

RELATÓRIO FINAL  
PROGRAMA INSTITUCIONAL DE BOLSAS DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA

**AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS SUBTIPOS DE CARCINOMAS  
MAMÁRIOS DO HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
GOIÁS NO PERÍODO DE 2003 A 2007**

Faculdade de Medicina – Universidade Federal de Goiás – CEP: 74605-020 - Brasil

Leonardo Ribeiro Soares; Marise Amaral Rebouças Moreira

ribeiroufg@hotmail.com; marisemoreira7@gmail.com

**Palavras-chave:** Câncer de mama, Subtipos Moleculares, Microarranjo de tecidos, Imunoistoquímica.

## **INTRODUÇÃO**

---

O câncer de mama representa hoje o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, sendo o mais comum entre as mulheres. É uma das principais causas de morte em mulheres nos países ocidentais (BRASIL,2010; FREITAS-JÚNIOR,2008). No Brasil, já é a principal causa de morte por mulheres com câncer, principalmente na faixa etária entre os 40 e 69 anos, com o número de casos novos esperados, em 2011, de 49.240 casos e com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (BRASIL,2010; FREITAS-JÚNIOR,2008). De acordo com a faixa etária têm-se diferentes taxas de incidência de câncer de mama, ocorrendo um aumento contínuo com a progressão da idade, aumento este que, em muitos países, é freqüentemente seguido de uma redução após a menopausa (BRAY,2004; SMIGAL,2006).

A vasta maioria dos tumores malignos de mama é iniciada no epitélio da junção ducto-lobular, e 5 a 10% são originários de linhagem não epitelial (sarcomas). Os avanços em biologia molecular possibilitaram a descoberta de proteínas especializadas tais como receptores hormonais e fatores de crescimento epiteliais,

os quais permitiram maior entendimento da oncogênese e maior individualização das terapias correntes (SORLIE,2004; BRAY,2004; SMIGAL,2006).

Atualmente, além das classificações histopatológicas usuais, novas subclassificações têm surgido baseadas em estudos moleculares, os quais têm permitido compreender evoluções não explicadas com as classificações usuais (SORLIE,2004); entretanto, a associação dos marcadores moleculares e a classificação biológica dos tumores ainda não têm uma relação bem definida, necessitando de maior número de estudos que possam esclarecer a evolução clínica dos tumores de mama. No Brasil, poucos são os dados de prevalência dos subtipos biológicos dos tumores de mama, sendo mandatório que novos estudos sejam realizados para informar o que ocorre no nosso meio.

## **OBJETIVOS**

---

---

Verificar a ocorrência dos subtipos tumorais de mama: Luminal A, Luminal B, Superexpressão de HER2 e Basalóides, segundo dois diferentes critérios de subclassificação por imunofenotipagem.

## **MATERIAIS E MÉTODOS**

---

---

Trata-se de estudo retrospectivo, observacional e descritivo, que analisa todos os casos de carcinomas ductais invasores de mama que deram entrada no Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás, no período de 2003 a 2007.

Foram levantados lâminas e blocos de todos os casos incluídos no estudo. Os critérios de inclusão no estudo foram: diagnóstico original de lesão ductal invasora de mama e disponibilidade de blocos para a reavaliação histológica observando-se a representatividade da amostra para o estudo imunoistoquímico em lâminas obtidas de microarranjo de tecidos, ou *tissue microarray* (TMA). Foram excluídos os casos cuja amostra do tumor fosse insuficiente para o processamento do TMA. Durante a análise foram também excluídos os casos que não permitiram o estudo imunohistoquímico de todos os marcadores pela falta de células tumorais, aqueles que descolaram da lâmina e os casos de HER2 duvidoso, por não termos como efetuar o exame confirmatório de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH).

