-square exact test.

Histopathological assessment

The histopathological factors studied included: presence or absence of hormone receptors; presence or absence of HER2; patient's age at surgery; and axillary lymph node involvement.

Tissue samples were fixed in formalin, embedded in paraffin wax, and stained with hematoxylin and eosin (HE) for histopathological diagnosis. Additional histological sections were cut for immunohistochemical staining, which was performed in 2 µm thick sections, mounted on histological organosilicon-treated slides. For each reaction, known positive tissue (control) was used as a positive control for the antibody under study.

Sections were dewaxed by heating in a stove at 70°C for one hour and rehydrated in serial dilutions of xylol and ethanol, followed by washing in running water and a final wash in distilled water. Slides were then subjected to antigen retrieval using a Pascal microprocessor-controlled pressure chamber for 20 minutes; estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) in Tris/EDTA buffer (pH 8.0), and c-erb-B2 in citrate buffer (pH 6.0). After antigen retrieval, endogenous peroxidase activity was blocked with a 3% solution of hydrogen peroxide for 20 minutes.

Overnight incubation at 4°C was then performed with the following primary antibodies: monoclonal mouse antihuman ER antibody, clone 1D5 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark; 1:100 dilution); monoclonal mouse antihuman PR antibody, clone PgR 636 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark; 1:100 dilution); and polyclonal antibody c-erb-B2 (DakoCytomation, Glostrup, Denmark; 1:200 dilution). Detection was achieved with the EnVision+Dual Link kit (DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Immunostaining was developed using 3,3'-diaminobenzidine (Liquid DAB; DakoCytomation, Glostrup, Denmark). Sections were stained with Harris' hematoxylin for 1 minute and counterstained with ammonia for 1 minute. The slides were then mounted in Canada balsam and sent to a pathologist.

Immunohistochemical analysis, performed by two pathologists, was classified as positive for ER and PR in the presence of a stained tumor cell and for HER2 in the presence of strong staining in more than 30% of cell membranes (score 3).

RESULTS

Out of a total of 495 patients, 461 (93.13%) showed molecular evidence and, therefore, composed the final database; 64 (13.88%) patients showed absent expression of hormone receptors (estrogen and progesterone) and HER2, but the medical records of five of these patients were lacking information on age. The final study sample comprised 59 (12.8%) patients with triple-negative breast cancer. Regarding lymph node involvement, 36 patients had this variable recorded on their electronic medical records and were included in the final study sample.

Of this total, 59 (12.8%) patients showed absent expression of hormone receptors (estrogen and progesterone) and HER2, constituting the triple-negative (TN) group; whereas in 402 (87.2%) patients expression of at least one of the markers studied was present, constituting the non-triple-negative (NTN) group.

Once the TN and NTN groups were established, both groups were divided into four subgroups, according to age, for comparison purposes: patients aged up to 40 years (n = 52); patients aged 41-50 years (n = 131); patients aged 51-60 years (n = 126); and patients older than 60 years (n = 152). In the group of patients aged 40 years or younger, 11 patients (21.2%; p =

0.023) had TN carcinoma and 41 patients (78.8%; $p = 0.023$) had NTN carcinoma. Regarding the group older than 60 years, 140 patients (92.1%; $p = 0.023$) were included in the NTN group and only 12 patients (7.9%; $p = 0.023$) in the TN group. The mean age of patients with TN expression was 59 years [$p = 0.131$; standard deviation (SD) 13.2], whereas in the NTN group mean age was 55.6 years ($p = 0.131$; SD 12.8) (Table 1).

Table 1 – Association between age and presence or absence of triple-negative breast cancer

		Group		Total
		Absence of Triple-Negative	Presence of Triple-Negative	
Age	Up to 40 years	41 78.8%	11 21.2%	52 100.0%
	41 to 50 years	117 89.3%	14 10.7%	131 100.0%
	51 to 60 years	104 82.5%	22 17.5%	126 100.0%
	Over 60 years	140 92.1%	12 7.9%	152 100.0%
Total	402 87.2%	59 12.8%	461 100.0%	

In the present study, a total of 36 patients with an established TN phenotype showed either presence ($n = 23$, 63.8%) or absence ($n = 13$, 36.1%) of lymph node metastases, thus being compared regarding presence of lymph node metastases (PLNM) and absence of lymph node metastases (ALNM) (Table 2). The age group established for comparison was 40 to 60 years old. A total of 14 TN patients (38.9%) were aged between 40 and 50 years. Of these, 6 patients (46.2%; $p = 0.374$) showed ALNM and 8 patients (34.8%; $p = 0.374$) showed PLNM. A total of 22 TN patients (61.1%) were aged between 51 and 60

years. Of these, 15 patients (65.2%; $p = 0.374$) showed PLNM, whereas 7 patients (37.8%; $p = 0.374$) showed ALNM. The mean age of these 36 patients was 53.9 years (SD 13.3 years).

A total of 221 patients composed the NTN group. Of these, 117 patients (52.9%) were aged between 40 and 50 years, and 104 patients (47.1%) were aged between 51 and 60 years. Axillary lymph node involvement was found in 98 patients (44.3%, $p = 0.133$) and ALNM was observed in 123 patients (55.7%, $p = 0.133$).

