SERGIO MITSUO MASILI OKU

**Identificação de subtipos moleculares baseada no
perfil imunoistoquímico de carcinomas mamários
triplo-negativos em mulheres com idade até 45
anos e sua distribuição nas diferentes regiões
geográficas do Brasil**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São
Paulo para obtenção do título de
Doutor em Ciências

Programa de: Patologia

Orientadora: Profa. Dra. Filomena
Marino Carvalho

São Paulo
2016

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Oku, Sergio Mitsuo Masili

Identificação de subtipos moleculares baseada no perfil imunoistoquímico de carcinomas mamários triplo-negativos em mulheres com idade até 45 anos e sua distribuição nas diferentes regiões geográficas do Brasil / Sergio Mitsuo Masili Oku. -- São Paulo, 2016.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientadora: Filomena Marino Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Neoplasias de mama triplo negativas 3.Claudinas 4.Imuno-histoquímica 5.Linfócitos do interstício tumoral 6.Queratinas 7.Epidemiologia

USP/FM/DBD-142/16

*Existem três classes de pessoas
que são infelizes: a que não sabe e
não pergunta, a que sabe e não
ensina e a que ensina e não faz*

Buddha

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho

aos meus pais, ***Morizi Oku*** e ***Sílvia Vicari Masili Oku***,

à minha tia, ***Satiko Oku***,

a ***Roberto, Marina, Rafaella***

e ***Antônio Azevedo***.

AGRADECIMENTOS

À Professora Dra. **Filomena Marino Carvalho** por ter me acolhido e dado oportunidade de desenvolver este trabalho. Nos conhecemos há muitos anos e desde muito cedo admirei e respeitei sua integridade, sua preocupação com o próximo e seu amor pela ciência. Nunca hesitou em ensinar e dividir seus conhecimentos. Realmente a admiro.

Ao Professor Dr. **Carlos E. Bacchi** pelo pronto acolhimento dele e toda sua equipe no Laboratório Consultoria em Patologia em Botucatu.

Ao Departamento de Patologia por ter oferecido a oportunidade de elaborar e desenvolver este trabalho.

Ao Professor Dr. **Raymundo Soares de Azevedo Neto** pela acolhida e estímulo à realização deste trabalho.

Aos Professores: Dr. **Luiz Alberto Amador Pereira** e Dra. **Maria Lucia Zaidan Dagli** pelo grande apoio no início da pós-graduação.

Ao Professor Dr. **Edmund Chada Baracat** por sempre incentivar e apoiar a pesquisa científica.

Ao Professor Dr. **José Roberto Filassi** pela amizade e constante estímulo profissional.

Ao Professor Dr. **Roberto Eduardo Bittar**, agradeço pela confiança e amizade. Foi sempre um exemplo e estímulo à minha formação acadêmica.

Ao Dr. **Bernardo Gomes de Lacerda Almeida** pelo auxílio na elaboração desse trabalho.

Aos amigos do Instituto do Câncer – ICESP, por todo o apoio e incentivo.

Aos meus residentes, grandes responsáveis pelo estímulo à minha evolução

como professor e como pessoa.

Aos meus pais, **Morizi Oku** e **Silvia Vicari Masili Oku**, agradeço eternamente por todo esforço e dedicação. As palavras são poucas para descrever minha gratidão. Com muito sacrifício pessoal, ambos tiveram como objetivo de vida a preparação de seus filhos para o mundo.

Não poderia deixar de agradecer minha segunda mãe, minha tia, **Satico Oku**, um exemplo de ser humano a ser seguido.

A **Roberto Morizi Oku**, **Marina de Lorenzo** e **Rafaella Oku**. Minha família, minha referência.

Ao Dr. **Carlos Vicari** (*in memoriam*) por ter sido desde muito cedo a pessoa que me estimulou a seguir a medicina.

Ao meu tio Dr. **João Baptista Masili**, um exemplo para mim.

A **Antônio Azevedo** pelo apoio incondicional nos momentos mais difíceis.

À Sra. **Maria José de Souza** por toda ajuda prestada ao longo desses anos.

À Sra. **Claudia Vieira** e Sra. **Rita Gomes** pelo auxílio na formatação e revisão da tese.

À Sra. **Valeria De Vilhena Lombardi** e toda equipe da Biblioteca da Faculdade de Medicina da USP por todo apoio oferecido durante a elaboração deste trabalho.

Ao **Sr. Thiago Rezende** e todo grupo da secretaria de pós-graduação do departamento de Patologia pelo apoio ao aluno.