Utilizando-se do equipamento manual *Beecher Instruments*<sup>®</sup>, modelo *MTA-I* (Silver Spring, MD, USA), foi construído um bloco de TMA. Para a análise imunoistoquímica foi empregado o kit de revelação à base de polímeros (MACH1 HPR-Polímero Kit<sup>®</sup> - Biocare Medical, EUA), utilizando-se para imunodeteção anticorpos primários anti: receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), oncoproteína HER2, antígeno Ki-67, citoqueratinas (CKs) 5 e 14, fator de crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR).

As secções submetidas à imunoistoquímica foram examinadas em microscópio óptico e avaliadas para a subclassificação segundo os perfis de imunomarcção descritos na tabela 1. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal do Hospital das Clínicas da UFG (protocolo nº 175/09).

**Tabela 1** – Perfis imunofenotípicos para a subclassificação molecular por imunoistoquímica dos tumores de mama.

<b>Subclassificação Clássica</b>	
<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Padrão de Imunomarcção</b>
<b>Luminal A</b>	RE+ e/ou RP+, HER2-
<b>Luminal B</b>	RE+ e/ou RP+, HER2+
<b>HER2 Superexpresso</b>	RE-, RP- e HER2+
<b>Basalóide</b>	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
<b>Triplo-negativos</b>	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-
<b>Nova Subclassificação*</b>	
<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Padrão de Imunomarcção</b>
<b>Luminal A</b>	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 <14%
<b>Luminal B</b>	RE+ e/ou RP+, HER2- e Ki-67 ≥14%
<b>HER2 Superexpresso</b>	RE-, RP- e HER2+ (Luminal HER2)
<b>Basalóide</b>	RE-, RP-, HER2-, CK5+ e/ou EGFR+
<b>Triplo-negativos</b>	RE-, RP-, HER2-, CK5- e EGFR-

\* Baseada na utilização do Ki-67 cut-off de 14%

Referências: .

## RESULTADOS

O número inicial de casos foi de 278 lesões mamárias. Para a análise dos sete imunomarcadores pelo método convencional seriam necessárias 1946 lâminas,

que com o TMA, em duplicata, foram reduzidas para 14. Isso levou a um consumo de reagentes cerca de 139 vezes menor e consequente economia de custos. O tempo de leitura foi também acentuadamente reduzido. Após o processo de reavaliação histológica, permaneceram no estudo 234 casos de câncer de mama, que foram distribuídas conforme dois critérios de subclassificação por imunofenotipagem.

O percentual dos subtipos moleculares encontrados na população estudada está apresentado na tabela 2.

**Tabela 2** – Distribuição das pacientes segundo dois diferentes critérios de subclassificação por imunofenotipagem avaliados em tumores de tecido mamário.

Subtipo	Subclassificação Clássica	Nova Subclassificação*
	Mama (N=234) n (%)	Mama (N=234) n (%)
Luminal A	136 (58,1%)	51 (21,8%)
Luminal B	19 (8,1%)	104 (44,4%)
HER2 Superexpresso	27 (11,5%)	27 (11,5%)
Basalóides	27 (11,5%)	27 (11,5%)
Triplo-negativo	25 (10,7%)	25 (10,7%)
Total	234 (100,0%)	234 (100%)

- Baseado na utilização de Ki-67 cut-off de 14%

## DISCUSSÃO

A partir do seqüenciamento do genoma humano, formalmente iniciado em 1990, diferentes perspectivas foram introduzidas no campo da investigação molecular e da análise de padrões de expressão gênica (VENTER,2001). No ano 2000, Charles Perou et al., através da utilização da técnica de microarranjos de DNA complementar, “cDNA microarrays”, analisando mais de 8.000 genes, caracterizaram diferentes perfis de expressão gênica para tumores mamários (PEROU,2000). Dois grupos moleculares maiores foram separados quanto a sua origem epitelial, sendo eles: os basalóides e os luminais. E ainda, cinco subgrupos moleculares foram identificados: luminal A, luminal B, superexpressão de HER2, basalóide e mama-normal (PEROU,2000; SORLIE,2001; SORLIE,2004).

