UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

LIANE RAPATONI

**Expressão de CK5 e Vimentina/E-Caderina nos diferentes
subtipos de carcinomas ductais mamários**

Ribeirão Preto

2013

LIANE RAPATONI

**Expressão de CK5 e Vimentina/E-Caderina nos diferentes
subtipos de carcinomas ductais mamários**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para
obtenção do Título de Mestre em
Ciências Médicas.

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof. Dr. Daniel Guimarães
Tiezzi

Ribeirão Preto

2013

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Catálogo na publicação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo

Rapatoní, Liane

Expressão de CK5 e Vimentina/E-caderina nos diferentes subtipos de carcinomas ductais mamários / Liane Rapatoní; orientador Daniel Guimarães Tiezzi. -- Ribeirão Preto, 2013

50 f.

Dissertação (Mestrado – Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas. Área de Concentração: Tocoginecologia) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

1. Neoplasias da mama - tratamento.
2. Imunoistoquímica - prognóstico

FOLHA DE APROVAÇÃO

Liane Rapatoni

Expressão de CK5 e Vimentina/E-caderina nos diferentes subtipos de carcinomas ductais mamários

Dissertação apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Daniel Guimarães Tiezzi, que me acolheu como aluna e me conduziu nestes anos de estudo e pesquisa.

À profa. Dra. Fernanda Maris Peria, que me acolheu como profissional e como amiga.

À Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto USP e ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP pela oportunidade da realização de minha pós-graduação.

À Faculdade de Ciências Médicas da Unicamp, pela médica que sou hoje.

À minha família e companheiro Danilo, pela paciência, companheirismo e compreensão.

RESUMO

RAPATONI, L. **Expressão de CK5 e vimentina/E-caderina nos diferentes subtipos de carcinomas ductais mamários.** 2013 50f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

Introdução: Os marcadores moleculares têm sido utilizados para identificar subgrupos de tumores com comportamento clínico distinto, inclusive quanto ao padrão de recidiva. **Objetivo:** Caracterizar a expressão imunoistoquímica de vimentina (VIM) e E-caderina (CDH1) em carcinomas ductais invasivos (CDI) de mama e sua associação com a expressão de citoqueratina 5 (CK5), e características clínico-patológicas. **Métodos:** Microarranjos teciduais (TMA) foram construídos a partir de 82 amostras de CDI de mama. Imunoistoquímica (IHQ) foi realizada para determinar os receptores hormonais (RH; receptores de estrogênio e progesterona) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2), VIM, CDH1, CK5 e Ki-67. Os tumores foram classificados como luminal A (RH+, HER2-), luminal B (RH+, HER2+ ou Ki-67 alto), HER2 hiperexpresso (RH-, HER2+) e triplo negativo (TN; RH-, HER2-). **Resultados:** O fenótipo VIM⁺/CDH1^{-low} não foi observado nos tumores luminal A, B e HER2 hiperexpresso, enquanto que este fenótipo estava presente em 61,9% dos TN (p= 0,0001). A mediana de Ki-67 em tumores VIM⁺/CDH1^{-low} foi 13,6 (variação, 17,8-45,4), em comparação com 9,8 (variação de 4,1-38,1) nos não- VIM⁺/CDH1^{-low} (p= 0,0007). O acometimento linfonodal foi menos frequente em pacientes com VIM⁺/CDH1^{-low} do que nos não- VIM⁺/CDH1^{-low} (23% X 61%, teste de χ^2 , p = 0,01). A sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 61,5% e 83,7% (teste de log-rank, p= 0,02) e a sobrevida global em 5 anos foi de 51,2% e 83,5% (teste de log-rank, p= 0,03) em pacientes com tumores com fenótipo VIM⁺/CDH1^{-low} e não VIM⁺/CDH1^{-low}, respectivamente. **Conclusão:** A expressão de VIM e CDH1 identificaram um subconjunto de CDI de mama com fenótipo mesenquimal com alto grau histológico e alto índice mitótico.

Palavras-chave: câncer de mama; transição epitelial-mesenquimal; vimentina; E-caderina; citokeratina 5; fatores prognósticos.

ABSTRACT

RAPATONI, L. **Expression of CK5 and vimentin/E-cadherin in different subtypes of invasive ductal carcinoma.** 2013 50f. Dissertation (Master degree) – School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2013

Introduction: Molecular markers have been used to identify subgroups of tumors with distinct clinical behavior, including recurrence pattern. **Objective:** To characterize the immunohistochemical expression of vimentin (VIM) and E-cadherin (CDH1) in invasive ductal carcinoma (IDC) of the breast and its association with cytokeratin 5 (CK5) expression and clinicopathological features. **Methods:** A tissue microarray was constructed from 82 IDC breast cancer specimens. Immunohistochemistry (IHC) was used to determine hormone receptor (HR; estrogen and progesterone receptors) status and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), VIM, CDH1, CK5, and Ki-67 expression. Tumors were classified as luminal A (HR+, HER2-), luminal B (HR+, HER2+ or high Ki-67), HER2 enriched (HR-, HER2+), and triple negative (TNBC; HR-, HER2-). **Results:** The VIM⁺/CDH1^{-/low} phenotype was not observed in luminal A, luminal B and HER2 enriched tumors, whereas this phenotype was present in 61.9% of triple negative (TNBC) tumors (p = 0.0001). The median Ki-67 index in VIM⁺/CDH1^{-/low} tumors was 13.6 (range, 17.8-45.4) compared with 9.8 (range, 4.1-38.1) in non-VIM⁺/CDH1^{-/low} tumors (p= 0.0007). The presence of lymph node metastasis was less frequent in patients with VIM⁺/CDH1^{-/low} tumors than in those with non-VIM⁺/CDH1^{-/low} tumors (23% vs. 61%; χ^2 test, p= 0.01). The 5-years disease-free survival was 61.5% and 83.7% (log-rank test; p= 0.02) and the 5-year overall survival was 51.2% and 83.5% (log-rank test; p= 0.03) in patients with VIM⁺/CDH1^{-/low} phenotype and non-VIM⁺/CDH1^{-/low} phenotype tumors, respectively. **Conclusion:** The expression of VIM and CDH1 identified a subset of IDC breast cancer of the mesenchymal phenotype with high histological grade and high mitotic index.

Keywords: breast cancer; epithelial-mesenchymal transition; vimentin; E-cadherin; cytokeratin5; prognostic factors.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	9
1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA	9
1.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA	10
1.3 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA	12
1.4 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO (TN)	14
1.5 E-CADERINA (CDH1) E CÂNCER DE MAMA	16
1.6 VIMENTINA (VIM) E CÂNCER DE MAMA	17
2 OBJETIVOS	18
3 MATERIAIS E MÉTODOS	19
3.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	19
3.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO	19
3.2.1 VARIÁVEIS RELACIONADAS ÀS PACIENTES (Tabela 2)	19
3.2.2 VARIÁVEIS RELACIONADAS AO TUMOR (Tabela 2)	20
3.3 MICROARRANJOS TECIDUAIS (TMA, “ <i>tissue microarray</i> ”)	21
3.4 IMUNOISTOQUÍMICA PARA RE, RP, Ki-67, HER-2, VIM, CDH1 E CK5	21
3.5 ANÁLISE DIGITAL DE KI-67	22
3.6 EXPRESSÃO DE RE, RP, HER2, VIM, CDH1 E CK5	23
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	24
3.8 ASPECTOS ÉTICOS	24
4 RESULTADOS	25
4.1 AVALIAÇÃO DE KI-67	25
4.2 EXPRESSÃO DE VIM E CDH1 NOS CARCINOMAS DUCTAIS INVASIVOS (CDI)	26
4.3 EXPRESSÃO DE CK5 NOS CDI (Tabela 4)	26
4.4 FENÓTIPO VIM ⁺ /CDH1 ^{-low} (Tabela 5) (Figura 2 e 3)	28
4.5 FENÓTIPO VIM ⁺ /CDH1 ^{-low} E EXPRESSÃO DE CK5 NOS CDI	32
4.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS TUMORES TN (Tabela 6)	32
4.7 ANÁLISE DE SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE PROGRESSÃO (SLP), SOBREVIVÊNCIA GLOBAL (SG), E RECORRÊNCIA	34

5 DISCUSSÃO	37
6 CONCLUSÃO.....	40
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	41

1 INTRODUÇÃO

1.1 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres, e a principal causa de óbito por câncer entre elas em todo o mundo. Para o ano de 2008, estimou-se uma incidência de 1.38 milhões de casos novos (23% de todas as neoplasias) e 458.000 óbitos por esta neoplasia (Ferlay et al., 2010). A sobrevida em 5 anos é muito variável entre os países, variando de 30% nos países Sub-Saara, 45% em partes do sudeste da Ásia, e superior a 80% na América do Norte (Coleman et al., 2008) (Parkin, 2006).

A incidência do câncer de mama feminino é maior em países economicamente mais desenvolvidos (por exemplo, América do Norte, nordeste e leste europeu). Já em países da África, Ásia e América Central a incidência é baixa. Fatores que contribuem para essa disparidade entre as regiões do mundo incluem diferenças em fatores reprodutivos (idade do menarca e menopausa, idade do primeiro parto, número de gestações, duração da amamentação), uso de terapia de reposição hormonal, obesidade após a menopausa, consumo de álcool e estratégias de rastreamento. Mutações genéticas de alta penetrância, como as que ocorrem no genes BRCA1 e BRCA2, mais comuns em descendentes de judeus Ashkenazi, aumentam o risco de câncer de mama nos indivíduos afetados, mas tem pouco impacto nas diferenças geográficas e tendências temporais (Ford, Easton, Bishop, Narod, & Goldgar, 1994) (Struwing et al., 1997).

Apesar dos dados históricos serem limitados, considera-se que houve aumento na incidência de câncer de mama no século 20 nos países mais desenvolvidos, primeiramente devido às alterações na vida reprodutiva da mulher (gestações mais tardias) e mais recentemente pelo aumento do rastreamento (Colditz G, Baer H, 2006).

Na última década, a mortalidade por câncer de mama diminuiu nos Estados Unidos e em alguns países da Europa (Reino Unido, Dinamarca e Holanda). Nos Estados Unidos, esta redução é atribuída à combinação entre aumento do rastreamento e melhora no tratamento (Berry et al., 2005). Já na Europa, atribui-se esta redução a mudanças no tratamento, uma vez que o rastreamento é menos utilizado nestes países.

Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), estima-se que em 2012 ocorra cerca de 52.680 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional de Câncer, 2011).

No Brasil, excetuando-se os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é a neoplasia mais frequente entre as mulheres, com exceção da região norte do país, onde é o segundo tumor mais incidente. A idade é o principal fator de risco, sendo que as taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos de idade, e após essa idade o aumento ocorre de forma mais lenta (Instituto Nacional de Câncer, 2011).