Apoio à pesquisa pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP): processo nº 2014/15472-8

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: *Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
Lista de Figuras	
Lista de tabelas	
Lista de Gráfico	
Resumo	
Abstract	
1	Introdução..... 1
2	Objetivos..... 6
3	Revisão da Literatura
	3.1 Câncer de mama..... 8
	3.2 Classificação molecular do câncer de mama..... 9
	3.3 Triplo negativo versus basal-símile..... 13
	3.4 Subtipos moleculares do câncer de mama triplo negativo(TN)..... 15
	3.4.1 Classificação histológica..... 16
	3.4.2 Classificação baseada na expressão gênica..... 16
	3.5 Marcadores imunoistoquímicos
	3.5.1 Citoqueratinas basais 5/6 e 14..... 17
	3.5.2 Citoqueratinas luminais 8 e 18..... 18
	3.5.3 Receptores do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1)..... 18
	3.5.4 Receptor de androgênio..... 19
	3.5.5 Sistema E-caderina-cateninas..... 20
	3.5.6 Claudinas..... 21
	3.5.7 Vimentina..... 22
	3.5.8 Actina de músculo liso..... 22
	3.5.9 p63 23
	3.5.10 ADLH 1 24
	3.5.11 Índice de proliferação ki67..... 25
	3.6 O papel do infiltrado linfocitário..... 26
	3.7 Tratamento sistêmico..... 27
	3.8 Terapias alvo..... 29
	3.8.1 Inibidores da VEGR..... 29
	3.8.2 Inibidores da PARP..... 30
	3.8.3 Epotilonas..... 30
	3.8.4 Inibidores do EGFR..... 31
	3.9 Aspectos epidemiológicos dos tumores triplo-negativos..... 31
4	Pacientes e Métodos
	4.1 Aprovação institucional..... 33
	4.2 Pacientes..... 33
	4.3 Estudo anatomopatológico..... 34
	4.4 Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA)..... 45
	4.5 Métodos do exame imunoistoquímico..... 46
	4.6 Interpretação imunoistoquímica..... 48
	4.7 Análise estatística..... 63
5	Resultados..... 65
6	Discussão..... 76

7	Conclusões.....	84
8	Anexo.....	86
9	Referências.....	87
10	Apêndice	

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADB-ribose	Adenosine difosfato ribose
ADLH	Aldeído dehidrogenase
AML	Actina de músculo liso
BL	<i>Basal like</i> - basal símile
BL1	<i>Basal like 1</i> - basal-símile tipo 1
BL2	<i>Basal like 2</i> - basal-símile tipo 2
BS	Basal-símile
c-erb-2	Proto-oncogene Her2/neu
BRCA1	<i>Breast Cancer Associated Gene 1</i>
CK	Citoqueratina
c-kit	Proto-oncogene
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
et al.	e colaboradores
FOXA1	<i>Forkhead-box protein 1</i>
GATA3	<i>Globin transcription factor 3</i>
GRB7	<i>Growth factor receptor-bound protein 7</i>
HDAC	Histona deacetilase
HER1	Receptor do fator de crescimento epidérmico 1
HER2	Receptor do fator de crescimento epidérmico 2
IH	Imunoistoquímica
IM	Imunomodulador
Ki 67	Marcador celular de proliferação
CK8	Citoqueratina 8
CK18	Citoqueratina 18
CK 5	Citoqueratina 5
CK17	Citoqueratina 17
LAR	Luminal androgênico
M	Mesenquimal
MED1	<i>Gene Mediator Complex Subunit 1</i>
MED24	<i>Gene Mediator Complex Subunit 24</i>
MSL	<i>Mesenchymal stem-like</i>
mTOR	<i>Mammalian Target of Rapamycin</i>

PAM50	Painel de 50 genes
P16	Inibidor da quinase ciclina-dependente
p53	Proteína p53
p63	Proteína p63
pCR	Resposta patológica completa
PIK3CA	Fosfatidil-inositol-3-quinase
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SLC39A6	<i>Solute carrier family 39 (zinc transporter), member 6</i>
sp3	Anticorpo monoclonal
Src	<i>Proto-oncogene tyrosine-protein kinase</i>
TMA	<i>Tissue microarray</i> – microarranjos de tecidos
TN	Triplo negativo
TKI	Inibidor da tirosina quinase
TP 53	Proteína tumoral 53
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
vs.	Versus
XBP1	<i>X-box-binding protein 1</i>

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Subtipos moleculares do câncer de mama. Fonte: Perou et al., Jama 2006;295(21):2492-502.....	10
Figura 2	Esquema do desenvolvimento da célula mamária a partir da célula tronco, sua diferenciação e os diversos perfis moleculares. Fonte: Prat e Perou, Nat Med 2009;842-4.....	12
Figura 3	Triplo-negativo x Basal-símile. Fonte: Carey et al., The Oncologist 2011;16(suppl 1):71–78.....	15
Figura 4	Classificação genética dos tumores TN segundo Lehmann et al. (2011).....	17
Figura 5	Seleção de pacientes.....	34
Figura 6	Embolização linfática peritumoral (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).....	36
Figura 7	Contorno tumoral parcialmente circunscrito (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 40x).....	37
Figura 8	Hialinização estromal intratumoral (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).....	39
Figura 9	Infiltração linfocitária intratumoral ausente (hematoxilina-eosina - aumento microscópico original 100x).....	40
Figura 10	Infiltração linfocitária intratumoral moderada (hematoxilina-eosina - aumento microscópico original 100x).....	41
Figura 11	Infiltração linfocitária intratumoral intensa (aumento microscópico original 200x).....	42
Figura 12	Necrose tumoral (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).....	43
Figura 13	Formação de túbulos ausente (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).....	44
Figura 14	Formação de túbulos Intensa (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).....	45
Figura 15	Expressão tumoral de e-caderina, padrão membrana, difuso (imunistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	48