Therefore, a more aggressive tumor behavior could be identified among TN cases, since the number of TN patients identified with lymph node metastases was higher than that of NTN breast cancer cases. Data from the literature are in agreement with our findings, indicating axillary lymph node involvement in approximately 65% of TN cases and in 40% of NTN cases.^{1,2,6,13,20,24}

Table 2 – Association between age and presence or absence of lymph node metastases in patients with triple-negative breast cancer

		Lymph node metastases		Total
		Negative	Positive	
Age	40 to 50 years	6 46.2%	8 34.8%	14 38.9%
	51 to 60 years	7 53.8%	15 65.2%	22 61.1%
Total		13 100.0%	23 100.0%	36 100.0%

DISCUSSION

Breast cancer is a globally prevalent disease, and incidence rates increase with age.^{1,7,9} In Brazil, an estimated 50,000 new cases of breast cancer occur per year.¹ Regarding prevalence in different age groups, as in the study by Carey et al., which showed higher prevalence of triple-negative breast cancer among younger patients, we also verified higher prevalence in patients aged 40 years or younger, showing 21.2% of these cases, whereas the mean found in our study among the general population was 12.8%, and the literature indicates 12 to 15% of triple-negative breast cancer cases.^{3,4,6,8,12,16,19}

Axillary involvement due to breast cancer metastases is still considered one of the most important factors for prognosis of patients affected by this disease, translating into poorer prognosis, shorter survival, shorter disease-free interval, and greater possibility of relapse. Among the general population, around 40% of axillary involvement is found in breast cancer.^{2,7,13,14,18,22} In our study, as well as in the literature, although triple-negative breast cancer has a poorer prognosis and affects younger patients, greater axillary involvement was observed in older patients, exhibiting a more aggressive behavior also in this age group, with an incidence of 65.2% of axillary metastases in patients over 50 years of age. The systematic analysis of molecular subtypes might better discriminate the tumors, broadening our knowledge of staging and conventional pathological analysis.

CONCLUSION

Triple-negative breast cancer represents 10 to 17% of breast carcinomas,^{5,16,21} which was verified in our study, corresponding to 12.8% of the

total sample. Such tumors pose a therapeutic challenge to the oncologist, due to their unresponsiveness to hormone therapy or HER2-targeted therapy (trastuzumab),^{5,16,21} leaving the main therapeutic role to chemotherapy.²¹ Other studies point out that the basal-like subtype corresponds to 15% of all breast carcinomas.^{11,22,23}

Recent studies have characterized triple-negative breast cancer as having the poorer prognosis, shorter disease-free interval, shorter metastasis-free interval, and shorter survival, in addition to showing the most aggressive clinical course and a different mode of spread, preferably hematogenous.^{5,21,22} Several studies have indicated a strong relationship with BRCA gene.^{14,11,21,22,23,24} According to the study by Mersin et al.,²² 90% of breast cancer cases that show BRCA1 mutations are also triple-negative carcinomas.

In general, this type of tumor affects younger women (< 50 years of age), occurring more often in black patients.^{5,21,22} In order to characterize tumor size, the TNM classification is used, in which T1 corresponds to tumors up to 1.99 cm, T2 to tumors 2 to 4.99 cm, T3 to tumors 5 to 9.99 cm, and T4 to tumors equal to or greater than 10 cm.² Data from the literature describe the majority of triple-negative breast carcinomas as T2.^{11,22,23}

The characteristic heterogeneity of breast cancer is a challenge to the study and treatment of this tumor. The literature proposes four different classifications for prognostic purposes: histopathological classification, TNM classification, classification of the degree of tumor differentiation, and molecular classification. Within the molecular classification, five new groups are proposed, based on the presence or absence of the expression of estrogen receptor. Among these groups, a carcinoma subgroup became particularly relevant due

to an aggressive biological behavior: the so-called triple-negative (TN) phenotype breast cancer, which is characterized by absent expression of hormone receptors (estrogen and progesterone) and HER2 in immunohistochemical analyses. This group, however, shows prognostic characteristics similar to those observed in the basal-like breast carcinoma subgroup.

In our study, we verified that triple-negative breast cancer is not a rare occurrence, being observed in 12.8% of all patients analyzed. Among TN cases, we observed higher prevalence in patients younger than 40 years (21.2%, $p = 0.023$), whereas NTN tumors were more prevalent in women older than 60 years (92.3%, $p = 0.023$). These data suggest that younger patients are more frequently affected by the TN tumor subtype. Regarding lymph node involvement, we verified a trend toward the presence of lymph node metastases in patients older than 50 years, which corroborates the aggressive behavior observed in this carcinoma subtype.

Therefore, it becomes necessary to fully understand this neoplasia, by standardizing the classification in order to establish definitive prognostic and therapeutic goals.

Triple-negative breast cancer comprises a heterogeneous group of tumors. Although much attention has been drawn to these carcinomas, currently there is no international consensus about how best to define these neoplasms. Studies have used different criteria and parameters, and there seems to be little communication among authors. Apparently, most triple-negative carcinomas have a basal-like phenotype, which explains the aggressive behavior of these tumors. However, there is a small, but significant, number of triple-negative non-

basal-like tumors. Therefore, a distinction between these entities proves to be necessary, since prognostic and therapeutic aspects may be significantly different.

In conclusion, triple-negative breast cancer is not so rare and tends to a very aggressive clinical course. This breast tumor subtype has become increasingly intriguing and the topic of several investigations due to its unresponsiveness to both antiestrogen therapy and therapy with monoclonal antibody. In order to investigate new treatment strategies and increase knowledge about the prognosis of this neoplasia, we conducted the present study to correlate epidemiological profile, through patients' age, with breast cancer diagnosis and tumor size.

Chemotherapy is currently the only systemic treatment modality for triple-negative breast carcinomas. Nevertheless, clinical trials with specific-targeted therapies have been conducted, with promising results. The routine use of these new therapies is likely to lead to the routine analysis of other markers of therapeutic response, such as EGFR and PARP.