O câncer de mama também é a principal causa de mortalidade por câncer entre as mulheres no Brasil. No ano de 2010, a mortalidade por câncer de mama foi de 11,51/100.000 mulheres, ajustado por idade, pela população mundial. Em 1979, essa taxa era de 8,61/100.000 mulheres. O câncer de pulmão é a 2ª causa de mortalidade por câncer entre as mulheres, e em 2010 essa taxa era de 7,41/100.000 mulheres, e em 1979 era de 3,63/100.000 (“Atlas de Mortalidade por Câncer,” n.d.).

1.2 CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é um grupo heterogêneo de doenças, composto por um número distinto de entidades com achados patológicos e comportamentos biológicos específicos (Simpson, Reis-Filho, Gale, & Lakhani, 2005). Nas últimas décadas, houve grandes avanços em relação ao seu manejo, desde o diagnóstico, com o uso de exames de rastreamento para detecção de doença inicial, e melhorias no tratamento (técnicas cirúrgicas e radioterápicas, desenvolvimento de quimioterápicos e drogas alvo molecular). Mas apesar destes avanços, esses tratamentos envolvem toxicidade e efeitos colaterais indesejáveis, muitas vezes graves. O custo do tratamento do câncer de mama também é elevado, tanto no cenário individual quanto de saúde pública. Assim torna-se necessário uma melhor definição do comportamento tumoral para a redução dos efeitos colaterais e toxicidade indesejáveis, e também do custo do tratamento.

Parâmetros clínicos e anátomo-patológicos, como idade da paciente, tamanho do tumor, acometimento linfonodal, grau tumoral, margem cirúrgica, expressão de receptores de estrogênio (RE), de progesterona (RP) e HER2 (Human Epidermal Growth Factor Receptor 2) são utilizados na prática clínica para estimar a chance de recorrência e orientar o tratamento,

dentre as diversas opções disponíveis (Haybittle et al., 1982). Mas mesmo utilizando esses parâmetros, algumas pacientes são super-tratadas, enquanto outras são sub-tratadas. Por exemplo, 15% dos casos de baixo risco segundo esses critérios convencionais (tamanho do tumor < 1 cm, linfonodo negativo, baixo grau histológico e paciente pós menopausada) irão apresentar recidiva (Bergh & Holmquist, 2001).

Para melhorar a caracterização, e possivelmente o tratamento deste grupo heterogêneo, Perou et al (2000) realizaram o primeiro estudo de expressão gênica em câncer de mama, utilizando *cDNA microarray*, em uma pequena amostra de câncer de mama e mama normal. A partir da análise de 39 tumores (36 carcinomas ductais invasivos, 2 carcinomas lobulares invasivos, 1 carcinoma ductal in situ), 1 fibroadenoma e 3 amostras de tecido mamário normais, um subgrupo de 1753 genes foram selecionados de 8102 analisados, baseado na diferença de expressão nos tecidos tumorais e na mama normal. Um programa de computador foi utilizado para agrupar as amostras que apresentavam padrão semelhante de expressão gênica. Baseado nesses dados, os autores propuseram uma nova classificação molecular para o câncer de mama: tipo basal (RE negativo), luminal (RE positivo), HER2 hiperexpresso e “*normal breast like*” (Perou et al., 2000). Outros estudos do mesmo laboratório, com um número maior de amostras, adicionou mais um grupo, dividindo o grupo luminal em A e B. Esses 5 subtipos moleculares não apresentam apenas diferentes padrões de expressão gênica, mas também desfechos clínicos diferentes (Sørli et al., 2001) (Sorlie et al., 2003).

Parker et al. (2009) avaliaram um painel com 50 genes (PAM50), para classificação dos subtipos intrínsecos de câncer de mama, relacionando-os com fatores prognósticos clínicos já bem estabelecidos. O diagnóstico do subtipo intrínseco baseado neste painel acrescentou informações prognósticas e preditivas significativas aos parâmetros clínicos e anátomo-patológicos utilizados rotineiramente (Parker et al., 2009).

Há alguns testes disponíveis para avaliar a expressão gênica e determinar o risco de recidiva dos tumores de mama em estádios iniciais e orientar o tratamento destes pacientes. Os testes comercialmente disponíveis são: escore de recorrência baseado em 21 genes (Paik et al., 2004) (Oncotype Dx®, Genomic Health Inc, Redwood City, CA, www.oncotypedex.com); assinatura de metástase à distância baseado em 14 genes (Tutt et al., 2008) (BreastOncPx™, US Labs, Irvine, CA, www.uslabs.net); preditor de grau histológico baseado em 97 genes (Sotiriou & Desmedt, 2006) (MapQuant Dx™ Genomic Grade, Ipsogen, Marseilles, France and New Haven, CT, USA, www.ipsen.com) e assinatura prognóstica baseada em 70 genes (van de Vijver et al., 2002) (MammaPrint®, Agendia, Irvine, CA, www.agendia.com).

1.3 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICO-PATOLÓGICA

Apesar do padrão ouro para a classificação molecular ser a análise da expressão gênica, seu uso na prática clínica é limitado, pois algumas destas técnicas só podem ser utilizadas em tecido fresco ou congelado, apresentam alto custo e dificuldades técnicas em sua execução (Tang, Skinner, & Hicks, 2009).

Com o intuito de desenvolver uma classificação que tenha utilidade clínica e seja tecnicamente simples e reprodutível, investigadores tem estudado classificações baseadas na análise imunoistoquímica (IHQ).

A classificação baseada nas citoqueratinas (CK), divide os tumores de mama nos subtipos basal (CK 5/6, CK 14 e CK 17 positivas) e luminal (CK 8 e CK 18 positivas, e CK basais negativas) (Korsching et al., 2002).

A classificação em triplo negativo (TN) define este subtipo pela ausência de expressão de RE, PR e HER2. Representa de 11,2% a 16,3% dos carcinomas ductais invasivos (Bauer, Brown, Cress, Parise, & Caggiano, 2007)(Dent et al., 2007).

Nielsen et al (2004) propuseram uma classificação que combina CK/TN (Nielsen et al., 2004). Utilizando 4 anticorpos, demonstraram que o subtipo basal pode ser definido como RE e HER2 negativos, e CK5/6 e/ou EGFR (epidermal growth factor receptor) positivo, com uma sensibilidade de 76% e especificidade de 100%, comparado com a definição por análise gênica.

Em revisão feita por Tang et al (2009), propôs-se a seguinte classificação, baseada na IHQ: subtipo luminal A (RE+ e HER2 negativo); luminal B (RE+ e HER2+); subtipo HER2 (RE negativo e HER2+); basal (RE e HER2 negativos, CK5/6 e/ou EGFR+); e não classificável (RE, HER2, CK 5/6 e EGFR negativos) (Tang et al., 2009). O subtipo HER2 e basal apresentam pior prognóstico, seguido pelo luminal B, enquanto o luminal A apresenta o melhor prognóstico.

Na 12^a Conferência Internacional de Câncer de Mama de Saint Gallen, realizada em 2011, um painel de especialistas propôs uma classificação clínico-patológica para os carcinomas mamários, baseado nos estudos anteriormente expostos, para uso na prática clínica (tabela 1) (Goldhirsch et al., 2011).

Tabela 1 – Definição clínico-patológica de câncer de mama, baseado nos subtipos intrínsecos (moleculares). RE – receptor de estrógeno; RP – receptor de progesterona; HER2 - Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (a Goldhirsch et al., 2011)

Subtipo intrínseco	Definição Clínico-patológica
<i>Luminal A</i>	<i>Luminal A</i> RE e/ou RP positivo HER2 negativo Ki-67 baixo (<14%)
<i>Luminal B</i>	<i>Luminal B (HER2 negativo)</i> RE e/ou RP positivo HER2 negativo Ki-67 alto
	<i>Luminal B (HER2 positivo)</i> RE e/ou RP positivo HER2 hiperexpresso ou amplificado Qualquer Ki-67
<i>HER2 hiperexpresso</i>	<i>HER2 positivo (não luminal)</i> HER2 hiperexpresso ou amplificado RE e RP negativos
<i>“Basal”</i>	<i>Triplo Negativo (ductal)</i> RE e RP negativos HER2 negativo

Estudo posterior a esta publicação avaliou a relação destes subtipos intrínsecos, determinados pela utilização do PAM50, com os marcadores de IHQ utilizados na clínica diária. O escore de expressão gênica de ESR1 (receptor de estrógeno), PGR (receptor de progesterona) e ERBB2 (HER2) tem alta concordância com a avaliação destes marcadores por IHQ. Positividade de RE pela IHQ tem alta associação com o subtipo Luminal (A e B), mas somente 75% dos tumores com RE negativo são classificados nos subtipos HER2 ou basal. A maioria dos tumores triplo negativos são do subtipo basal (57%) e HER2 (30%). A conclusão final deste estudo é que o escore de expressão gênica de ESR1, PGR e ERBB2 apresentam maior valor prognóstico que os seus marcadores de IHQ (Bastien et al., 2012).

1.4 CÂNCER DE MAMA TRIPLO NEGATIVO (TN)

Os tumores TN apresentam um pior prognóstico em relação aos demais subtipos clínico-patológicos, e ainda não se dispõem de terapias específicas para o seu tratamento (Fornier & Fumoleau, 2012) (Reeder-Hayes, Carey, & Sikov, 2010). Apesar de ser considerado um subtipo específico, há uma grande heterogeneidade neste grupo de tumores (Carvalho, Bacchi, Santos, & Bacchi, 2010).

Estudos epidemiológicos evidenciam que os TN são mais prevalentes em mulheres pré-menopausadas quando comparado com mulheres menopausadas afro-americanas (Carey et al., 2006) (Boyle, 2012). Alguns estudos mostram maior incidência em mulheres obesas (Kwan et al., 2009), porém esse dado não se confirmou em outros estudos (Stead et al., 2009). Mulheres com tumores TN apresentam alta paridade (mais de 3 filhos) mas com curto período de amamentação (Kwan et al., 2009), e a nuliparidade está associada à redução de risco de desenvolvimento deste tipo de tumor (Dolle et al., 2009). O risco estimado de se ter um câncer de mama TN é maior nas mulheres afro-americanas (1,98%), comparado com as asiáticas (0,77%), hispânicas (1,04%) e brancas (1,25%) (Kurian, Fish, Shema, & Clarke, 2010).

Na avaliação anátomo-patológica, apresentam alto grau histológico, alto índice mitótico, presença de necrose central ou zonas fibróticas, infiltrado linfocítico evidente e achados típicos/atípicos de tumores medulares (Badve et al., 2011). O acometimento linfonodal e ósseo é menos frequente neste tipo de tumor, sugerindo uma disseminação hematogênica, com maior propensão a desenvolver metástases em pulmão e cérebro. O maior risco de recorrência está entre o 1º e 3º anos, e o maior número de mortes ocorre nos 5 primeiros anos. Após o diagnóstico da doença metastática, a sobrevida é mais curta se comparado com os outros subtipos (Badve et al., 2011).