Figura 16	Expressão tumoral de catenina-beta, padrão membrana, difusa (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	49
Figura 17	Expressão tumoral de p16 (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	50
Figura 18	Expressão tumoral de claudina 3, padrão membrana (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	51
Figura 19	Expressão tumoral de claudina 4, padrão membrana (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	51
Figura 20	Expressão tumoral de claudina 7, padrão membrana (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	52
Figura 21	Expressão de ALDH1 em células neoplásicas (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	53
Figura 22	Expressão de ALDH1 em células estromais e negativas nas células neoplásicas (imunoistoquímica – aumento microscópico original 100x).....	54
Figura 23	Expressão tumoral de citoqueratinas (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	55
Figura 24	Neoplasia com baixa atividade proliferativa mostrando marcação nuclear em células neoplásicas para Ki 67 de 10% (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x)	56
Figura 25	Neoplasia com alta atividade proliferativa marcação nuclear em células neoplásicas para Ki 67 de 95% (imunoistoquímica – aumento microscópico original 400x)....	57
Figura 26	Marcação citoplasmática em células neoplásicas para CK5 (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	58
Figura 27	Marcação de membrana em células neoplásicas para EGFR (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	59
Figura 28	Expressão tumoral de vimentina (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	60
Figura 29	Carcinoma de tipo apócrino. Receptor de androgênio	

	difusamente positivo nos núcleos das células neoplásicas (imunohistoquímica – aumento microscópico original 100x).....	61
Figura 30	Expressão tumoral de p63 (imunohistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	62
Figura 31	Expressão tumoral de actina de músculo liso em células neoplásicas esparsas. Note a difusa positividade em células estromais (imunohistoquímica – aumento microscópico original 200x).....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Especificações dos anticorpos primários utilizados.....	47
Tabela 2	Distribuição da idade das pacientes com carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas.....	65
Tabela 3	Distribuição dos tumores quanto ao grau histológico nas diferentes regiões geográficas.....	66
Tabela 4	Características do estroma intratumoral em 118 casos de carcinoma mamário triplo-negativo em mulheres de até 45 anos.....	67
Tabela 5	Distribuição das médias de expressão do Ki-67 em carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas.....	67
Tabela 6	Expressão imunoistoquímica em carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas.....	69
Tabela 7	Expressão de ALDH-1 em células neoplásicas e células do estroma intratumoral em carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos.....	70
Tabela 8	Distribuição dos subtipos moleculares baseada no perfil imunoistoquímico de carcinomas mamários triplo-negativos em pacientes de até 45 anos nas diferentes regiões geográficas.....	71
Tabela 9	Associação entre os fenótipos de expressão imunoistoquímica com o perfil basal.....	72
Tabela 10	Expressão de Ki-67 em cada subgrupo contendo o perfil imunoistoquímico assinalado.....	73
Tabela 11	Expressão imunoistoquímica dos carcinomas ricos em linfócitos comparada aos demais.....	74
Tabela 12	Perfis imunoistoquímicos presentes em carcinomas mamários triplo-negativos quanto à quantidade de linfócitos intratumorais.....	75

LISTA DE GRÁFICO

Gráfico 1	Distribuição da porcentagem de expressão do Ki-67 em células neoplásicas de carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas.....	67

RESUMO

Oku SMM. *Identificação de subtipos moleculares baseada no perfil imunoistoquímico de carcinomas mamários triplo-negativos em mulheres com idade até 45 anos e sua distribuição nas diferentes regiões geográficas do Brasil* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2016.