A partir da identificação dos subgrupos moleculares, identificou-se a importância dos fatores de proliferação e crescimento celular na evolução dos tumores. A partir de então, novo enfoque foi dado à utilização de marcadores do índice mitótico e da superexpressão/amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 2 (HER2) (REIS-FILHO,2006). Desde o advento de anticorpos aplicáveis a tecidos fixados em formol e embebidos em parafina, muitos marcadores moleculares prognósticos e preditivos foram idealizados. Contudo, apenas os receptores hormonais de estrogênio e de progesterona e o HER2 foram consolidados como marcadores clínicos de valor prognóstico para uso rotineiro no tratamento do câncer da mama (CHEANG,2009; RAKHA,2010; VODUK,2010).

O conhecimento desses novos dados permitiu o desenvolvimento de terapias alvo-específicas para os marcadores moleculares RE e HER2, e novas terapias deverão surgir com o aprimoramento dos estudos.

O subtipo molecular Luminal A, que perfaz cerca de 60% dos casos dos carcinomas de mama, apresenta com relação aos demais, o melhor prognóstico. Na sua maioria são RE positivos e histologicamente de baixo grau. (SORLIE,2001; SORLIE,2003).

Os tumores de subtipo Luminal B têm maior proliferação e conseqüentemente pior prognóstico do que tumores Luminais A. Eles expressam RE, podendo expressar RP, e são muitas vezes de alto grau histológico. A expressão do receptor de estrogênio, do receptor de progesterona, de HER2 e mais recentemente do índice Ki-67 distinguem os subtipos Luminal A de Luminal B (CHEANG,2009).

O subtipo Superexpressão de HER2 possui elevada expressão de HER2, porém apresenta negatividade para os receptores hormonais. Sua amplificação é encontrada em aproximadamente 12% dos tumores invasores de mama e está associada à doença de pior prognóstico (BULL,2004; WOLFF,2007). Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais (SORLIE,2001). Estudos apontam que pacientes com diagnóstico primário de carcinoma de mama e com Superexpressão de HER2, que não recebem qualquer terapia adjuvante sistêmica, possuem uma sobrevida reduzida e um aumento da taxa de recorrência em relação aos pacientes que não apresentam a amplificação gênica de HER2 (WOLFF,2007; VODUK,2010); entretanto, a utilização de terapias alvo-específicas (Trastuzumab), melhora acentuadamente o prognóstico dessas pacientes (RAKHA,2010).

A lesão de subtipo Basalóide demonstra padrão prognóstico mais reservado, associado à menor sobrevida livre da doença e à menor sobrevida global (HAFFTY,2010). Morfologicamente, é caracterizado por alto grau histológico, por elevado índice mitótico, pela presença de áreas de necrose central e pelo destacado infiltrado linfocitário (VODUC,2010). Apresenta-se como triplo negativo, porém com positividade para queratinas basais.

Utilizando-se a subclassificação por imunofenotipagem clássica, encontramos em nosso estudo maior prevalência do subtipo Luminal A (58,1%), seguido pelos subtipos Superexpressão de HER2 e Basalóide (11,5%). Quando utilizada a nova subclassificação, encontramos variação deste perfil biológico, com predomínio do subtipo Luminal B (44,4%), seguido por Luminal A (21,8%) e pelos subtipos Superexpressão de HER2 e Basalóide (11,5%), que não apresentaram variação percentual quando comparada à subclassificação clássica.

Estudo realizado por Voduc e cols. encontrou, em uma amostra com 2.985 pacientes, 44% de Luminal A, 24% de Luminal B, 10% de Basalóides, 9% de Triplo-negativos, 8% de HER-2 Superexpresso e 6% de Luminal HER2 (VODUC,2010). Salles e cols., em estudo realizado com 979 casos de câncer de mama, encontraram prevalência de 60,2% de Luminal A, 21,8% do subtipo Triplo Negativo, 9% de Luminal B e 9% de HER-2 Superexpresso. Estes dados reforçam a variação existente entre diferentes populações analisadas e as diferenças de prevalência surgidas em decorrência da utilização de diferentes parâmetros classificatórios. (SALLES,2009).