A maioria dos tumores TN de acordo com a análise molecular, é do subtipo basal (Bertucci et al., 2008) (Livasy et al., 2006), e a maioria dos tumores que expressam marcadores “basais” são TN. Entretanto, nem todos os tumores basais identificados pela análise de expressão gênica apresentam ausência de expressão de RE, RP e HER2, e o inverso também é válido – nem todo tumor TN apresenta um fenótipo basal quando realizada sua análise molecular (Badve et al., 2011). Por exemplo, Bertucci et al. (2008) mostraram que 71% dos tumores TN são do subtipo basal pela análise de seu perfil gênico, e somente 77%

dos tumores basais pela análise molecular são TN. Resultados similares foram encontrados por outros autores (Parker et al., 2009) (Bastien et al., 2012).

O painel de marcadores imunoistoquímicos proposto para se definir o subtipo basal inclui: 1) ausência de expressão de RE, RP e HER2 (imunofenótipo triplo negativo); 2) expressão de uma ou mais citoqueratinas de alto peso molecular/citoqueratinas basais (CK5/6, CK14 e CK17); 3) ausência de expressão de RE e HER2 associada à expressão de CK5/6 e/ou EGFR (Nielsen et al., 2004); 4) ausência de expressão de RE, RP e HER2 associada à expressão de CK5/6 e/ou EGFR (Cheang et al., 2008) (Badve et al., 2011).

A expressão de CK5/6 e/ou EGFR tem sido utilizada como marcador para o subtipo basal (Carvalho et al., 2010)(Cheang et al., 2008) (Livasy et al., 2006)(Nielsen et al., 2004). Porém, estudos tem reportado que a expressão de CK5 é um marcador mais acurado para a determinação deste subtipo molecular (Bhargava, Beriwal, McManus, & Dabbs, 2008). (Nielsen et al., 2004) (E. a Rakha et al., 2007).

Um número considerável de tumores TN que não expressam marcadores basais são considerados “*normal breast like*”, apócrino molecular (tumores com ativação das vias de receptor de andrógeno) ou claudin-low (Badve et al., 2011). Além disso, outros tipos histológicos de carcinomas mamários podem expressar um fenótipo TN, e com desfechos clínicos variados (carcinoma apócrino, carcinoma medular típico, carcinoma lobular pleomórfico e alguns carcinomas mistos - ductais e lobulares) (Badve et al., 2011).

O subtipo claudin-low apresenta perda da adesão célula-célula, inclusive com perda da expressão de E-caderina, e exibe achados sugestivos de transição epitélio-mesênquima (TEM) e de células tronco tumorais (Herschkowitz et al., 2007) (Prat et al., 2010) (Prat & Perou, 2011). Entretanto, sua real frequência e relevância clínica ainda estão em investigação.

Nas síndromes hereditárias com predisposição ao desenvolvimento de câncer de mama e ovário, tem-se uma associação bem estabelecida entre a mutação de BRCA-1 e o risco de desenvolver um tumor de mama TN (Foulkes et al., 2003). O BRCA-1 é um gene supressor tumoral envolvido no reparo da quebra da dupla fita de DNA, e a deficiência de BRCA-1 resulta em alta instabilidade genômica e tumorigênese. Mais de 75% das neoplasias de mama dos portadores de mutação de BRCA-1 são TN, basal ou ambos (E. A. Rakha, Reis-Filho, & Ellis, 2008)(Reis-Filho & Tutt, 2008). Pacientes com câncer de mama com menos de 50 anos com tumores TN, mesmo com ausência de história familiar predisponente, são portadores de mutação de BRCA-1 em 10-30% dos casos (Young et al., 2009).

1.5 E-CADERINA (CDH1) E CÂNCER DE MAMA

As caderinas são uma família de glicoproteínas transmembrana, responsáveis pelos mecanismos de adesão célula-célula dependente de cálcio, que é crucial para a união das células nos vertebrados (Takeichi, 1991). As caderinas unem-se firmemente às células através de interações homofílicas na presença de cálcio. A inativação de outros sistemas de adesão tem pouco efeito na adesão célula-célula se as caderinas estão funcionantes (Duband et al., 1987) (Larjava et al., 1990).

As caderinas clássicas incluem: CDH1/E-caderina (epitelial), CDH2/N-caderina (neuronal), CDH3/P-caderina (placentária), CDH4/R-caderina (retinal). Esta denominação é baseada em sua distribuição tecidual (Albergaria et al., 2011).

A E-caderina (CDH1) é a mais expressa nos epitélios, e é muito importante na manutenção da forma e polaridade da célula. Sabe-se, também, que o gene CDH1 age como supressor tumoral, regulando negativamente a invasão e metastatização das células tumorais (Yilmaz & Christofori, 2010).

A ausência de expressão de CDH1, associada a achados histopatológicos específicos, é característico e diagnóstico dos carcinomas lobulares de mama (Acs, Lawton, Rebbeck, LiVolsi, & Zhang, 2001) (Moll, Mitze, Frixen, & Birchmeier, 1993). A ausência de expressão de CDH1 é observada inclusive nos carcinomas lobulares in situ (Qureshi, Linden, Divine, & Raju, 2006).

A perda seletiva da CDH1 faz parte do processo de desdiferenciação da célula tumoral e invasão nos carcinomas humanos. A redução da expressão está relacionada a maior agressividade em tumores de esôfago, ovário e estômago (Handschuh et al., 1999) (Takeichi, 1993). Alguns autores demonstraram relação entre a expressão reduzida ou ausente de CDH1 nos carcinomas mamários e fatores prognósticos negativos, como por exemplo, acometimento linfonodal, ausência de expressão de RE e RP, tamanho e grau tumoral, hiperexpressão de HER2, e mesmo redução da sobrevida livre de progressão e sobrevida global (Hunt, Douglas-Jones, Jasani, Morgan, & Pignatelli, 1997) (Oka et al., 1993) (Siitonen et al., 1996). Porém, outros estudos não conseguiram confirmar essa relação (Acs et al., 2001) (Lipponen, Saarelainen, Ji, Aaltomaa, & Syrjänen, 1994). Estudo mais recente demonstrou que em tumores TN a redução na expressão de CDH1 é um fator prognóstico independente (Kashiwagi et al., 2010).

1.6 VIMENTINA (VIM) E CÂNCER DE MAMA

Os filamentos intermediários são as principais proteínas constituintes do citoesqueleto, e são divididos em 4 grupos: tipo I – as queratinas; tipo II – as citoqueratinas (Galou et al., 1996); tipo III – as proteínas relacionadas à vimentina (Evans, 1998); tipo IV – os neurofilamentos (Galou et al., 1997). A vimentina (VIM) está presente em diversos tipos de células, como por exemplo nos fibroblastos, células endoteliais, macrófagos, neutrófilos e linfócitos (Evans, 1998).

A VIM é o marcador mesenquimal mais frequentemente associado à transição epitélio-mesênquima (TEM). A expressão aumentada e aberrante de VIM está associada ao aumento da migração e invasidade das células tumorais, e com redução dos marcadores epiteliais, como é esperado para a TEM (Gilles, Polette, Mestdagt, Birembaut, & Foidart, 2003) (Korsching et al., 2005).

A expressão de VIM está presente em cerca de 15% das neoplasias mamárias (utilizando-se o critério de marcação em $\geq 10\%$ do parênquima tumoral) (Gilles & Thompson, 1996). Korsching et al. (2005) avaliaram a expressão de VIM em câncer de mama, em 364 amostras desta neoplasia (Korsching et al., 2005). A expressão de VIM está relacionada com o grau tumoral, Ki-67 e à expressão de actina de músculo liso, além da expressão de vários genes envolvidos na carcinogênese (por exemplo TP53, EGFR, CK5 e CK10). Observou-se que esses tumores apresentavam-se em estádios clínicos mais avançados (III) e eram quimio-resistentes. Também observou-se que a expressão de VIM está presente em áreas de carcinoma in situ próximas à neoplasia invasiva, contrastando com a idéia inicial de que a VIM é expressa somente em tumores em estágios mais avançados.

Estudos mostraram que a VIM está expressa em linhagens de câncer de mama mais agressivas (MDA-435S, BT549, Hs578T a MDA-231), sugerindo que a sua expressão seria útil na identificação de casos de pior prognóstico. Porém, estudos que analisaram mais de 500 amostras de câncer de mama mostraram relação entre a expressão de VIM e o grau histológico, mas não conseguiram demonstrar o papel desta na predição do risco de recidiva ou morte (Heatley, Ewings, Odling Smee, Maxwell, & Toner, 2002) (Kokkinos et al., 2007) (Seshadri, Raymond, Leong, Horsfall, & McCaul, 1996).

2 OBJETIVOS

- Relacionar a expressão de CK5, VIM e CDH1 com fatores prognósticos já conhecidos em tumores mamários (comprometimento linfonodal, grau histológico, Ki-67, expressão de RE, RP e HER2);
- Caracterizar o fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low} (expressão de VIM concomitante à ausência/redução da expressão de CDH1) na amostra estudada;
- Avaliar a expressão de CK5 (CK5+) e do fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low} em carcinomas ductais mamários (CDI), com ênfase no TN;
- Análise de sobrevida (livre de progressão e global) e recorrência, em relação ao fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low}.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

Selecionou-se 175 pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal invasivo (CDI) de mama que foram submetidas a tratamento cirúrgico de janeiro de 2005 a dezembro de 2007 no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo. A seleção foi baseada no diagnóstico histológico e imunoistoquímico coletado do prontuário médico, e foram incluídas pacientes de todas as faixas etárias e estádios clínicos. O tratamento foi baseado nos Consensos de Saint Gallen de 2003 (A. Goldhirsch et al., 2003) e 2005 (A. Goldhirsch et al., 2005). De acordo com a IHQ, 27 amostras eram TN, 39 eram HER2 positivo (3+), 36 eram HER2 duvidoso (2+) e 73 eram receptor hormonal (RH) positivo (RE ou RP) e HER2 negativo.

Destas, 94 blocos estavam disponíveis, e 82 apresentavam material suficiente para a confecção dos blocos de TMA (“*tissue microarray*” – microarranjos teciduais) - 24 amostras de TN, 9 amostras HER2 positivo (3+)/RH negativo, 14 amostras HER2 positivo (3+)/RH positivo, e 35 amostras RH positivo/HER2 negativo. Estas foram reanalisadas quanto ao diagnóstico e grau histológico.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO

As variáveis analisadas, coletadas do prontuário médico, foram relacionadas às pacientes e ao tumor, sendo descritas a seguir.

3.2.1 VARIÁVEIS RELACIONADAS ÀS PACIENTES (Tabela 2)

- Idade da paciente ao diagnóstico;
- Estado menopausal. Foi considerada pós-menopausada a paciente que apresentou data da última menstruação há mais de 1 ano antes do diagnóstico de câncer de mama.