INTRODUÇÃO: Carcinomas mamários triplo-negativos correspondem ao grupo heterogêneo de neoplasias mamárias caracterizadas pela ausência de expressão dos receptores de estrogênio e progesterona e sem amplificação ou superexpressão do *HER2*. São mais prevalentes em mulheres jovens e em afrodescendentes. Eles se associam frequentemente ao fenótipo basal-símile determinado geneticamente, entretanto, incluem também outros tipos moleculares intrínsecos. Metodologias de análise genética de novas gerações têm permitido sua estratificação em subgrupos distintos, o que justifica a heterogeneidade clínica deste grupo de neoplasias. A identificação desses subgrupos através de marcadores imunoistoquímicos de aplicação prática ainda é pouco explorada, embora seja uma ferramenta promissora na sua estratificação e determinação de alvos terapêuticos. **OBJETIVOS:** Nosso objetivo é explorar os perfis imunoistoquímicos dos carcinomas mamários triplo-negativos em mulheres com idade até 45 anos e investigar possíveis diferenças entre as cinco regiões geográficas brasileiras. **MÉTODOS:** Selecionamos 118 amostras de tumores de pacientes com idade até 45 anos, com carcinoma invasivo, blocos de parafina disponíveis e perfil imunoistoquímico triplo-negativo, procedentes das cinco regiões geográficas.

Estes casos foram revisados quanto à determinação de tipo e grau histológico e as seguintes características anatomopatológicas: contorno do tumor, presença e fração do componente “in situ”, embolização vascular peritumoral, tipo e grau da reação estromal, presença de necrose tumoral e formação de túbulos pela neoplasia. Foram selecionadas áreas representativas do tumor para construção de blocos de microarranjos de tecido para estudo imunoistoquímico. Foram pesquisados os seguintes marcadores: citoqueratinas basais 5/6 e 14, citoqueratinas luminais 8 e 18, receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1), receptor de androgênio, e-caderina, catenina-beta, claudinas 3, 4 e 7, vimentina, actina de músculo liso, p63, ALDH1 e Ki-67. De acordo com a expressão dos marcadores, os tumores foram classificados nos subgrupos basal-símile (expressão de citoqueratina basal 5/6 e/ou EGFR-positivo), claudina-baixo (claudinas e e-caderina-negativos), mesenquimal (vimentina-positivo), apócrino (receptor de androgênio-positivo), mioepitelial (p63 ou actina de músculo liso positivos), com perfil de células tronco (ALDH1 positivo), ou indefinido (padrões negativo para todos os marcadores). Nestes subtipos, a atividade proliferativa foi analisada através da expressão de Ki-67. As neoplasias provenientes das cinco regiões geográficas foram comparadas quanto às características histológicas e perfis imunoistoquímicos. RESULTADOS: A idade das pacientes variou de 26 anos a 45 anos (média 38,3 +/-4,9 e mediana de 39 anos). O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma de tipo histológico não especial (107/118 casos; 90,7%). Observamos maior proporção de carcinomas de alto grau nas regiões nordeste, sul e sudeste. Os marcadores imunoistoquímicos não mostraram diferenças nas frequências entre as diferentes regiões geográficas.

Observamos baixa atividade proliferativa determinada pela expressão do Ki-67 nos subgrupos com expressão do receptor de androgênio (apócrino) e sem expressão de vimentina (padrão não mesenquimal). Os tumores da região Nordeste, Sul e Sudeste apresentaram maior atividade proliferativa. Tumores ricos em linfócitos intratumorais apresentaram menor expressão de marcadores basais e do perfil basal-símile. CONCLUSÕES: Os subtipos moleculares determinados através da expressão imunoistoquímica não mostraram diferenças nas frequências entre as diferentes regiões geográficas. Os tumores das regiões Nordeste, Sul e Sudeste apresentaram maior atividade proliferativa. Os carcinomas ricos em linfócitos intratumorais apresentaram frequência menor do perfil basal.

Descritores:

1. Neoplasias da mama 2. Neoplasias de mama Triplo Negativas 3. Claudinas 4. Imuno-histoquímica 5. Linfócitos do Interstício Tumoral 6. Queratinas 7. Epidemiologia

ABSTRACT

Oku SMM. *Identification of molecular subtypes based on immunohistochemical profile of triple-negative breast cancer (TNBCs) in women aged up to 45 years and its distribution in different geographical regions of Brazil*. [Thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2016.

BACKGROUND: Triple-negative breast carcinomas (TNBC) correspond to a heterogeneous group of neoplasia characterized by the lack of expression of estrogen and progesterone receptors, and by the absence of amplification or overexpression of HER2. They are more prevalent among African descendants and younger women. They are often associated with the basal-like genetic phenotype; however, other intrinsic molecular types are included. Genomic analyses of next-generation methods have allowed stratification of TN breast carcinomas into distinct subgroups, explaining the clinical heterogeneity of this group of neoplasias. The identification of these subgroups by immunohistochemical markers is not well explored, although it represents a potential useful tool for the stratification and determination of therapeutic targets. **OBJECTIVES:** Our aim is to explore the TNBC immunohistochemical profile in patients of 45 year-old or younger, and to investigate possible differences among the five Brazilian geographic regions. **METHODS:** We've selected 118 samples of tumors from patients up to 45 years-old from five Brazilian geographic regions, with invasive carcinoma, available paraffin blocks, and triple-negative immunohistochemical profile. All the cases were reviewed as for determination of histologic type and grading, and the following