REFERENCES

1. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro. Ministério da Saúde 2008.
2. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology*. 2008. **52**; 82-90.
3. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000. **406**; 747–752.
4. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2001. **98**; 10869–10874.
5. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2003. **100**; 8418–8423.
6. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008. **52**; 108-118.
7. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2007. **13**; 4429-4434.
8. Parikh RR, Housman D, Yang Q, Toppmeyer D et al. Prognostic value of triple-negative phenotype at the time of locally recurrent, conservatively treated breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2008. **72(4)**; 1056-1063.
9. Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2008. **11**, 1233-1239.
10. Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur. J. Cancer*. 2008.
11. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen-receptor (ER)-negative, progesterone-receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer registry. *Cancer*. 2007. **109**; 1721-1728.
12. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv. Anat. Pathol.* **14**; 358-373.
13. Bori R, Cserni G. Basal phenotype in breast carcinoma occurring in women aged 35 or younger. *Pathol. Oncol. Res.* 2008

14. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007. **50**; 434-438.
15. Bhargava R, Beriwal S, McManus K, Dabbs DJ. CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the "basal-like" phenotype of breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008. **130(5)**; 724-730.
16. Arnes JB, Bégin LR, Stefansson IM, Brunet JS, Nielsen TO, Foulkes WD, Asklen LA. Expression of EGFR in relation to BRCA1 status, basal-markers and prognosis in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2008.
17. Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Asklen LA. Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women. *APMIS*. 2008. **116 (6)**; 515-525.
18. Elsheikh SE, Green AR, Rakha EA *et al.* Caveolin 1 and Caveolin 2 are associated with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotype. *Br. J. Cancer*. 2008. **99(2)**; 327-334.
19. Lin NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer*. 2008. **113**; 2638-2645.
20. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K *et al.* Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*. 2007. **9**; R4.
21. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR *et al.* Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007. **109**; 25-32
22. Tischkowitz M, Brunet JS, Bégin LR *et al.* Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007. **7**; 134
23. O'Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. *Histopathology*. 2008. **52**; 3-10.
24. Stockmans G, Deraedt K, Wildiers H, Merman P, Paridaens R. Triple-negative breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2008. **20**; 614-620.

ARTIGO CIENTÍFICO EM PORTUGUÊS:

Associação da idade e metástases axilares no câncer de mama triplo negativo

Leônidas Souza Machado*, Cláudio Galleano Zettler**

*Pós-graduado em Mastologia pelo Instituto Europeu de Oncologia, Milão, Itália, Preceptor da Residência Médica em Ginecologia e Obstetrícia do Complexo Hospitalar Santa Casa de Porto Alegre (CHSCPA), Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA.

**Professor Adjunto de Patologia e Professor do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA. Patologista do CHSCPA.

Endereço para correspondência:

Leônidas Souza Machado

Rua Ramiro Barcelos 1323/ apto: 702

CEP: 90035-006

Porto Alegre – RS

Fone: (55) 51 33464973

e-mail: leonidassm@hotmail.com

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de mama triplo negativo apresenta um prognóstico pior quando comparado com os casos de câncer de mama não triplo negativo. As pacientes jovens são mais acometidas por este tipo de tumor que as pacientes com mais de 60 anos de idade. A presença de metástases axilares é mais prevalente neste tipo de tumor triplo negativo. Este estudo visa a investigação da associação desses fatores nestes grupos de pacientes.

MATERIAIS E MÉTODOS: Estudamos retrospectivamente 495 pacientes na totalidade. Os dados foram coletados de pacientes submetidas à cirurgia por câncer de mama no período de 2003 à 2007, nos hospitais Santa Casa de Porto Alegre e Hospital Universitário da Ulbra de Porto Alegre.

RESULTADOS: Foi observada uma maior incidência de câncer de mama triplo negativo nas pacientes jovens (21,2%, p 0,023), com até 40 anos de idade e uma incidência menor (12%, p 0,023), em pacientes com mais de 60 anos de idade. Em relação ao comprometimento linfonodal, verificou-se uma tendência à presença de metástases linfonodais em pacientes com mais de 50 anos de idade.

CONCLUSÃO: O câncer de mama triplo negativo não é tão raro e tende a mostrar-se muito agressivo em seu curso. Ele torna-se cada vez mais intrigante e alvo de inúmeras pesquisas. As pacientes mais jovens são mais acometidas por esse tipo de tumor, enquanto que as pacientes com mais de 50 anos de

idade têm uma tendência a apresentar maior acometimento axilar por metástases linfonodais. A análise sistemática dos subtipos moleculares pode melhor discriminar os tumores, acrescentando informação ao estadiamento e a análise patológica convencional.

Palavras chaves: câncer mama triplo negativo, idade, linfonodos axilares, comprometimento linfonodal.

INTRODUÇÃO

O câncer de mama na população mundial é uma doença altamente prevalente e de importante morbimortalidade. Desde a década de 50 suas taxas de incidência têm aumentado em muitos países. No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a taxa de mortalidade por esta patologia apresentou um aumento considerável de 1979 a 2000, de 5,7 para 9,74/100000 mulheres¹.