3.2.2 VARIÁVEIS RELACIONADAS AO TUMOR (Tabela 2)

- Estádio clínico (EC), de I a IV (EZTNM for the AJCC cancer staging manual, 2003);
- Grau de diferenciação histológico. Os tumores bem diferenciados foram classificados como grau I; os moderadamente diferenciados como grau II; e os pouco diferenciados como grau III;
- Tratamento sistêmico: neoadjuvante (quimioterapia ou hormonioterapia), quimioterapia e hormonioterapia adjuvantes, não realizado;
- Receptor de estrógeno;
- Receptor de progesterona;
- Hiperexpressão de HER2.

Tabela 2 - Características das pacientes e do tumor, relacionadas como média e desvio padrão (DP) ou número absoluto e porcentagem.

	<i>Média ± DP</i>	<i>Número</i>	<i>Porcentagem</i>
Idade (anos)	54,4 ± 13,1		
Estado Menopausal			
<i>Pré-Menopausa</i>		29	35,4%
<i>Pós Menopausa</i>		53	64,6%
Estádio Clínico			
<i>I</i>		8	9,8%
<i>IIA</i>		43	52,4%
<i>IIB</i>		16	19,5%
<i>IIIA</i>		8	9,8%
<i>IIIB</i>		6	7,3%
<i>IV</i>		1	1,2%
Grau de diferenciação			
<i>I</i>		9	11%
<i>II</i>		49	59,8%
<i>III</i>		24	29,2%
Tratamento Sistêmico*			
<i>Neoadjuvante</i>		24	
<i>Quimioterapia</i>		28	
<i>Hormonioterapia</i>		3	
<i>Não Realizado</i>		51	
Receptor Estrógeno			
<i>Positivo</i>		49	59,8%
<i>Negativo</i>		33	40,2%
Receptor Progesterona			
<i>Positivo</i>		44	53,6%
<i>Negativo</i>		38	46,4%
HER2			
<i>Positivo (3+)</i>		23	28%
<i>Negativo(0,1+,2+)</i>		59	72%

* algumas pacientes receberam mais de uma modalidade de tratamento sistêmico

3.3 MICROARRANJOS TECIDUAIS (TMA, “*tissue microarray*”)

Fragmentos de 1 mm (core biopsy) foram retirados das regiões selecionadas de cada um dos 82 blocos de parafina doador e dispostos em um novo bloco de parafina receptor utilizando um tecido de arranjo manual (Beecher Instruments, Silver Spring, MD, EUA). Foram selecionadas duas áreas representativas de cada tumor. Secções de três micrômetros de espessura foram cortadas do bloco de parafina de TMA usando Paraffin Tape-Transfer (Instrumedics, Saint Louis, MO, EUA). As lâminas foram mergulhadas em parafina para evitar a oxidação. Uma parte foi corada com hematoxilina e eosina para confirmar a presença do tumor por microscopia de luz.

Os TMAs foram confeccionados no Hospital A. C. Camargo, no Laboratório de Anatomia Patológica.

3.4 IMUNOISTOQUÍMICA PARA RE, RP, Ki-67, HER-2, VIM, CDH1 E CK5

Foram preparadas lâminas, de acordo com a técnica de TMA acima descrita. A imunoistoquímica foi realizada utilizando-se Novolink Max Polymer Detection System (Novocastra, Newcastle Upon Tyne, UK).

As lâminas embebidas em parafina foram desparafinizadas em xilol e reidratadas em uma série graduada de álcool. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada durante 30 minutos em solução de peróxido de hidrogénio 0,3%. As lâminas foram colocadas em tampão de citrato 10 mM e submetidos à técnica de recuperação antigênica induzida por calor, usando vapor por 40 min. As amostras foram esfriadas durante 30 minutos e, em seguida, incubou-se a 4°C durante a noite com o anticorpo primário.

Os anticorpos utilizados e suas diluições são descritas na tabela 3:

Tabela 3: Anticorpos utilizados

<i>Anticorpo</i>	<i>Clone</i>	<i>Diluição</i>	<i>Fabricante</i>	<i>Ponto de Corte</i>
Anti-RE	6F11	1:100	Novocastra	Allred >3 (+) Nuclear
Anti-RP	1A6	1:100	Novocastra	Allred >3 (+) Nuclear
Anti-Ki-67	MM1	1:200	Novocastra	>13% (+) Nuclear
HER2	Herceptest™		Dako	0 e 1(negativo) Membrana
Anti-VIM	V9	1:100	BioCare Medical	>30% (+) Citoplasma
Anti-CDH1	HECD-1	1:50	BioCare Medical	<30% (CDH1 ^{-/low}) Membrana
Anti-CK5	HPA024467	1:100	Sigma-Aldrich	>10% (+) Membrana

Após incubação do anticorpo primário, as lâminas foram incubadas com Post Primary Block por 30 minutos e, em seguida, com o polímero Novolink por mais 30 minutos. A reação foi desenvolvida com diaminobenzidina (DAB) e hematoxilina contrastante. As lâminas foram desidratados numa série de etanol e montada com Permount (Fisher, Fairlawn, NJ, EUA). O Dako HercepTest™ foi usada para coloração de HER2, de acordo com o protocolo do fabricante (Dako Denmark A / S, Glostrup, Dinamarca).

3.5 ANÁLISE DIGITAL DE KI-67

O TMA com marcação de Ki-67 foi digitalizado com aumento de 20X no Aperio Scanscope CS (Aperio Technologies Inc., Vista, CA, USA). O Aperio Scanscope CS é um sistema para digitalização de lâminas com capacidade para 5 lâminas, que digitaliza totalmente os cortes e registra as imagens em um arquivo. A imagem foi carregada no servidor Aperio Spectrum Plus, onde foi utilizado o módulo TMA Lab para quebrar as imagens em componentes lógicos de setores, linhas, colunas e cores. O algoritmo de análise de imagens Nuclear V9.1 foi utilizado para a quantificação do Ki-67. Este algoritmo divide os

dados de cor da imagem, até o máximo de 3 cores em 16 canais. Neste caso, separamos os canais em um canal azul hematoxilina e um canal marrom DAB. O canal restante foi deixado na cor vermelha e ignorado na análise. Para a coloração nuclear da proteína Ki-67, o algoritmo de co-localização reportou a porcentagem de células positivas entre as células neoplásicas.

Considerou-se a marcação de Ki-67 > 13% como positivo.

3.6 EXPRESSÃO DE RE, RP, HER2, VIM, CDH1 E CK5

A avaliação da expressão de RE e RP nos tumores foi realizada com microscopia de luz em aumento de 100 a 400 vezes. As lâminas foram avaliadas por dois observadores e os casos discordantes foram reavaliados em conjunto e chegado a um consenso final. Para os receptores hormonais, foram considerados casos positivos se o score de Allred era maior que 3 (Allred, Harvey, Berardo, & Clark, 1998).

A presença da proteína HER2 foi avaliada pela marcação de membrana celular e categorizada entre 0 e 3+. A categoria 0 foi definida pela não detecção de marcação de membrana ou pela marcação em menos de 10% das células neoplásicas. A categoria 1+ foi definida pela tênue e mal definida marcação de membrana em mais de 10% das células neoplásicas. A categoria 2+ foi definida pela observação de fraca a moderada marcação completa de membrana em mais de 10% das células tumorais e a categoria 3+, definida pela marcação intensa da membrana em mais de 30% das células tumorais. Foram considerados positivos tumores categorizados como 3+ (Wolff et al., 2007). Os casos com marcação 2+ foram excluídos da análise, pois não foi possível a realização de teste de CISH (chromogenic in situ hybridization) nas lâminas de TMA.

Na ocorrência de discordância entre os resultados da análise de RE, RP e HER2 entre a análise das lâminas de TMA e as lâminas avaliadas pelo Serviço de Patologia do hospital de origem, realizou-se a revisão da lâmina. Mantendo-se a divergência, foi mantido o resultado da lâmina inicial.

As marcações imunoistoquímicas para VIM e CDH1 foram realizadas nas lâminas de TMA e classificadas de acordo com a intensidade e porcentagem de células marcadas, considerando que a marcação deveria ser citoplasmática para a VIM e de membrana para a

CDH1, devido à localização das proteínas. Para VIM, foram consideradas positivas as marcações em mais de 30% das células tumorais da amostra (VIM⁺).

Na análise da expressão da CDH1, observou-se intensa marcação em toda a membrana celular nos CDIs. Considerou-se como ausência ou redução da expressão da CDH1 (CDH1^{-low}) os casos com marcação completamente negativa ou nos casos onde a marcação da membrana não era contínua em mais de 30% das células neoplásicas.

Quanto à análise da expressão de CK5, considerou-se positivo a marcação em mais de 10% das células tumorais.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis qualitativas (estado menopausal, grau histológico, estado da axila, estágio clínico, RE, RP, HER2, VIM, CDH1, CK5, subtipo clínico-patológico) foram analisadas em tabelas de contingência com o teste exato de Fisher, quando havia duas variáveis, ou com o teste qui-quadrado (χ^2) quando havia mais de duas variáveis para avaliação.

A associação destas variáveis com a idade e Ki-67 foi analisada utilizando-se o teste t de Student, e mediana, respectivamente. Os intervalos de sobrevida livre de progressão e sobrevida global foram calculadas a partir da data do diagnóstico, e as curvas de sobrevida foram estimadas com curvas de Kaplan-Meier e comparadas com teste de log-rank.

O *software* JMP 10 SAS foi utilizado para as análises estatísticas (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). Um valor $p < 0.05$ foi considerado estatisticamente significativo.

3.8 ASPECTOS ÉTICOS

Esse estudo foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP – USP, em sua 286ª Reunião ordinária realizada em 11/05/2009 e enquadrado na categoria aprovado, de acordo com o processo nº 3815/2009.

Por tratar-se de estudo retrospectivo, sem interferência no tratamento das pacientes, foi solicitado dispensa da aplicação de termo de consentimento livre e esclarecido.

4 RESULTADOS

4.1 AVALIAÇÃO DE KI-67

A mediana dos valores de Ki-67, dentre os subtipos clínico-patológicos, foi de 13.1%; 8.9%; 11.8% e 13.6% nos tumores HER2, Luminal A, Luminal B e TN, respectivamente. Houve diferença estatisticamente significativa dos valores de Ki-67 entre os grupos TN e Luminal A (teste χ^2 ; $p = 0.0002$) e Luminal A e HER2 (teste χ^2 ; $p = 0.009$) (Figura 1).

Os tumores com fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ apresentaram mediana de valores de Ki-67 de 13.6% e os não- $VIM^+/CDH1^{-/low}$ tiveram mediana de 9.8% (teste χ^2 ; $p = 0.0007$) (Fig. 1).

Em relação à expressão de CK5 (marcador basal), não houve diferença estatisticamente significativa entre os tumores que expressavam ou não esta proteína (teste χ^2 ; $p = 0.5$).