pathological features: tumor contour, presence and percentage of *in situ* component, peritumoral vascular embolization, type and grade of stromal reaction, presence of tumoral necrosis, and tubule formation by neoplasia. Representative tumor areas were selected for tissue microarray construction for immunohistochemical study. The following markers were studied: Basal cytokeratins 5/6 and 14; luminal cytokeratins 8 and 18; Epidermal growth factor receptor (EGFR or HER1); androgen receptor; e-cadherin; catenin-beta; claudins (3,4 and 7); vimentin; smooth-muscle actin; p63, ALDH1, and Ki-67. According to the expression of the markers, the tumors were grouped in the basal-like subgroups (basal cytokeratins 5/6 and/or EGFR positive), claudin-low (claudins and/or e-cadherin negative), mesenchymal (vimentin-positive), apocrine (androgen receptor positive), myoepithelial (p63 and/or smooth muscle actin positive), stem-cell (ALDH1-positive), or undefined (negative for all markers). In these subtypes the proliferative activity through the Ki-67 expression was analyzed. Neoplasias from the five regions were compared as for histological characteristics and immunohistochemical profiles. RESULTS: The age of patients ranged from 26 years to 45 years (mean 38.3 +/- 4.9 and median of 39 years). The most common histological type was no special histological type (NST) of carcinoma (107/118 cases, 90.7%). We observed a higher proportion of high-grade carcinomas in the regions Northeast, South and Southeast. Compared to the Midwestern and Northern regions there was no statistically significant difference ($p = 0.03$). The immunohistochemical markers showed no differences in the frequencies between the different geographical regions. We observed low proliferative activity determined by Ki-67 expression in the subgroups with androgen receptor expression (apocrine)

and no expression of vimentin (no mesenchymal pattern). Tumors of the Northeast, South and Southeast have higher proliferative activity. There was a lower frequency of immunohistochemical markers associated with basal molecular type between tumors rich in lymphocytes. CONCLUSIONS: The molecular subtypes determined by immunohistochemical expression have shown no differences in the frequencies among the different geographical regions. Tumors in the Northeast, South and Southeast had higher proliferative activity. Carcinomas rich in intratumoral lymphocytes had lower frequency of basal profile.

Descriptors:

1.Breast Neoplasms 2. Triple Negative Breast Neoplasms 3. Claudins
4.Immunohistochemistry 5. Lymphocytes, Tumor-Infiltrating 6. Keratins
7.Epidemiology

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é a maior causa de morte relacionada ao câncer entre as mulheres em todo mundo. Avanços no seu tratamento resultaram em taxa de sobrevida em 5 anos de aproximadamente 90% (1).

A alta incidência dessa neoplasia, por um lado, é devido ao maior acesso da população aos métodos de rastreamento, favorecendo a identificação da patologia. Essa incidência aumentou aproximadamente 30% entre as décadas de 80 e 90, principalmente com a evolução tecnológica dos métodos de diagnóstico por imagem. Por outro lado, existe a alta prevalência de fatores de risco (2). Esses fatores incluem: ganho de peso após os 18 anos, sedentarismo, uso de álcool, menarca precoce, menopausa tardia, uso de anticoncepcionais orais e o aumento na utilização de terapia de reposição hormonal (2)(3). No início de 2000, esse crescimento perde força e estabiliza-se principalmente nos países desenvolvidos devido, provavelmente, ao impacto dos resultados do estudo WHI (*Women`s Health Initiative*), que relacionou o câncer de mama com terapia de reposição hormonal(4). Paradoxalmente, a incidência continuou a aumentar nos países em desenvolvimento. As causas não são completamente compreendidas, porém, acredita-se que os motivos poderiam ser as mudanças nos hábitos de vida associadas a maior acesso aos métodos de rastreamento (5).

As últimas décadas têm sido revolucionárias no conhecimento da fisiopatologia do câncer de mama. Sua heterogeneidade se tornou cada vez

mais evidente e novas classificações com significado prognóstico têm sido criadas, levando à criação de novos protocolos de tratamento.

O câncer de mama tem sido estratificado em 3 grupos principais baseados em marcadores celulares com reflexo direto na terapia, sendo: a) Receptor de estrogênio (RE) positivo ou receptor de progesterona (RP) positivo b) HER2 positivo com ou sem positividade dos RE ou RP e os c) triplo negativos, com ausência de positividade nos três receptores. Existem terapias-alvo para os grupos a e b, mas não existe terapia padrão para o grupo c (6).