Não foi possível estimar um perfil regional de prevalência de subtipos biológicos dos carcinomas ductais de mama, visto que a distribuição encontrada neste estudo é referente apenas aos casos que deram entrada no HC/UFG, no período entre 2003 e 2007, não permitindo, portanto, que suas características sejam extrapoladas à população regional.

## **CONCLUSÕES**

---

Quando utilizada a subclassificação por imunofenotipagem clássica, houve predomínio do subtipo Luminal A. Quando utilizada a nova subclassificação, houve predomínio do subtipo Luminal B, evidenciando alteração na distribuição percentual

dos subtipos de câncer de mama de acordo com a classificação utilizada. Isso poderá explicar padrões de evolução anteriormente não bem esclarecidos.

Em países com recursos limitados, como o Brasil, torna-se necessária a utilização de técnicas menos complexas e financeiramente mais viáveis que possam identificar os subtipos moleculares de estudo gênico. Para tal finalidade, a anatomia patológica, associada ao teste de imunohistoquímica, tem se tornado um substituto acessível e eficiente.

Tumores mamários com histologia e clínica semelhantes podem apresentar diferentes prognósticos e diferentes respostas terapêuticas. Desta forma, o tratamento individualizado é cada vez mais aplicado, tendo por base os novos conhecimentos moleculares que permitem a seleção de doentes e de terapias efetivas com menores efeitos adversos. Todavia, mais estudos e ensaios clínicos são necessários para determinar os seus reais benefícios.

## REFERÊNCIAS

---

---

1. BHARGAVA, R.; BERIWAL, S.; DABBS, D. J.; OZBEK, U.; SORAN, A.; JOHNSON, R. R. et al. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy. **Cancer**. 2010. vol. 116, n. 6, p. 1431-1439.
2. BRASIL. Instituto Nacional de Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde; 2010 [on line]. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>>. Acesso em: 27/05/2011.
3. BRAY, F.; MCCARRON, P.; PARKIN, DM. The changing global patterns of female breast cancer incidence and mortality. **Breast Cancer Res**. 2004. vol. 6, n. 6, p. 229-39.

4. BULL, S. B.; OZCELIK, H.; PINNADUWAGE, D.; BLACKSTEIN, M. E.; SUTHERLAND, D. A.; PRITCHARD, K. I. et al. The combination of p53 mutation and neu/erbB-2 amplifications is associated with poor survival in node-negative breast cancer. **J Clin Oncol**. 2004. vol. 22, n. 1, p. 86-96.
5. CHEANG, M. C. U.; CHIA, S. K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J. et al. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **Journal of the National Cancer Institute**. 2009. vol. 101, n.10, p. 736-750.
6. CHEANG, M. C. U.; TREABA, D. O.; SPEERS, C. H.; OLIVOTTO, I. A.; BAJDIK, C. D.; CHIA, S. K. et al. Immunohistochemical Detection Using the New Rabbit Monoclonal Antibody SP1 of Estrogen Receptor in Breast Cancer Is Superior to Mouse Monoclonal Antibody 1D5 in Predicting Survival. **Journal of Clinical Oncology**. 2006. vol. 24, n.36, p. 5637-5644.
7. CHEANG, M. C. U.; CHIA, S. K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J. Ki67 Index, HER2 Status, and Prognosis of Patients With Luminal B Breast Cancer. **J Natl Cancer Inst**. 2009. vol. 101, p. 736–50.
8. CIANFROCCA, M.; GRADISHAR, W. New Molecular Classifications of Breast Cancer. **CA Cancer J Clin**. 2009. vol. 59, n.5, p. 303-313.
9. FREITAS-JUNIOR, R.; FREITAS, N. M.; CURADO, M. P.; MARTINS, E.; MOREIRA, M. A. R.; SILVA, C. M. B. Variations in breast cancer incidence per decade of life (Goiânia, GO, Brazil): 16-year analysis. **Cancer Causes Control**. 2008. vol.19, n.7, p. 681-7.
10. GEYER, F. C.; MARCHIÒ, C.; REIS-FILHO, J. S. The role of molecular analysis in breast cancer. **Pathology**. 2009. vol. 41, n.1, p. 77-88.