O câncer de mama apresenta uma situação peculiar em oncologia, na qual marcadores específicos são utilizados para prever resposta da doença ao tratamento e consequente planejamento terapêutico^{2,3}. O uso rotineiro dessa avaliação de marcadores prognósticos permitiu a identificação de um subgrupo especial de tumores, reconhecidos pela ausência de expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e de HER2, chamados carcinomas de mama triplo-negativos. Estudos de *microarray* (microarranjos com DNA complementar) do grupo de Stanford²⁻⁹ demonstraram uma variação sistemática, permitindo classificar os tumores em cinco grupos principais,

sendo dois com neoplasias que expressam receptores de estrogênio (luminal A e luminal B) e três com expressão negativa de receptores de estrogênio (*normal breast-like*, HER2 e *basal-like*).

A grande maioria dos carcinomas de mama triplo-negativos é constituída pelo subgrupo de tumores de fenótipo basal (*basal-like*, pela classificação do grupo de Stanford)¹⁰⁻¹⁶. A importância do reconhecimento de tais tumores reside no fato de que geralmente eles apresentam comportamento biológico mais agressivo do que os outros subgrupos¹⁷⁻²⁴. Além disso, tratamentos específicos para os carcinomas de mama triplo-negativos têm sido desenvolvidos e estão sendo estudados em ensaios clínicos¹⁷⁻¹⁹, geralmente baseados em neoplasias de fenótipo basal. Deve-se, no entanto, fazer distinção entre os termos triplo-negativo e *basal-like*.

No entanto, essa nova tecnologia citada anteriormente (*microarray*) ainda se encontra inacessível na maior parte dos centros que tratam pacientes com câncer de mama. A possibilidade de identificar os subtipos moleculares descritos nos estudos de análise de assinatura genética através de metodologias mais acessíveis e de menor custo, como com o uso de técnicas de imunohistoquímica, é de fundamental importância, principalmente se levarmos em consideração as limitações econômicas encontradas em países como o Brasil.

O uso desta classificação dos tumores de mama pode auxiliar de forma significativa na seleção das pacientes que teriam melhor indicação de uso de determinados tratamentos adjuvantes após a cirurgia. Torna-se importante, então, a determinação da distribuição dos fenótipos moleculares entre pacientes mais jovens e mais idosas, com comprometimento axilar ou não,

visto que muitas pacientes tendem a receber tratamentos mais ou menos agressivos apenas devido à faixa etária a qual fazem parte.

O objetivo deste estudo é investigar a associação entre a idade e o comprometimento axilar em pacientes com câncer de mama TN e NTN

MATERIAIS E MÉTODOS

Delineamento do estudo

Estudo transversal retrospectivo.

População e amostra

A partir da leitura de prontuários eletrônicos de pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama, submetidas à mastectomia no Hospital Luterano e no Hospital Santa Rita, na cidade de Porto Alegre, Brasil, no período de 2003 a 2007, coletou-se o banco de dados com as variáveis em estudo: idade, metástases linfonodais e a presença de marcadores TN através do estudo imuno-histoquímico. O banco de dados compreendia 495 pacientes na totalidade.

Os dados foram coletados dos registros eletrônicos de todos os pacientes submetidos à mastectomia no período proposto e registrados posteriormente em um banco de dados do EXCEL MICROSOFT, sem instrumento de coleta. Os bancos de dados foram armazenados em dois computadores. Os bancos de dados foram digitados por bolsistas no modelo digitação única e armazenados em arquivo no setor de Patologia do Hospital

Luterano em EXCEL. Terminada a fase de digitação, todos os dados do banco foram impressos e conferidos com os questionários originais de coleta. Depois de terminado o controle de qualidade, foi realizada a análise de consistência e coerência dos dados. Os dados considerados com problemas foram conferidos novamente nos questionários originais. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, sendo aprovado e protocolado sob o número 1815/08.

Análise estatística

Para a realização da análise estatística, os dados foram apresentados por meio de frequências absolutas (n) e relativas (%). Esse banco de dados foi posteriormente submetido ao programa SPSS versão 10.0, através do Teste Exato do Qui-Quadrado, para análise estatística.

Avaliação histopatológica/ informações técnicas

Os fatores histopatológicos avaliados incluíram a presença ou a ausência de receptores hormonais, a presença ou a ausência de Her-2, a idade da paciente no momento da cirurgia e o comprometimento dos linfonodos axilares.

Todos os tecidos foram fixados em formalina, incluídos em parafina e corados com hematoxilina e eosina (HE) para o diagnóstico histopatológico. Secções histológicas adicionais foram realizadas para as colorações imuno-

histoquímicas. A coloração imuno-histoquímica foi realizada em cortes histológicos de 2µm de espessura, dispostos em lâminas histológicas previamente tratadas com o aderente Organosilano. Para cada reação, utilizou-se, como controle positivo, tecido sabidamente positivo (controle) para o anticorpo testado.

Foi feita a desparafinização em estufa a 70°C durante uma hora, seguida de passagens sucessivas em xilol e etanol e posteriormente lavagens em água corrente, e a última em água destilada. Posteriormente, realizou-se a recuperação antigênica na Câmara de Pressão controlada por Microprocessador Pascal por 20 minutos; o RE e RP, em tampão TRIS/EDTA ph 8, e o c-erb-B2, em CITRATO ph 6. Após a recuperação antigênica foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos.

Após, foi realizada a incubação overnight a 4°C com os anticorpos primários: Monoclonal Mouse Anti-Human Estrogen Receptor, clone 1D5, Monoclonal Mouse Anti-Human Progesterone Receptor, clone: PgR 636 e Anticorpo policlonal c-erb-B2, todos da Dako. A diluição utilizada para o RE e RP foi 1:100, e o c-erb-B2 é 1:200. O sistema de detecção utilizado foi o kit EnVision Dual link (Dako) . Para visualização da reação, as lâminas foram tratadas com solução de 3,3´diaminobenzidina (Liquid DAB – DakoCytomation). Os cortes foram corados com hematoxilina de Harris, por 1 minuto e contra-corados com amônia por 1 minuto. Após, as lâminas são montadas com bálsamo do Canadá e encaminhadas ao patologista.