Os tumores de mama triplo-negativos (TN) representam um grupo heterogêneo de neoplasias com comportamento agressivo e ainda sem terapia-alvo definida. Apresentam em comum a falta de expressão dos receptores de estrogênio e progesterona e a ausência de amplificação do HER2, mas são muito heterogêneos do ponto de vista histológico, genético e de resposta à terapia. Embora estejam associados frequentemente ao fenótipo genético basal-símile, 21,4% deles correspondem a outros tipos, tais como: HER2 enriquecido (7,8%), luminal A (2,2%), luminal B (4,4%) e mama normal (7,0%) (7). Análises moleculares com metodologia de estudo genético em larga escala começam a delinear subgrupos distintos, como os basal-símile tipos 1 e 2, claudina baixa, imunomodulador, mesenquimal, células-tronco e luminal androgênico (8). O perfil imunoistoquímico correspondente a esses tipos ainda é pouco estudado. O fenótipo genético basal-símile é geralmente definido pela expressão imunoistoquímica de citoqueratinas (CK) basais (mais frequentemente a 5/6) e/ou Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) (9). Entre os demais fenótipos, os melhores caracterizados têm sido os

apócrinos, baseado na expressão do receptor de androgênio (10, 11).

Os carcinomas mamários TN constituem em nosso meio entre 14,0% (região sudeste) a 20,3% (região norte) dos carcinomas mamários (12). A maioria (88,1%) pode ser classificada como basal-símile, concordante com a literatura (13). Entretanto, a simples definição de basal-símile ainda congrega neoplasias distintas do ponto de vista biológico e de resposta aos tratamentos convencionais, sem mencionar o fato que em grupos muito heterogêneos, a dificuldade em identificar alvos terapêuticos é maior.

O primeiro fator a ser considerado na avaliação dos tumores TN é a idade da paciente. Em estudo prévio, pudemos observar que a frequência desse fenótipo é maior nas mulheres jovens, abaixo dos 35 anos (35,6% vs. 16,2%); mas, apesar da fração de neoplasias basal-símile baseada na expressão de CK5/6 e/ou EGFR ser similar à das pacientes acima dos 60 anos, os carcinomas das mulheres jovens cumprem esse fenótipo principalmente às custas da expressão de EGFR e não de CK5/6 (14). Esse padrão sugere diferenças biológicas. De fato, Viale *et al.* observaram que a expressão de EGFR em carcinomas triplo-negativos associa-se a pior prognóstico(15). Seguramente a expressão de EGFR entre os carcinomas basais-símeis responde somente por parte da heterogeneidade do grupo. Os carcinomas triplo-negativos incluem o subgrupo claudina-baixa (16, 17), parte dos carcinomas apócrinos (10, 18), carcinomas com fenótipo mesenquimal com expressão de vimentina (19), carcinomas metaplásicos com expressão de marcadores mioepiteliais como p63, actina de músculo liso e calponina (20, 21), além de neoplasias com expressão de marcadores de células tronco,

como a aldeído desidrogenase 1A1 (ALDH1) (22, 23) .

Em estudo recente comparativo de tumores TN em mulheres afroamericanas e caucasianas, observou-se que as negras apresentam neoplasias de pior prognóstico e com diferenças na expressão de CK5, CK8, CK19, c-kit, receptor de androgênio, além de maior atividade proliferativa marcada pela expressão de Ki-67 (24).

O Brasil é o 5º país mais populoso com aproximadamente 200 milhões de habitantes, com 26 estados, dividido em cinco regiões: Norte, Nordeste, Centro Oeste, Sudeste e Sul (25). A composição étnica é altamente variada entre essas regiões e inclui descendentes de índios nativos, imigrantes europeus e descendentes de africanos trazidos para o continente, como escravos no Século XVIII e XIX. Essas populações étnicas diversas relacionaram-se entre si e grande parte da população tem ascendência mista. Há diferenças geográficas significativas na composição racial do Brasil. Na Região Sul, pessoas descendentes de europeus compõem 79,6% da população. A região Sudeste é a parte etnicamente mais diversa do país com os brancos, compondo 58,8% dessa população e aqueles de raça mista e descendentes de africanos compondo 40,2%. A população do Nordeste é o resultado de uma intensa mistura de raças que ocorre na região por mais de quatro séculos. A região Norte, largamente coberta pela floresta tropical amazônica, é a região brasileira com maior influência ameríndia. A região Centro Oeste era habitada por diversos índios quando os europeus chegaram. No começo do século XVIII, poucos escravos africanos foram trazidos para essa área. O contato entre o português e o índio gerou uma raça mista.

As regiões geográficas brasileiras diferem não só na composição racial das suas populações, mas também no clima, hábitos alimentares, grau de industrialização e perfil socioeconômico. Todos esses fatores potencialmente contribuem para diferenças na incidência e tipos de câncer.