Figura 1 – Relação entre Ki-67, quanto ao subtipo clínico-patológico (azul), expressão de CK5 (vermelho), presença de fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ ou não (verde). Teste χ^2 , método de Dunn

4.2 EXPRESSÃO DE VIM E CDH1 NOS CARCINOMAS DUCTAIS INVASIVOS (CDI)

VIM não foi expressa nos tumores Luminal A e HER2, e foi expressa em uma pequena porcentagem dos tumores Luminal B (5%). Nos tumores TN, a expressão foi positiva em 71.4% dos casos (teste χ^2 ; $p < 0.0001$).

A ausência ou redução da expressão de CDH1 (CDH1^{-/low}) não foi observada nos tumores Luminal B e HER2, e foi observada em 7.1% e 61.9% dos Luminal A e TN, respectivamente (teste χ^2 ; $p < 0.0001$).

4.3 EXPRESSÃO DE CK5 NOS CDI (Tabela 4)

A expressão de CK5 (CK5+) foi mais frequente em tumores TN (54.2%). Entretanto, sua expressão foi positiva em 10%, 5.3% e 12.5% dos tumores Luminal A, Luminal B e tumores HER2, respectivamente (teste χ^2 ; $p = 0.0002$).

Os tumores sem expressão de CK5 (CK5-) apresentaram maior comprometimento axilar que os tumores CK5+ (teste de Fisher; $p = 0.02$).

Em relação à expressão de CK5, não observou-se diferença estatisticamente significativa em relação ao grau histológico, estado menopausal e estágio clínico.

Tabela 4 – Expressão de CK5 nos carcinomas ductais invasivos, em relação aos fatores prognóstico.

	CK5+	CK5-	P
Idade (anos)			
<i>Mediana</i>	56.55	53.69	
<i>DP</i>	± 2.51	± 1.74	
Menopausa			0.5*
<i>Pré (%)</i>	5 (28)	24 (61.9)	
<i>Pós (%)</i>	13 (72)	39 (38.1)	
Ki-67			0.5
<i>Mediana</i>	12.35	11.24	
<i>Luminal A (%)</i>	3 (10)	27 (90)	0.0002
<i>Luminal B (%)</i>	1 (5.3)	18 (94.7)	
<i>HER2 (%)</i>	1 (12.5)	8 (87.5)	
<i>TN (%)</i>	13 (54.2)	11 (45.8)	
Grau Histológico			0.09
<i>I (%)</i>	2 (11.1)	7 (11.1)	
<i>II (%)</i>	7 (38.9)	41 (65.1)	
<i>III (%)</i>	9 (50)	15 (23.8)	
Estádio Clínico			0.4
<i>CMI (%)</i>	16 (88.9)	51 (80.9)	
<i>CMLA(%)</i>	2 (11.1)	12 (19.1)	
Axila			0.02*
<i>Positiva (%)</i>	6 (33.3)	41 (65.1)	
<i>Negativa (%)</i>	12 (66.7)	22 (34.9)	

Idade, em número absoluto e desvio padrão (DP). CK5+: expressão de CK5; CK5-: ausência de expressão de CK5; CMI: câncer de mama inicial (EC I e II); CMLA: câncer de mama localmente avançado (EC III e IV) (teste χ^2 ; * teste exato de Fisher)

4.4 FENÓTIPO VIM⁺/CDH1^{-/low} (Tabela 5) (Figura 2 e 3)

Foi analisada a expressão concomitante de VIM e ausência/redução da expressão de CDH1 (VIM⁺/CDH1^{-/low}). Nos tumores Luminal A, Luminal B e HER2 não se observou este fenótipo. Já nos tumores TN observou-se este fenótipo em 61.9% dos casos (teste χ^2 ; p = 0.0001).

Em relação ao grau histológico, os tumores VIM⁺/CDH1^{-/low} foram mais frequentemente classificados como grau III (teste χ^2 ; p= 0.0009).

Em relação ao comprometimento axilar, os tumores VIM⁺/CDH1^{-/low} apresentaram menos comprometimento axilar comparado com o fenótipo não-VIM⁺/CDH1^{-/low} (23% versus 61%; teste χ^2 ; p= 0.01).

Em relação ao fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low}, não observou-se diferença estatisticamente significativa em relação à idade (teste t, p= 0.6), estado menopausal (teste χ^2 ; p= 0.9), estágio clínico (teste χ^2 ; p= 0.7) e presença de invasão linfo-vascular (teste χ^2 ; p= 1.0).

Figura 2 – CDI com marcação para vimentina (citoplasma) – marcação negativa acima e positiva abaixo. Aumento 400x.

Figura 3 – CDI com marcação para E-caderina (membrana) – marcação negativa acima e positiva abaixo. Aumento 400x.

Tabela 5 – Fenótipo VIM⁺/CDH1^{-low} nos carcinomas ductais invasivos, em relação aos fatores prognóstico.

	VIM ⁺ /CDH1 ^{-low}	não -VIM ⁺ /CDH1 ^{-low}	P
Idade (anos)			
<i>Mediana</i>	55.9	53.5	0.6*
<i>DP</i>	±16.1	±12	
Menopausa			0.9
<i>Pré (%)</i>	5 (42.9)	23 (37.3)	
<i>Pós (%)</i>	8 (57.1)	37 (62.7)	
Ki-67			0.0007
<i>Mediana</i>	13.63	9.86	
<i>Luminal A (%)</i>	0	28 (100)	<0.0001
<i>Luminal B (%)</i>	0	19 (100)	
<i>HER2 (%)</i>	0	5 (100)	
<i>TN (%)</i>	13 (61.9)	8 (38.1)	
Grau histológico			0.0009
<i>I (%)</i>	0	9 (15)	
<i>II (%)</i>	4 (30.8)	40 (66.7)	
<i>III (%)</i>	9 (69.2)	11 (18.3)	
Estádio Clínico			0.7
<i>I (%)</i>	1 (7.8)	6 (10)	
<i>II (%)</i>	9 (69.2)	45 (75)	
<i>III/IV (%)</i>	3 (23)	9 (15)	
Axila			0.01
<i>Positiva (%)</i>	3 (23)	37 (61.7)	
<i>Negativa (%)</i>	10 (77)	23 (38.3)	

Idade, em número absoluto e desvio padrão (DP). VIM⁺/CDH1^{-low}: fenótipo com expressão de VIM e redução/ausência de expressão de CDH1 (teste χ^2 ; * teste t)

4.5 FENÓTIPO $VIM^+/CDH1^{-/low}$ E EXPRESSÃO DE CK5 NOS CDI

Dos 21 tumores TN que puderam ser analisados quanto à expressão de CK5 e do fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$, a expressão de CK5 foi positiva em 13. O fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ foi observado em 5 dos tumores TN e CK5+, e em 8 dos tumores TN e CK5- (teste exato de Fisher; $p = 0.1$).

Figura 4 - Representação dos tumores TN, com expressão de CK5 e fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$

TN: triplo negativo. CK5+: expressão de CK5. $VIM^+/CDH1^{-/low}$: fenótipo com expressão de VIM e redução/ausência de expressão de CDH1.

4.6 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS TUMORES TN (Tabela 6)

Os tumores TN apresentaram valores de Ki-67 significativamente maiores que os Luminais A (teste χ^2 ; $p = 0.0002$), assim como os HER2 em relação aos Luminais A (teste χ^2 ; $p = 0.009$) (Figura 3).

Analisando-se o grau histológico, encontrou-se diferença estatística (teste χ^2 ; $p = 0.01$), porém não foi observado grau I nos tumores TN e HER2, o que compromete a interpretação deste dado.

Em relação ao comprometimento linfonodal, observou-se menor frequência de acometimento ganglionar nos tumores TN (30.4%) (teste χ^2 ; p= 0. 01).

Não se observou diferenças entre os subtipos clínico-patológicos quanto à idade, estado menopausal e estágio clínico.

Tabela 6 – Subtipos clínico-patológicos e relação com fatores prognósticos

	TN	HER2	Luminal A	Luminal B	P
<i>Idade</i>					0.1 ^{&}
<i>Mediana (anos)</i>	54.56	60.10	55.63	49.36	
<i>DP</i>	± 13.48	± 13.81	± 13.02	± 11.81	
<i>Estado Menopausal</i>					0.2
<i>Pré (%)</i>	8 (34.8)	1 (10)	12 (40)	8 (42.1)	
<i>Pós (%)</i>	15 (65.2)	9 (90)	18 (60)	11 (57.9)	
<i>Ki-67</i>					0.0002*
<i>Mediana</i>	13.63	13.73	8.86	11.82	0.009[#]
<i>Grau Histológico</i>					0.001
<i>I (%)</i>	0	0	5 (16.7)	4 (21.1)	
<i>II (%)</i>	10 (43.5)	7 (70)	22 (73.3)	10 (52.6)	
<i>III (%)</i>	13 (56.5)	3 (30)	3 (10)	5 (26.3)	
<i>Estádio Clínico</i>					0.6
<i>CMI (%)</i>	20 (87)	7 (70)	26 (86.7)	15 (79)	
<i>CMLA (%)</i>	3 (13)	3 (30)	4 (13.3)	4 (21)	
<i>Axila</i>					0.01
<i>Positiva (%)</i>	7 (30.4)	7 (70)	19 (63.3)	14 (73.7)	
<i>Negativa (%)</i>	16 (69.6)	3 (30)	11 (36.7)	5 (26.3)	

* - comparando-se TN e Luminal A (método de Dunn); # - comparando-se Luminal A e HER2 (método de Dunn); & -teste de Anova. CMI: câncer de mama inicial; CMLA: câncer de mama localmente avançado

4.7 ANÁLISE DE SOBREVIDA LIVRE DE PROGRESSÃO (SLP), SOBREVIDA GLOBAL (SG), E RECORRÊNCIA

Não se observou diferença estatisticamente significativa em SLP e SG entre os subtipos Luminal A, Luminal B, HER2 e TN. A expressão de CK5 também não interferiu no prognóstico da amostra analisada.

A SLP em 5 anos foi 61.5% e 83.7% (teste de long-rank; $p=0.02$) e a SG em 5 anos foi 51.2% e 83.5% (teste long-rank; $p=0.03$) nos pacientes com fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ quando comparados com o fenótipo não- $VIM^+/CDH1^{-/low}$ (Figura 5).

Figura 5 - Sobrevida livre de progressão (SLP) (curva A) e sobrevida global (SG) (curva B), de acordo com o fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ ou não- $VIM^+/CDH1^{-/low}$, medida em meses. Eixo x – tempo; eixo y – sobrevida (surviving). DFS (disease free survive – sobrevida livre de progressão), number at risk (número de pacientes em risco)

A.

B.

Analizamos o padrão de recorrência entre os diferentes subtipos de CDI. Dividimos os tumores em fenótipo não-TN, TN (não-VIM⁺/CDH1^{-/low}) e VIM⁺/CDH1^{-/low}. De acordo com esta divisão, identificamos dois grupos de tumores TN de acordo com o padrão de recorrência (Figura 6). Nesta figura, podemos observar que os tumores VIM⁺/CDH1^{-/low} apresentam metástases à distância mais precocemente em sua evolução.