11. HAFETY, B. G.; BUCHHOLZ, T. A. Molecular predictors of locoregional recurrence in breast cancer: ready for prime time? **J Clin Oncol.** 2010. vol. 28, n. 10, p. 1627-1629.
12. HAMMOND, M. E. H.; HAYES, D. F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D. C.; HAGERTY, K. L.; BADVE, S. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Journal of Clinical Oncology.** 2010. vol. 28, n.16, p. 2784-2795.
13. PAREDES, J.; LOPES, N.; MILANEZI, F.; SCHMITT, F. P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ. **Virchows Archiv.** 2007. vol. 450, n.1, p. 73-80.
14. PEROU, C. M.; SORLIE, T.; EISEN, M. B.; VAN DE RIJN, M.; JEFFREY, S. S.; REES, C. A. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature.** 2000. vol. 406, p. 747-752.
15. RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2010. vol. 120, p. 293–308.
16. REIS-FILHO, J. S.; WESTBURY, C.; PIERGA, J. Y.; The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. **J Clin Pathol.** 2006. vol. 59, n. 3, p. 225-31.
17. ROUZIER, R.; PEROU, C. M.; SYMMANS, W. F.; IBRAHIM, N.; CRISTOFANILLI, M.; ANDERSON, K. et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. **Clin Cancer Res.** 2005. vol. 11, n.16, p. 5678-85.

18. SALLES, M. A.; CURCIO, V. S.; PEREZ, A. A. et al. Contribuição da imuno-histoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. **J Bras Patol Med Lab** 2009. vol. 45, n.3, p. 213-22.
19. SMIGAL, C.; JEMAL, A.; WARD, E.; COKKINIDES, V.; SMITH, R.; HOWE, H. L. et al. Trends in breast cancer by race and ethnicity: update 2006. **CA Cancer J Clin**. 2006. vol. 56, n. 3, p. 168-83.
20. SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**. 2004. vol. 40, p. 2667-2675.
21. SORLIE, T, TIBSHIRANI, R, PARKER, J, HASTIE, T, MARRON, JS, NOBEL, A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2003. vol. 100, n. 14, p. 8418-23.
22. SORLIE, T.; PEROU, C. M.; TIBSHIRANI, R.; AAS, T.; GEISLER, S.; JOHNSEN, H. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**. 2001. vol. 98, n. 19, p. 10869-10874.
23. VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; MYERS, E. W.; LI, P. W.; MURAL, R. J.; SUTTON, G. G. et al. The Sequence of the Human Genome. **Science**. 2001. vol. 291, n. 5507, p. 1304-1351.
24. VODUC, K. D; CHEANG, M. C. U.; TYLDESLEY, S.; GELMON, K.; NIELSEN, T. O.; KENNECKE, H. et al. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J Clin Oncol**. 2010. vol. 28, p. 1684-1691.
25. WEIGELT, B.; REIS-FILHO, J. S. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? **Nat Rev Clin Oncol**. 2009. vol. 6, p. 718-730.

26. WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E.; SCHWARTZ, J. N.; HAGERTY, K. L.; ALLRED, D. C.; COTE, R. J. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol.** 2007. vol. 25, n. 1, p.118-45.
27. ZHANG, D. H.; SALTO-TELLEZ, M.; CHIU, L.-L.; SHEN, L.; KOAY, E. S.-C. Tissue microarray study for classification of breast tumors. **Life Sciences.** 2003. vol. 73, n. 25, p. 3189-3199.