Portanto, os carcinomas mamários triplo-negativos correspondem a um grupo muito agressivo, associado à idade jovem, raça negra, fenótipo basal-símile e mutação do BRCA1. Essa agressividade associada à falta de terapia específica constituem um grande desafio. Neste estudo procuramos identificar subtipos moleculares baseados no perfil imunoistoquímico decorrentes de vias distintas de carcinogênese e com possibilidade de futuras investigações de novas terapias-alvo. Ciente da influência racial na apresentação desses tumores, tentamos analisar os diferentes fenótipos apresentados pelos carcinomas invasivos triplo-negativos e investigar sua distribuição nas cinco regiões geográficas brasileiras. No sentido de restringir a influência da idade e do estado menopausal nos resultados, incluímos mulheres até 45 anos de idade. Tais informações poderão nortear ações de saúde pública.

2 OBJETIVOS

Em carcinomas mamários triplo-negativos de pacientes de até 45 anos provenientes das cinco regiões geográficas brasileiras:

1. Comparar a idade das pacientes provenientes das cinco regiões geográficas;
2. Descrever as características histológicas: tipo e grau histológicos, fração de diferenciação tubular, componente “in situ”, contornos do tumor, embolização vascular peritumoral, necrose tumoral e características da reação do estroma intratumoral;
3. Determinar a frequência de expressão imunoistoquímica de citoqueratinas basais 5/6 e 14, citoqueratinas luminais 8 e 18, Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1), receptor de androgênio, e-caderina, catenina-beta, claudinas 3, 4 e 7, vimentina, actina de músculo liso, p63, p16 e ALDH1 e sua distribuição nas diferentes regiões geográficas;
4. Definir subtipos moleculares baseados na expressão dos marcadores imunoistoquímicos acima e sua distribuição nas diferentes regiões geográficas;
5. Comparar a atividade proliferativa através da expressão do Ki-67 dos tumores nas diferentes regiões geográficas, nos subtipos moleculares baseados no perfil imunoistoquímico e entre tumores rico em linfócitos e os demais;

6. Determinar o perfil imunoistoquímico mais frequentemente associado à infiltração linfocitária intratumoral.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 O câncer de mama

O câncer de mama mantém-se mundialmente como a neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres e uma das maiores causas de morte por câncer, independente dos avanços nos métodos de diagnóstico e no seu tratamento (26, 27). É um dos tumores mais comuns na raça humana e o mais frequente dentre as mulheres, excetuando os tumores de pele. Quando comparado a todas outras neoplasias corresponde a 23% dos novos casos de câncer com taxa de mortalidade total de 14%(28).

Além de suas consequências na qualidade de vida, tem um impacto muito importante na sociedade em termos epidemiológicos e econômicos (29, 30).

Apesar do enorme avanço no campo da oncologia molecular, seu combate continua sendo um grande desafio. A introdução de tecnologias avançadas de diagnóstico por métodos de imagem, o avanço na introdução de novos esquemas de terapêuticos, além de novas drogas, as chamadas terapia alvo, têm levado a um aumento exponencial dos custos de tratamento. Como consequência, esses benefícios acabam sacrificando ainda mais o sistema de saúde e se distanciando dos países em desenvolvimento (30, 31).

O câncer de mama corresponde a um grupo heterogêneo de tumores, que apresentam comportamentos distintos, prognósticos e respostas ao tratamento variáveis (32). Além disso, tumores classificados com o mesmo

tipo histológico e grau podem apresentar aspectos biológicos e moleculares distintos. A heterogeneidade molecular desses tumores não pode ser identificada morfolologicamente e representa um enorme desafio da pesquisa e no tratamento do câncer de mama (33). Nas últimas décadas, com o avanço das técnicas de biologia molecular, numerosos estudos têm sido conduzidos na tentativa de melhor entender essas diferenças.

3.2 Classificação molecular do câncer de mama

O receptor de estrogênio (RE) e progesterona (RP) fazem parte da prática clínica desde os anos 70, compondo a classificação dos tumores mamários (1). Portanto, por mais de 3 décadas, esses dois receptores têm sido utilizados como marcadores fundamentais para determinar o benefício ou não do tratamento hormonal.

Em 1984, Weinberg *et al.* descobriram o gene do receptor do fator de crescimento epidermal humano (HER2) (34). Desde então, sua detecção foi adicionada à rotina diagnóstica. A amplificação e/ou superexpressão do gene HER2 no câncer de mama está /estão relacionada(s) a mau prognóstico (34, 35). Essa descoberta levou ao desenvolvimento do anticorpo monoclonal trastuzumabe para tratamento adjuvante do câncer de mama HER2 positivo.

Com a introdução da técnica de microarranjos de DNA, houve um avanço importante na classificação molecular do câncer de mama. Uma série de estudos sobre a expressão gênica tumoral levou à criação de cinco subtipos moleculares associados a diferenças na sobrevida (36, 37). Foram

denominados: luminal A, luminal B, basal-símile, HER2+ e mama normal (36). Figura 1.

Figura 1: Subtipos moleculares do câncer de mama.
 Fonte: Perou et al., *Jama*. 2006;295(21):2492-502.