A análise imuno-histoquímica, realizada por dois patologistas, é classificada como positiva para RE e RP na presença de uma célula

neoplásica corada e para o Her2 na presença de coloração forte em mais de 30% das membranas celulares (escore3).

RESULTADOS

Deste total de 495 pacientes, 461 (93,13%) apresentaram o resultado do estudo molecular, formando, portanto, o banco de dados final; 64 pacientes (13,88%) apresentaram ausência de expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e HER2, porém a idade de cinco pacientes desse grupo estava ausente. O grupo final em estudo foi de 59 (12,8%) pacientes com carcinoma de mama TN. Em relação ao comprometimento linfonodal, 36 pacientes apresentavam a variável no prontuário eletrônico, constituindo o grupo final estudado.

Deste total, 59 pacientes (12,8%) apresentaram ausência de expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e de Her-2, estabelecendo o grupo de triplo negativo (TN). Ao passo que em 402 pacientes (87,2%) constatou-se a presença de expressão em pelo menos um dos marcadores estudados estabelecendo o grupo não triplo negativo (NTN).

Uma vez estabelecidos os grupos de pacientes TN e NTN, compararam-se os dois grupos em quatro divisões de idade: até 40 anos de idade (total de 52 pacientes), de 41 a 50 anos de idade (total de 131 pacientes), de 51 a 60 anos de idade (total de 126 pacientes) e com mais de 60 anos de idade (total de 152 pacientes). Do grupo de até 40 anos, verificou-se que 11 pacientes (21,2%, $p = 0,023$) apresentaram o carcinoma TN e 41 pacientes (78,8%, $p = 0,023$) apresentaram o carcinoma NTN. Em relação ao grupo com mais de 60

anos de idade, 140 pacientes (92,1%, p 0,023) compreenderam o grupo NTN e 12 pacientes apenas (7,9%, p 0,023) compreenderam o grupo TN. A média de idade dos pacientes com expressão TN foi 59 anos (p 0,131; desvio-padrão 13,2), enquanto que no grupo NTN foi 55,6 anos (p 0,131; desvio-padrão 12,8).

(Tabela 1). Relação da idade com a presença ou a ausência de triplo negativo.

Idade	Grupo		Total
	Ausência de Triplo Negativo	Presença de Triplo Negativo	
Até 40 anos	41 78,8%	11 21,2%	52 100,0%
41 a 50 anos	117 89,3%	14 10,7%	131 100,0%
51 a 60 anos	104 82,5%	22 17,5%	126 100,0%
Mais de 60 anos	140 92,1%	12 7,9%	152 100,0%
Total	402 87,2%	59 12,8%	461 100,0%

O total de pacientes TN no estudo com presença de metástases linfonodais (PML) e ausência de metástases linfonodais (AML) compreendeu 36 pacientes (Tabela 2). Compararam-se, portanto, pacientes com o fenótipo TN estabelecido com presença de metástases linfonodais (23 pacientes- 63,8%) e ausência de metástases linfonodais (13 pacientes- 36,1%). A faixa de idade estabelecida para a comparação entre 40 e 60 anos. Em pacientes TN com idade entre 40 e 50 anos, 6 pacientes (46,2%, p 0,374) apresentaram AML e 8 pacientes (34,8%, p 0,374) apresentaram PML. O total de pacientes estudadas com idade entre 40 e de 50 anos foi 14 pacientes (38,9%). Entre 51

e 60 anos de idade foram estudadas 22 pacientes (61,1%). Destas, 15 pacientes (68,2%, p 0,374) apresentaram PML, enquanto que 7 pacientes (31,8%, p 0,374) apresentaram AML. A média de idade dessas 36 pacientes foi 53,9 anos (desvio-padrão 13,3 anos).

O grupo NTN totalizou 221 pacientes. Deste total, 117 pacientes (52,9%) encontram-se entre 40 e 50 anos de idade e 104 (47,1%) encontram-se entre 51 e 60 anos.

O comprometimento axilar foi encontrado em 98 pacientes (44,3%, p 0,133) e AML em 123 pacientes (55,7% p 0,133).

Sendo assim, podemos identificar uma maior agressividade tumoral nos casos TN, pois foi identificado um maior número de casos de pacientes com metástases linfonodais quando comparados com os casos de câncer de mama NTN. Os dados da literatura são concordantes com a nossa pesquisa, demonstrando um comprometimento axilar de cerca de 65% dos casos TN e de 40% nos NTN ^{1,2,6,13,20,24}.

(Tabela2) Relação da idade com a presença ou a ausência de metástases axilares em pacientes com câncer de mama triplo negativo.

		Metastases Linfonodais		Total
		Negativo	Positivo	
Faixa de Idade	40 a 50 anos	6 46,2%	8 34,8%	14 38,9%
	51 a 60 anos	7 53,8%	15 65,2%	22 61,1%
Total		13 100,0%	23 100,0%	36 100,0%

DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença de alta prevalência mundial sendo que sua incidência aumenta com a idade^{1,7,9}. No Brasil são estimados em torno de 50.000 novos casos de câncer de mama por ano¹. Em relação a prevalência nas diferentes faixas etárias, assim como no estudo de Carey et al. que demonstrou uma maior prevalência de câncer de mama triplo negativo em pacientes mais jovens, também verificamos uma maior prevalência em pacientes com menos de 40 anos de idade, sendo demonstrado 21,2% destes casos, enquanto que a média encontrada no nosso estudo da população geral foi de 12,8%, e na literatura é encontrado de 12 a 15% de câncer de mama triplo negativo^{3,4,6,8,12,16,19}.