Figura 6 – Recidiva nos CDI, de acordo com os fenótipos não-TN, TN (não-VIM⁺/CDH1^{-/low}), VIM⁺/CDH1^{-/low}. Eixo x – tempo, em meses; eixo y – recidiva (1 – presença de recidiva; 0 – ausência de recidiva)

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama não é uma única doença, mas um grupo heterogêneo de patologias agrupadas pelo critério anatômico, com comportamento biológico e clínico variados (Simpson et al., 2005). Esta complexidade é um fator chave para a falha do tratamento e recidiva (Perou et al., 2000) (Park et al., 2012). A imunoistoquímica é utilizada para analisar a expressão de proteínas específicas nas células neoplásicas, para identificar subgrupos de tumores com características específicas que permitam uma personalização do tratamento (Nielsen et al., 2004) (Livasy et al., 2006) (Cheang et al., 2008) (Choi, Oh, et al., 2010) (Park et al., 2012).

Neste estudo, caracterizamos a expressão de VIM e CDH1, marcadores da transição epitélio-mesênquima (TEM), e sua utilidade em distinguir um subgrupo dentre os CDI. Identificamos um subgrupo de CDI com um fenótipo mesenquimal, com características clínico-patológicas específicas. Portanto, o uso de marcadores mesenquimais pode ter valor clínico para a decisão terapêutica em pacientes com CDI de mama.

Para infiltrar o estroma e ter acesso aos vasos linfáticos e sanguíneos, as células epiteliais malignas devem desativar o mecanismo de adesão célula-célula e adquirir propriedades locomotoras. Este fenótipo celular observado nas células epiteliais tem sido denominado de transição epitélio-mesênquima (TEM) (Thiery, 2002) (Yang et al., 2004). O interesse atual neste processo baseia-se na sua associação com o mecanismo patológico de várias doenças, incluindo a progressão do câncer de mama (Thiery, 2002).

Duas alterações específicas são necessárias para uma célula epitelial adquirir propriedades específicas de célula mesenquimal. A primeira delas é a perda da transcrição de proteínas epiteliais, como a E-caderina (Kang & Massagué, 2004) (Lee, Dedhar, Kalluri, & Thompson, 2006). A segunda alteração é um aumento da expressão de proteínas específicas do mesênquima, como a fibronectina, a vimentina e a actina de músculo liso. Este padrão de expressão proteica está associado a mudanças abruptas na organização do citoesqueleto e perda da polaridade ápico-baso-lateral da célula (Debnath & Brugge, 2005) (Grünert, Jechlinger, & Beug, 2003).

Utilizando um modelo *in vitro-in vivo* de transformação maligna de células ductais induzida por estrogênio, Tiezzi et al (2007) demonstraram que, durante o processo da carcinogênese, existe um aumento progressivo da capacidade celular em ativar o processo de transição mesenquimal com redução progressiva da expressão de E-caderina e aumento da expressão de vimentina e fibronectina-1 (Tiezzi, Fernandez, & Russo, 2007).

Este conhecimento levou ao desenvolvimento de novas terapias direcionadas especificamente ao processo de TEM (Choi, Bocanegra, et al., 2010) (Hamilton, Litzinger, Fernando, Huang, & Palena, 2012) (Fang et al., 2013). Em nosso estudo, identificamos um subconjunto de CDI com fenótipo mesenquimal, caracterizado pela expressão de VIM e expressão ausente ou baixa de CDH1 ($VIM^+/CDH1^{-/low}$). Os tumores com este fenótipo apresentaram menor incidência de metástases linfonodais, que está associado à aquisição do fenótipo mesenquimal. O fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ estava presente em 17.8% dos casos analisados, associado a um comportamento tumoral agressivo, com elevado Ki-67 e alto grau histológico. Além disso, o grupo com fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ apresentou um prognóstico pior do que o grupo não- $VIM^+/CDH1^{-/low}$, com sobrevida livre de progressão em 5 anos de 61.5% e 83.7% ($p= 0.02$), e sobrevida global em 5 anos de 51.2% e 83.5% ($p= 0.03$), respectivamente. Nossos dados sugerem que a expressão de VIM e CDH1 podem ser usadas para posterior classificação do CDI em dois subtipos com diferentes características clínico-patológicas e prognóstico.

O tumor TN é um subtipo específico de câncer da mama, associado à recidiva precoce e com prognóstico reservado (Bertucci et al., 2008) (Reeder-Hayes et al., 2010) (Fornier & Fumoleau, 2012). O câncer de mama TN é frequentemente associado ao subtipo basal. Marcadores específicos que identifiquem o fenótipo basal não estão bem estabelecidos, fazendo com que o desenvolvimento de terapias específicas para este subgrupo de neoplasia seja uma área ativa de pesquisa (Sarrió et al., 2008) (Reeder-Hayes et al., 2010) (Rodler, Korde, & Gralow, 2010) (Fornier & Fumoleau, 2012) (Peddi, Ellis, & Ma, 2012) (Walsh et al., 2012). A análise do transcriptoma demonstrou que os carcinomas da mama basal exibem um perfil mesenquimal (Nielsen et al., 2004) (Livasy et al., 2006) (Bertucci et al., 2008). Em nosso estudo, o fenótipo mesenquimal ($VIM^+/CDH1^{-/low}$) estava presente apenas em tumores TN, com elevada taxa de expressão (61.9%). Assim, a terapia anti-TEM pode representar um potencial tratamento para câncer de mama TN.

Outra característica dos tumores TN é um comportamento biológico que podemos chamar de bipolar. Existe um grupo de pacientes que desenvolvem recidiva precoce e agressiva, enquanto outros pacientes apresentam evolução mais favorável onde o risco de recidiva e morte pela doença é reduzido após 2 a 3 anos do tratamento (Asaga et al., 2013) (Montagna et al., 2013) (Yu et al., 2013). Ainda não foi descrito marcadores que capazes de identificar subgrupos de tumores TN com pior prognóstico. Em nossa casuística, foi observado que os tumores com fenótipo $VIM^+/CDH1^{-/low}$ apresentam um padrão de recidiva distinto dos tumores TN não- $VIM^+/CDH1^{-/low}$. Nós observamos que as pacientes portadoras

de tumores com um fenótipo mesenquimal apresentam altas taxas de recidiva precoce enquanto que as pacientes com outros tumores TN apresentam recidivas mais tardias.

A expressão de CK5 é um dos marcadores utilizados para identificar o fenótipo basal nos tumores TN, sendo expressa em 61% - 95% destes, quando analisados pelo transcriptoma (Bhargava et al., 2008) (Aguar, Mendes, Bacchi, & Carvalho, 2013) (Alshareeda et al., 2013). No entanto, alguns tumores basal não expressam CK5, assim como a expressão de CK5 é observada em alguns tumores não-TN (Shao et al., 2012) (Aguar et al., 2013) (Alshareeda et al., 2013). No presente estudo, a positividade de CK5 foi mais frequente em tumores TN (54.2%), e estava presente em pequena porcentagem dos tumores luminais A (10%) e HER2 hiperexpresso (12.5%). Nós observamos que apenas 33% dos tumores CK5+ tinham um fenótipo mesenquimal (VIM⁺/CDH1^{-/low}). Além disso, o fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low} estava presente em 45% dos tumores TN e CK5+, e 78% dos tumores TN e CK5-. Portanto, a expressão de CK5 não estava associada com o fenótipo mesenquimal em tumores TN ou não-TN. Por outro lado, o fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low} foi observado apenas nos tumores TN e o padrão de recorrência destes tumores demonstrou que este subgrupo tem um comportamento clínico distinto quando comparado com os tumores TN não- VIM⁺/CDH1^{-/low}.

Em conclusão, o presente estudo demonstrou que a expressão de VIM e CDH1 identifica um subgrupo de CDI de mama com fenótipo mesenquimal. Este fenótipo foi associado a alto grau histológico, alto índice mitótico e mau prognóstico.

6 CONCLUSÃO

- A expressão de CK5, VIM e redução/ausência de expressão de CDH1 foi mais frequente nos tumores TN. Nos tumores CK5+ havia mais casos com comprometimento linfonodal. Não houve diferença estatística quanto às demais características analisadas (comprometimento linfonodal, grau histológico, Ki-67, expressão de RE, RP e HER2);
- Os tumores com fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low} representaram 17.8% dos casos analisados; apresentaram menor comprometimento linfonodal, grau histológico mais indiferenciado, e eram apenas do subtipo TN;
- Dentre os TN, 20% destes apresentaram o fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low} e CK5+;
- Os tumores com fenótipo VIM⁺/CDH1^{-/low} apresentaram menor SLP e SG.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Acs, G., Lawton, T. J., Rebbeck, T. R., LiVolsi, V. a, & Zhang, P. J. (2001). Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. *American journal of clinical pathology*, 115(1), 85–98. doi:10.1309/FDHX-L92R-BATQ-2GE0
- Aguiar, F. N., Mendes, H. N., Bacchi, C. E., & Carvalho, F. M. (2013). Comparison of nuclear grade and immunohistochemical features in situ and invasive components of ductal carcinoma of breast. *Revista brasileira de ginecologia e obstetrícia : revista da Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetrícia*, 35(3), 97–102
- Albergaria, A., Ribeiro, A.-S., Vieira, A.-F., Sousa, B., Nobre, A.-R., Seruca, R., ... Paredes, J. (2011). P-cadherin role in normal breast development and cancer. *The International journal of developmental biology*, 55(7-9), 811–22. doi:10.1387/ijdb.113382aa
- Allred, D. C., Harvey, J. M., Berardo, M., & Clark, G. M. (1998). Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 11(2), 155–68
- Alshareeda, A. T., Soria, D., Garibaldi, J. M., Rakha, E., Nolan, C., Ellis, I. O., & Green, A. R. (2013). Characteristics of basal cytokeratin expression in breast cancer. *Breast cancer research and treatment*, 139(1), 23–37. doi:10.1007/s10549-013-2518-x
- Asaga, S., Kinoshita, T., Hojo, T., Suzuki, J., Jimbo, K., & Tsuda, H. (2013). Prognostic factors for triple-negative breast cancer patients receiving preoperative systemic chemotherapy. *Clinical breast cancer*, 13(1), 40–6. doi:10.1016/j.clbc.2012.09.013
- Atlas de Mortalidade por Câncer. (n.d.). Retrieved March 24, 2013, from <http://mortalidade.inca.gov.br/Mortalidade/prepararModelo03.action>
- Badve, S., Dabbs, D. J., Schnitt, S. J., Baehner, F. L., Decker, T., Eusebi, V., ... Reis-Filho, J. S. (2011). Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 24(2), 157–67. doi:10.1038/modpathol.2010.200
- Bastien, R. R. L., Rodríguez-Lescure, Á., Ebbert, M. T. W., Prat, A., Munárriz, B., Rowe, L., ... Martín, M. (2012). PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC medical genomics*, 5, 44. doi:10.1186/1755-8794-5-44