O comprometimento axilar por metástases do câncer de mama ainda é considerado um dos fatores mais importantes para o prognóstico das pacientes acometidas por esta patologia, significando um pior prognóstico, com menor tempo de sobrevida, menor tempo livre de doença e maior a possibilidade de recidiva da doença, sendo encontrada em torno de 40% de acometimento axilar no câncer de mama na população geral^{2,7,13,14,18,22}.

No nosso estudo, assim como na literatura, foi demonstrado que apesar do câncer de mama triplo negativo ter um pior prognóstico e acometer pacientes mais jovens, foi observado um acometimento axilar maior em pacientes com mais idade, sendo mais agressivo também nesta faixa etária, sendo encontrado 65,2% de metástases axilares em pacientes com mais de 50 anos de idade. A análise sistemática dos subtipos moleculares pode melhor discriminar os tumores, acrescentando informação ao estadiamento e a análise patológica convencional.

CONCLUSÕES FINAIS

O carcinoma de mama triplo negativo corresponde entre 10 a 17% dos carcinomas de mama,^{5, 16, 21} fato que se verificou em nosso estudo, correspondendo a 12,8% da amostra. Tais tumores representam um desafio terapêutico ao oncologista, uma vez que não são responsivos ao tratamento hormonal ou à terapia direcionada ao HER2 (trastuzumab)^{5, 16, 21}, deixando o papel terapêutico principal à quimioterapia.²¹ Outros estudos apontam que o subtipo basal corresponde a 15% de todos os carcinomas de mama.^{11,22, 23}

Estudos atuais caracterizam o carcinoma de mama triplo negativo como o de pior prognóstico, menor tempo livre da doença, menor tempo livre de metástase, menor sobrevida, além de ser o tipo mais agressivo. Apresenta disseminação diferente, preferencialmente hematogênica.^{5, 21, 22} Muitos estudos indicam uma forte relação com o gene BRCA 1^{4, 11, 21, 22, 23, 24} De acordo com a pesquisa de Mersin et al.²², 90% dos casos de carcinoma de mama que apresentam mutação do gene BRCA 1 são também triplo negativos.

Geralmente, acomete mulheres mais jovens (<50 anos de idade) e são mais freqüentes nas pacientes afrodescendentes.^{5, 21, 22} Para caracterizar o tamanho do tumor, usa-se o esquema TNM, no qual T1 corresponde a tumores de até 1,99 cm, T2 a tumores de 2 a 4,99 cm, T3 a tumores de 5 a 9,99 cm e T4 a tumores iguais ou maiores a 10 centímetros.² Os dados fornecidos pela literatura enquadram a grande maioria dos carcinomas de mama triplo negativo em T2.^{11, 22, 23}

A heterogeneidade característica do carcinoma de mama é um desafio para o estudo e para o tratamento desse tumor. A literatura propõe quatro diferentes classificações com fins prognósticos: classificação histopatológica, classificação TNM, classificação do grau de diferenciação do tumor e classificação molecular. Através da classificação molecular, cinco novos grupos foram propostos, baseados na presença ou ausência de expressão do receptor de estrogênio. Dentre esses grupos, um subgrupo de carcinoma tornou-se relevante pela agressividade de seu comportamento biológico: o chamado carcinoma de mama com fenótipo triplo negativo (TN), o qual é caracterizado por ausência de expressão de receptores hormonais (estrogênio e

progesterona) e HER2 no estudo imuno-histoquímico. Esse grupo, no entanto, apresenta características prognósticas semelhantes ao subgrupo de carcinoma de mama *basal-like*.

Verificou-se, através do nosso estudo, que o carcinoma de mama com o fenótipo triplo negativo não é raro, sendo responsável por 12,8% do total de pacientes analisadas. Dentre os casos TN, notou-se uma maior prevalência em pacientes com menos de 40 anos de idade (21,2%, p 0,023), enquanto que os tumores NTN são mais prevalentes em mulheres com mais de 60 anos de idade (92,3%, p 0,023). Esses dados permitem caracterizar o acometimento de pacientes mais jovens pelo subtipo TN. Em relação ao comprometimento linfonodal, verificou-se uma tendência à presença de metástases linfonodais em pacientes com mais de 50 anos de idade. Isso corrobora o comportamento agressivo desse subtipo de carcinoma.

Dessa forma, faz-se necessário o completo entendimento dessa neoplasia, através da padronização da classificação, para definir metas prognósticas e terapêuticas definitivo

O grupo dos carcinomas de mama triplo-negativos é constituído por uma parcela heterogênea de tumores. Apesar de muita atenção ser dada atualmente a esses carcinomas, falta um consenso internacional sobre como definir precisamente essas neoplasias. Estudos utilizam diferentes critérios e parâmetros e parece existir pouca comunicação entre os autores. Aparentemente, a maioria dos carcinomas triplo-negativos é de fenótipo basal, o que explica o comportamento agressivo desses tumores. Entretanto, existe uma pequena, porém significativa, parcela de carcinomas triplo-negativos não basais. A distinção entre essas entidades é necessária, uma vez que aspectos prognósticos e terapêuticos podem ser significativamente diferentes.