- Bauer, K. R., Brown, M., Cress, R. D., Parise, C. a., & Caggiano, V. (2007). 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*, 109(9), 1721–8. doi:10.1002/cncr.22618
- Bergh, I., & Holmquist, M. (2001). Who should not receive adjuvant chemotherapy? International database. *Journal of Nacional Cancer Institute Monogram*, (93), 979–989.
- Berry, D. A., Cronin, K. A., Plevritis, S. K., Fryback, D. G., Clarke, L., Zelen, M., ... Feuer, E. J. (2005). Effect of screening and adjuvant therapy on mortality from breast cancer. *The New England journal of medicine*, 353(17), 1784–92. doi:10.1056/NEJMoa050518
- Bertucci, F., Finetti, P., Cervera, N., Esterni, B., Hermitte, F., Viens, P., & Birnbaum, D. (2008). How basal are triple-negative breast cancers? *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 123(1), 236–40. doi:10.1002/ijc.23518
- Bhargava, R., Beriwal, S., McManus, K., & Dabbs, D. J. (2008). CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. *American journal of clinical pathology*, 130(5), 724–30. doi:10.1309/AJCP3KFF1LTYWQIY
- Boyle, P. (2012). Triple-negative breast cancer: epidemiological considerations and recommendations. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 23 Suppl 6, vi7–12. doi:10.1093/annonc/mds187
- Carey, L. A., Perou, C. M., Livasy, C. A., Dressler, L. G., Cowan, D., Conway, K., ... Millikan, R. C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA : the journal of the American Medical Association*, 295(21), 2492–502. doi:10.1001/jama.295.21.2492
- Carvalho, F. M., Bacchi, L. M., Santos, P. P. C., & Bacchi, C. E. (2010). Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics*, 65(10), 1033–1036. doi:10.1590/S1807-59322010001000019
- Cheang, M. C. U., Voduc, D., Bajdik, C., Leung, S., McKinney, S., Chia, S. K., ... Nielsen, T. O. (2008). Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 14(5), 1368–76. doi:10.1158/1078-0432.CCR-07-1658
- Choi, Y.-L., Bocanegra, M., Kwon, M. J., Shin, Y. K., Nam, S. J., Yang, J.-H., ... Pollack, J. R. (2010). LYN is a mediator of epithelial-mesenchymal transition and a target of dasatinib in breast cancer. *Cancer research*, 70(6), 2296–306. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-3141

- Choi, Y.-L., Oh, E., Park, S., Kim, Y., Park, Y.-H., Song, K., ... Shin, Y. K. (2010). Triple-negative, basal-like, and quintuple-negative breast cancers: better prediction model for survival. *BMC cancer*, 10, 507
- Colditz G, Baer H, T. R. (2006). *cancer epidemiology and prevention* (3rd ed.). New York: Oxford University Press. Retrieved from http://www.lwwoncology.com/Textbook/Content.aspx?aid=8756139&highlight=&postback=1#devi9_c023s007r036
- Coleman, M. P., Quaresma, M., Berrino, F., Lutz, J.-M., De Angelis, R., Capocaccia, R., ... Young, J. L. (2008). Cancer survival in five continents: a worldwide population-based study (CONCORD). *The lancet oncology*, 9(8), 730–56. doi:10.1016/S1470-2045(08)70179-7
- Debnath, J., & Brugge, J. S. (2005). Modelling glandular epithelial cancers in three-dimensional cultures. *Nature reviews. Cancer*, 5(9), 675–88. doi:10.1038/nrc1695
- Dent, R., Trudeau, M., Pritchard, K. I., Hanna, W. M., Kahn, H. K., Sawka, C. a, ... Narod, S. a. (2007). Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 13(15 Pt 1), 4429–34. doi:10.1158/1078-0432.CCR-06-3045
- Dolle, J. M., Daling, J. R., White, E., Brinton, L. A., Doody, D. R., Porter, P. L., & Malone, K. E. (2009). Risk factors for triple-negative breast cancer in women under the age of 45 years. *Cancer epidemiology, biomarkers & prevention : a publication of the American Association for Cancer Research, cosponsored by the American Society of Preventive Oncology*, 18(4), 1157–66. doi:10.1158/1055-9965.EPI-08-1005
- Duband, J. L., Dufour, S., Hatta, K., Takeichi, M., Edelman, G. M., & Thiery, J. P. (1987). Adhesion molecules during somitogenesis in the avian embryo. *The Journal of cell biology*, 104(5), 1361–74
- Evans, R. M. (1998). Vimentin: the conundrum of the intermediate filament gene family. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*, 20(1), 79–86. doi:10.1002/(SICI)1521-1878(199801)20:1<79::AID-BIES11>3.0.CO;2-5
- Fang, Y., Chen, Y., Yu, L., Zheng, C., Qi, Y., Li, Z., ... Liu, M. (2013). Inhibition of breast cancer metastases by a novel inhibitor of TGF β receptor 1. *Journal of the National Cancer Institute*, 105(1), 47–58. doi:10.1093/jnci/djs485
- Ferlay, J., Shin, H.-R., Bray, F., Forman, D., Mathers, C., & Parkin, D. M. (2010). Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 127(12), 2893–917. doi:10.1002/ijc.25516

- Ford, D., Easton, D. F., Bishop, D. T., Narod, S. A., & Goldgar, D. E. (1994). Risks of cancer in BRCA1-mutation carriers. Breast Cancer Linkage Consortium. *Lancet*, 343(8899), 692–5
- Fornier, M., & Fumoleau, P. (2012). The paradox of triple negative breast cancer: novel approaches to treatment. *The breast journal*, 18(1), 41–51. doi:10.1111/j.1524-4741.2011.01175.x
- Foulkes, W. D., Stefansson, I. M., Chappuis, P. O., Bégin, L. R., Goffin, J. R., Wong, N., ... Akslen, L. A. (2003). Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*, 95(19), 1482–5
- Galou, M., Colucci-Guyon, E., Ensergueix, D., Ridet, J. L., Gimenez y Ribotta, M., Privat, a, ... Dupouey, P. (1996). Disrupted glial fibrillary acidic protein network in astrocytes from vimentin knockout mice. *The Journal of cell biology*, 133(4), 853–63
- Galou, M., Gao, J., Humbert, J., Mericskay, M., Li, Z., Paulin, D., & Vicart, P. (1997). The importance of intermediate filaments in the adaptation of tissues to mechanical stress: evidence from gene knockout studies. *Biology of the cell / under the auspices of the European Cell Biology Organization*, 89(2), 85–97
- Gilles, C., Polette, M., Mestdagt, M., Birembaut, P., & Foidart, J. (2003). Transactivation of Vimentin by β -Catenin in Human Breast Cancer Cells Transactivation of Vimentin by β -Catenin in Human Breast Cancer Cells 1, 2658–2664.
- Gilles, C., & Thompson, E. W. (1996). The Epithelial to Mesenchymal Transition and Metastatic Progression in Carcinoma. *The Breast Journal*, 2(1), 83–96. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1111/j.1524-4741.1996.tb00076.x>
- Goldhirsch, a, Glick, J. H., Gelber, R. D., Coates, a S., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2005). Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 16(10), 1569–83. doi:10.1093/annonc/mdi326
- Goldhirsch, a, Wood, W. C., Coates, a S., Gelber, R. D., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2011). Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 22(8), 1736–47. doi:10.1093/annonc/mdr304
- Goldhirsch, A., Wood, W. C., Gelber, R. D., Coates, A. S., Thürlimann, B., & Senn, H.-J. (2003). Meeting highlights: updated international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 21(17), 3357–65. doi:10.1200/JCO.2003.04.576

- Grünert, S., Jechlinger, M., & Beug, H. (2003). Diverse cellular and molecular mechanisms contribute to epithelial plasticity and metastasis. *Nature reviews. Molecular cell biology*, 4(8), 657–65. doi:10.1038/nrm1175
- Hamilton, D. H., Litzinger, M. T., Fernando, R. I., Huang, B., & Palena, C. (2012). Cancer vaccines targeting the epithelial-mesenchymal transition: tissue distribution of brachyury and other drivers of the mesenchymal-like phenotype of carcinomas. *Seminars in oncology*, 39(3), 358–66. doi:10.1053/j.seminoncol.2012.02.005
- Hands Schuh, G., Candidus, S., Lub er, B., Reich, U., Schott, C., Oswald, S., ... Becker, K. F. (1999). Tumour-associated E-cadherin mutations alter cellular morphology, decrease cellular adhesion and increase cellular motility. *Oncogene*, 18(30), 4301–12. doi:10.1038/sj.onc.1202790
- Haybittle, J. L., Blamey, R. W., Elston, C. W., Johnson, J., Doyle, P. J., Campbell, F. C., ... Griffiths, K. (1982). A prognostic index in primary breast cancer. *British journal of cancer*, 45(3), 361–6
- Heatley, M. K., Ewings, P., Odling Smee, W., Maxwell, P., & Toner, P. G. (2002). Vimentin expression does not assist in predicting survival in ductal carcinoma of the breast. *Pathology*, 34(3), 230–2. doi:10.1080/00313020220131273
- Herschkowitz, J. I., Simin, K., Weigman, V. J., Mikaelian, I., Usary, J., Hu, Z., ... Perou, C. M. (2007). Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome biology*, 8(5), R76. doi:10.1186/gb-2007-8-5-r76
- Hunt, N. C., Douglas-Jones, A. G., Jasani, B., Morgan, J. M., & Pignatelli, M. (1997). Loss of E-cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 430(4), 285–9
- INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2012. (n.d.). Retrieved April 11, 2012, from <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/index.asp?ID=5>
- Kang, Y., & Massagué, J. (2004). Epithelial-mesenchymal transitions: twist in development and metastasis. *Cell*, 118(3), 277–9. doi:10.1016/j.cell.2004.07.011
- Kashiwagi, S., Yashiro, M., Takashima, T., Nomura, S., Noda, S., Kawajiri, H., ... Hirakawa, K. (2010). Significance of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer. *British journal of cancer*, 103(2), 249–55. doi:10.1038/sj.bjc.6605735
- Kokkinos, M. I., Wafai, R., Wong, M. K., Newgreen, D. F., Thompson, E. W., & Waltham, M. (2007). Vimentin and Epithelial-Mesenchymal Transition in Human Breast Cancer – Observations in vitro and in vivo. *Cells Tissues Organs*, 185(1-3), 191–203. doi:10.1159/000101320