Conclui-se que o carcinoma de mama triplo negativo não é tão raro e que tende a se mostrar muito agressivo em seu curso. Ele torna-se cada vez mais intrigante e alvo de inúmeras pesquisas, por não responder à terapia antiestrogênica nem à terapia com o anticorpo monoclonal. Para melhor descobrir estratégias de tratamento e o melhor conhecimento do prognóstico desta neoplasia, realizamos este estudo, que tem por finalidade caracterizar o perfil epidemiológico, por meio de idade das pacientes, com o diagnóstico de câncer de mama e o tamanho do tumor.

Atualmente a quimioterapia é a única modalidade sistêmica de tratamento para os carcinomas de mama triplo-negativos. Ensaios clínicos com terapias-alvo estão sendo conduzidos, com resultados promissores. A utilização dessas novas terapias rotineiramente provavelmente acarretará análise de rotina de outros marcadores de resposta terapêutica, como EGFR e PARP.

Referências bibliográficas

01. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde 2008. Available in: [HTTP://www.inca.gov.br](http://www.inca.gov.br) 2009.
02. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. *Histopathology*. 2008. **52**; 82-90.
03. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000. **406**; 747–752.
04. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2001. **98**; 10869–10874.
05. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A.* 2003. **100**; 8418–8423.
06. Reis-Filho JS, Tutt ANJ. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008. **52**; 108-118.
07. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2007. **13**; 4429-4434.
08. Parikh RR, Housman D, Yang Q, Toppmeyer D et al. Prognostic value of triple-negative phenotype at the time of locally recurrent, conservatively treated breast cancer. *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2008. **72(4)**; 1056-1063.
09. Anders C, Carey LA. Understanding and treating triple-negative breast cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2008. **11**, 1233-1239.
10. Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur. J. Cancer*. 2008.
11. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen-receptor (ER)-negative, progesterone-receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer registry. *Cancer*. 2007. **109**; 1721-1728.
12. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv. Anat. Pathol.* **14**; 358-373.

13. Bori R, Cserni G. Basal phenotype in breast carcinoma occurring in women aged 35 or younger. *Pathol. Oncol. Res.* 2008.
14. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology.* 2007. **50**; 434-438.
15. Bhargava R, Beriwal S, McManus K, Dabbs DJ. CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the "basal-like" phenotype of breast carcinoma. *Am. J. Clin. Pathol.* 2008. **130(5)**; 724-730.
16. Arnes JB, Bégin LR, Stefansson IM, Brunet JS, Nielsen TO, Foulkes WD, Asklen LA. Expression of EGFR in relation to BRCA1 status, basal-markers and prognosis in breast cancer. *J. Clin. Pathol.* 2008.
17. Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Asklen LA. Expression of EGFR and c-kit is associated with the basal-like phenotype in breast carcinomas of African women. *APMIS.* 2008. **116 (6)**; 515-525.
18. Elsheik SE, Green AR, Rakha EA *et al.* Caveolin 1 and Caveolin 2 are associated with breast cancer basal-like and triple-negative immunophenotype. *Br. J. Cancer.* 2008. **99(2)**; 327-334.
19. Liu NU, Claus E, Sohl J, Razzak AR, Arnaout A, Winer EP. Sites of distant recurrence and clinical outcomes in patients with metastatic triple-negative breast cancer: high incidence of central nervous system metastases. *Cancer.* 2008. **113**; 2638-2645.
20. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K *et al.* Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res.* 2007. **9**; R4.
21. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR *et al.* Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007. **109**; 25-32.
22. Tischkowitz M, Brunet JS, Bégin LR *et al.* Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2007. **7**; 134.
23. O'Malley FP, Bane A. An update on apocrine lesions of the breast. *Histopathology.* 2008. **52**; 3-10.
24. Stockmans G, Deraedt K, Wildiers H, Merman P, Paridaens R. Triple-negative breast cancer. *Curr. Opin. Oncol.* 2008. **20**; 614-620.

ANEXOS

		Grupo		Total
		Ausência de Triplo Negativ o	Presença de Triplo Negativ o	
Idade	Até 40 anos	41	11	52
		78,8%	21,2%	100,0%
	41 a 50 anos	117	14	131
		89,3%	10,7%	100,0%
51 a 60 anos		104	22	126
		82,5%	17,5%	100,0%
Mais de 60 anos		140	12	152
		92,1%	7,9%	100,0%
Total		402	59	461
		87,2%	12,8%	100,0%

Relação da idade com a presença ou a ausência de triplo negativo.

Tabela 1.

		Metastases Linfonodais		Total
		Negativ o	Positiv o	
Faixa de Idade	Menos de 50 anos	6	8	14
		46,2%	34,8%	38,9%
50 anos ou mais		7	15	22
		53,8%	65,2%	61,1%
Total		13	23	36
		100,0%	100,0%	100,0%

Relação da idade com a presença ou a ausência de metástases axilares.

Tabela 2.

Faixa Etária	Nº Paciente	%
Até 40 Anos	11	17,2
41 a 50 anos	14	21,9
51 a 60 anos	22	34,4
Mais de 60 anos	12	18,8
S/Resposta	5	7,8
Total	64	100

Gráfico 1

Números de pacientes analisados por idade.

Faixas de Tamanho	Nº Paciente	%
T1	14	21,9
T2	22	34,4
T3	4	6,3
T4	1	1,6
S/Resposta	23	35,9
Total	64	100

Gráfico 2

Estadiamento do tamanho tumoral.