- Korsching, E., Packeisen, J., Agelopoulos, K., Eisenacher, M., Voss, R., Isola, J., ... Buerger, H. (2002). Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, 82(11), 1525–33
- Korsching, E., Packeisen, J., Liedtke, C., Hungermann, D., Wülfing, P., van Diest, P. J., ... Buerger, H. (2005). The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial–mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *The Journal of Pathology*, 206(4), 451–457. doi:10.1002/path.1797
- Kurian, A. W., Fish, K., Shema, S. J., & Clarke, C. A. (2010). Lifetime risks of specific breast cancer subtypes among women in four racial/ethnic groups. *Breast cancer research : BCR*, 12(6), R99. doi:10.1186/bcr2780
- Kwan, M. L., Kushi, L. H., Weltzien, E., Maring, B., Kutner, S. E., Fulton, R. S., ... Caan, B. J. (2009). Epidemiology of breast cancer subtypes in two prospective cohort studies of breast cancer survivors. *Breast cancer research : BCR*, 11(3), R31. doi:10.1186/bcr2261
- Larjava, H., Peltonen, J., Akiyama, S. K., Yamada, S. S., Gralnick, H. R., Uitto, J., & Yamada, K. M. (1990). Novel function for beta 1 integrins in keratinocyte cell-cell interactions. *The Journal of cell biology*, 110(3), 803–15
- Lee, J. M., Dedhar, S., Kalluri, R., & Thompson, E. W. (2006). The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *The Journal of cell biology*, 172(7), 973–81. doi:10.1083/jcb.200601018
- Lipponen, P., Saarelainen, E., Ji, H., Aaltomaa, S., & Syrjänen, K. (1994). Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer. *The Journal of pathology*, 174(2), 101–9. doi:10.1002/path.1711740206
- Livasy, C. a, Karaca, G., Nanda, R., Tretiakova, M. S., Olopade, O. I., Moore, D. T., & Perou, C. M. (2006). Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc*, 19(2), 264–71. doi:10.1038/modpathol.3800528
- Moll, R., Mitze, M., Frixen, U. H., & Birchmeier, W. (1993). Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *The American journal of pathology*, 143(6), 1731–42
- Montagna, E., Maisonneuve, P., Rotmensz, N., Canello, G., Iorfida, M., Balduzzi, A., ... Colleoni, M. (2013). Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. *Clinical breast cancer*, 13(1), 31–9. doi:10.1016/j.clbc.2012.09.002

- Nielsen, T. O., Hsu, F. D., Jensen, K., Cheang, M., Karaca, G., Hu, Z., ... Perou, C. M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 10(16), 5367–74. doi:10.1158/1078-0432.CCR-04-0220
- Oka, H., Shiozaki, H., Kobayashi, K., Inoue, M., Tahara, H., Kobayashi, T., ... Takeichi, M. (1993). Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer research*, 53(7), 1696–701
- Paik, S., Shak, S., Tang, G., Kim, C., Baker, J., Cronin, M., ... Wolmark, N. (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *The New England journal of medicine*, 351(27), 2817–26. doi:10.1056/NEJMoa041588
- Park, S., Koo, J. S., Kim, M. S., Park, H. S., Lee, J. S., Lee, J. S., ... Park, B.-W. (2012). Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 21(1), 50–7. doi:10.1016/j.breast.2011.07.008
- Parker, J. S., Mullins, M., Cheang, M. C. U., Leung, S., Voduc, D., Vickery, T., ... Bernard, P. S. (2009). Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 27(8), 1160–7. doi:10.1200/JCO.2008.18.1370
- Parkin, D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 118(12), 3030–44. doi:10.1002/ijc.21731
- Peddi, P. F., Ellis, M. J., & Ma, C. (2012). Molecular basis of triple negative breast cancer and implications for therapy. *International journal of breast cancer*, 2012, 217185. doi:10.1155/2012/217185
- Perou, C. M., Sørlie, T., Eisen, M. B., van de Rijn, M., Jeffrey, S. S., Rees, C. A., ... Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 406(6797), 747–52. doi:10.1038/35021093
- Prat, A., Parker, J. S., Karginova, O., Fan, C., Livasy, C., Herschkowitz, J. I., ... Perou, C. M. (2010). Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*, 12(5), R68. doi:10.1186/bcr2635
- Prat, A., & Perou, C. M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Molecular oncology*, 5(1), 5–23

- Qureshi, H. S., Linden, M. D., Divine, G., & Raju, U. B. (2006). E-Cadherin Status in Breast Cancer Correlates With Histologic Type But Does Not Correlate With Established Prognostic Parameters. *American Journal of Clinical Pathology*, 125(3), 377–385. doi:10.1309/WMX7DRWTFVQP2LQT
- Rakha, E. a, El-Sayed, M. E., Green, a R., Paish, E. C., Lee, a H. S., & Ellis, I. O. (2007). Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*, 50(4), 434–8. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02638.x
- Rakha, E. A., Reis-Filho, J. S., & Ellis, I. O. (2008). Basal-like breast cancer: a critical review. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*, 26(15), 2568–81. doi:10.1200/JCO.2007.13.1748
- Reeder-Hayes, K. E., Carey, L. a, & Sikov, W. M. (2010). Clinical trials in triple negative breast cancer. *Breast disease*, 32(1-2), 123–36. doi:10.3233/BD-2010-0310
- Reis-Filho, J. S., & Tutt, A. N. J. (2008). Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*, 52(1), 108–18. doi:10.1111/j.1365-2559.2007.02889.x
- Rodler, E., Korde, L., & Gralow, J. (2010). Current treatment options in triple negative breast cancer. *Breast disease*, 32(1-2), 99–122. doi:10.3233/BD-2010-0304
- Sarrió, D., Rodriguez-Pinilla, S. M., Hardisson, D., Cano, A., Moreno-Bueno, G., & Palacios, J. (2008). Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer research*, 68(4), 989–97. doi:10.1158/0008-5472.CAN-07-2017
- Seshadri, R., Raymond, W. A., Leong, A. S., Horsfall, D. J., & McCaul, K. (1996). Vimentin expression is not associated with poor prognosis in breast cancer. *International journal of cancer. Journal international du cancer*, 67(3), 353–6. doi:10.1002/(SICI)1097-0215(19960729)67:3<353::AID-IJC8>3.0.CO;2-Q
- Shao, M.-M., Chan, S. K., Yu, A. M. C., Lam, C. C. F., Tsang, J. Y. S., Lui, P. C. W., ... Tse, G. M. (2012). Keratin expression in breast cancers. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*, 461(3), 313–22. doi:10.1007/s00428-012-1289-9
- Siitonen, S. M., Kononen, J. T., Helin, H. J., Rantala, I. S., Holli, K. A., & Isola, J. J. (1996). Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *American journal of clinical pathology*, 105(4), 394–402.
- Simpson, P. T., Reis-Filho, J. S., Gale, T., & Lakhani, S. R. (2005). Molecular evolution of breast cancer. *The Journal of pathology*, 205(2), 248–54. doi:10.1002/path.1691

- Sørlie, T., Perou, C. M., Tibshirani, R., Aas, T., Geisler, S., Johnsen, H., ... Børresen-Dale, a L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98(19), 10869–74. doi:10.1073/pnas.191367098
- Sorlie, T., Tibshirani, R., Parker, J., Hastie, T., Marron, J. S., Nobel, A., ... Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(14), 8418–23. doi:10.1073/pnas.0932692100
- Sotiriou, C., & Desmedt, C. (2006). Gene expression profiling in breast cancer. *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO*, 17 Suppl 1(Supplement 10), x259–62. doi:10.1093/annonc/mdl270
- Stead, L. A., Lash, T. L., Sobieraj, J. E., Chi, D. D., Westrup, J. L., Charlot, M., ... Rosenberg, C. L. (2009). Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. *Breast cancer research : BCR*, 11(2), R18. doi:10.1186/bcr2242
- Struewing, J. P., Hartge, P., Wacholder, S., Baker, S. M., Berlin, M., McAdams, M., ... Tucker, M. A. (1997). The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *The New England journal of medicine*, 336(20), 1401–8. doi:10.1056/NEJM199705153362001
- Takeichi, M. (1991). Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science (New York, N.Y.)*, 251(5000), 1451–5
- Takeichi, M. (1993). Cadherins in cancer: implications for invasion and metastasis. *Current opinion in cell biology*, 5(5), 806–11
- Tang, P., Skinner, K. A., & Hicks, D. G. (2009). Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagnostic molecular pathology : the American journal of surgical pathology, part B*, 18(3), 125–32. doi:10.1097/PDM.0b013e31818d107b
- Thiery, J. P. (2002). Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews. Cancer*, 2(6), 442–54. doi:10.1038/nrc822
- Tiezzi, D. G., Fernandez, S. V., & Russo, J. (2007). Epithelial mesenchymal transition during the neoplastic transformation of human breast epithelial cells by estrogen. *International journal of oncology*, 31(4), 823–7

- Tutt, A., Wang, A., Rowland, C., Gillett, C., Lau, K., Chew, K., ... Waldman, F. (2008). Risk estimation of distant metastasis in node-negative, estrogen receptor-positive breast cancer patients using an RT-PCR based prognostic expression signature. *BMC cancer*, 8, 339. doi:10.1186/1471-2407-8-339
- Van de Vijver, M. J., He, Y. D., van't Veer, L. J., Dai, H., Hart, A. A. M., Voskuil, D. W., ... Bernards, R. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *The New England journal of medicine*, 347(25), 1999–2009. doi:10.1056/NEJMoa021967
- Walsh, S., Flanagan, L., Quinn, C., Evoy, D., McDermott, E. W., Pierce, A., & Duffy, M. J. (2012). mTOR in breast cancer: differential expression in triple-negative and non-triple-negative tumors. *Breast (Edinburgh, Scotland)*, 21(2), 178–82. doi:10.1016/j.breast.2011.09.008
- Wolff, A. C., Hammond, M. E. H., Schwartz, J. N., Hagerty, K. L., Allred, D. C., Cote, R. J., ... Hayes, D. F. (2007). American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Archives of pathology & laboratory medicine*, 131(1), 18–43. doi:10.1043/1543-2165(2007)131[18:ASOCCO]2.0.CO;2
- Yang, J., Mani, S. A., Donaher, J. L., Ramaswamy, S., Itzykson, R. A., Come, C., ... Weinberg, R. A. (2004). Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell*, 117(7), 927–39. doi:10.1016/j.cell.2004.06.006
- Yilmaz, M., & Christofori, G. (2010). Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Molecular cancer research : MCR*, 8(5), 629–42. doi:10.1158/1541-7786.MCR-10-0139
- Young, S. R., Pilarski, R. T., Donenberg, T., Shapiro, C., Hammond, L. S., Miller, J., ... Narod, S. A. (2009). The prevalence of BRCA1 mutations among young women with triple-negative breast cancer. *BMC cancer*, 9, 86. doi:10.1186/1471-2407-9-86
- Yu, K.-D., Zhu, R., Zhan, M., Rodriguez, A. A., Yang, W., Wong, S., ... Chang, J. C. (2013). Identification of prognosis-relevant subgroups in patients with chemoresistant triple-negative breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*, 19(10), 2723–33. doi:10.1158/1078-0432.CCR-12-2986