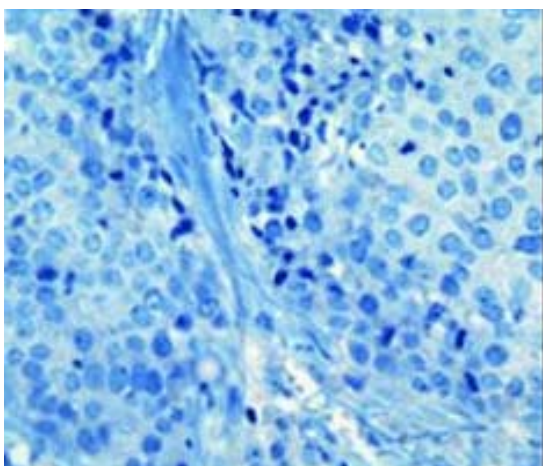
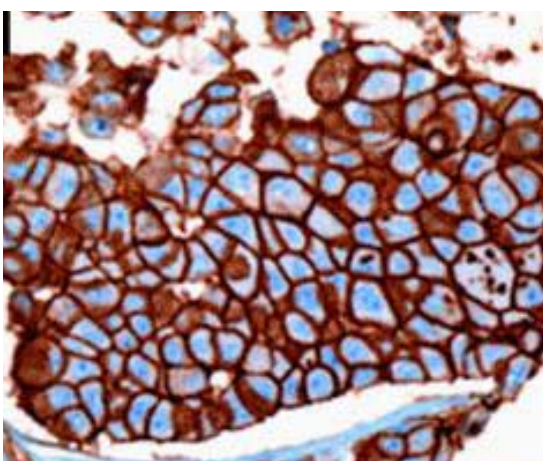
FIGURA 1**HER-2 negativo****HER-2 positivo**

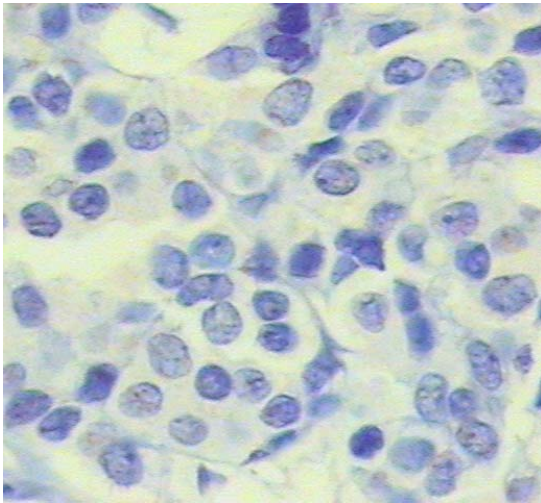
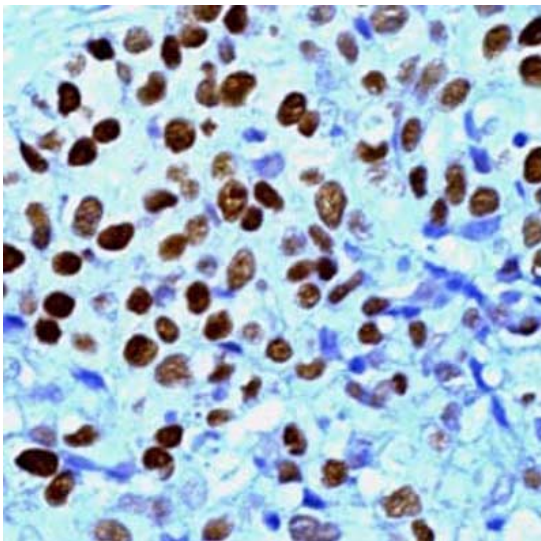
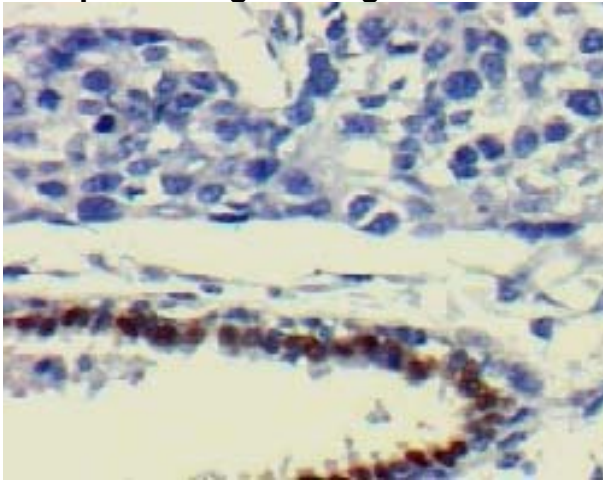
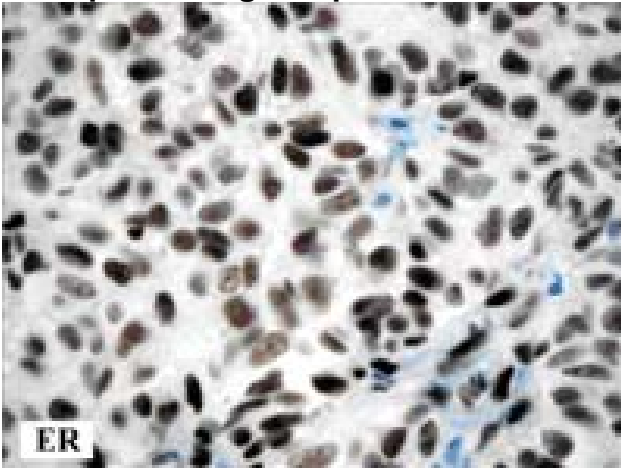
FIGURA 2**Receptor progesterona positivo****Receptor progesterona positivo**

FIGURA 3**Receptor estrogênio negativo****Receptor estrogênio positivo**

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)