Observou-se, ainda, uma diferença significativa na sobrevida global em diferentes estudos de acordo com o subtipo molecular (38). As implicações clínicas dessa nova classificação foram validadas em numerosos trabalhos, tanto em relação a prognóstico como resposta clínica (39).

O subtipo luminal A tipicamente apresenta uma alta expressão do RE, do gene de regulação *SLC39A6*, fatores de transcrição *GATA3*, *FOXA1* e *XBP1*, além das citoqueratinas luminais CK8 e CK18 (36, 40). Esses tumores apresentam uma baixa taxa de mutação, além de serem frequentemente

diploides de baixo grau. Os tumores luminais B apresentam baixa expressão de RE (36, 40), são mais proliferativos, de alto grau, frequentemente apresentam aneuploidias e mutação dos genes *TP53* e *PIK3CA* (41, 42). Uma proporção dos tumores luminais B apresentam uma superexpressão do oncogene *HER2* (36, 43).

O subtipo HER2 é caracterizado por alta expressão dos genes *ERBB2*, *GRB7*, *MED24* e *MED1* (36). Esses tumores são tipicamente negativos para expressão dos genes epiteliais luminais e mostram alta expressão de genes relacionados a progressão do ciclo celular (40). Correspondem a um grupo de alta agressividade (44).

O subtipo mama normal apresenta semelhanças de expressão gênica das células epiteliais mamárias normais, tecido adiposo e outros tipos de células não epiteliais (37). Apesar desses tumores serem claramente carcinomas que têm expressões genéticas comuns entre subtipos basal-símile e luminais, não apresentam genes de proliferação associados (40) e especula-se que apresentem baixa porcentagem de células tumorais, refletindo o tecido não neoplásico.

Finalmente, os tumores basal-símile (BS) são caracterizados pela alta expressão de citoqueratinas basais 5 (CK5) e 17 (CK17) , além de outros genes tipicamente expressos em células basais/mioepiteliais como *LAMC1* (laminina γ 1), *ANXA8* (annexin A8) e *CDH3* (caderina 3 , tipo 1) (36, 37).

Esses tumores não expressam RE ou outros genes epiteliais luminais; são negativos para HER2 e frequentemente superexpressam EGFR.

Esse subtipo frequentemente apresenta rearranjos genômicos

complexos e mutação do *TP53*, além de frequentemente serem tumores aneuplóides e de alto grau (41, 45-47). (Figura 2)

Figura 2: Esquema do desenvolvimento da célula mamária a partir da célula-tronco, sua diferenciação e os diversos perfis moleculares.
 Fonte: Prat e Perou, Nat Med 2009;842-4

Portadores de mutação do *BRCA1* desenvolvem tumores BS (38, 48) e especula-se que defeitos no mecanismo de reparo do DNA são responsáveis pelo seu desenvolvimento (49). Além disso, os tumores BS apresentam características de células-tronco e progenitoras (44, 50). Esse grupo representa uma entidade única, pois será útil na identificação de terapias moleculares específicas (51, 52).

Apesar dos tumores TN serem definidos como um grupo distinto dentre

os subgrupos de câncer de mama, eles mesmos representam um grupo muito heterogêneo. São muitas vezes comparados com “linfoma não Hodgkin” ou “câncer de pulmão de células não pequenas” (8).

O tratamento dos tumores TN representa um desafio, além de apresentarem mau prognóstico, não apresentam terapia-alvo específica. Existe uma grande necessidade de tentarmos entender melhor a biologia desses tumores agressivos e o desenvolvimento de terapias-alvo específicas (8).

Com esses objetivos, os estudos avançaram na tentativa de subclassificar os tumores TN.

3.3 Triplo negativo versus basal-símile

Como boa parte dos tumores BS tem fenótipo TN, esses termos são usados frequentemente como sinônimos nos trabalhos científicos e na prática clínica (38, 42).

Entretanto, está claro que os tumores BS representam apenas um subgrupo dos tumores TN e que nem todos os tumores com perfil BS são realmente TN (38).

Sorlie *et al.* em 2001 associaram inicialmente os tumores BS à ausência de receptores de estrogênio, progesterona e HER2 (37). Entretanto, um estudo de Bertucci *et al.* (53) revelou que os tumores BS e TN seriam entidades distintas. Usando perfil de expressão gênica, 123 amostras de 172 TN (71%) se agruparam como BS, sugerindo que nem todos tumores TN são do subtipo BS. Ao contrário, somente 123 (77%) dos

160 tumores que foram classificados como BS através da expressão gênica eram TN pela imunoistoquímica, indicando que nem todos BS são TN (53).

Em outros estudos, Morris *et al.* (54) (33) e Rakha *et al.* (33) mostraram resultados semelhantes, concluindo que os tumores TN não formam um grupo homogêneo após analisarem sua expressão gênica. Ao contrário, acreditam que o subtipo BS forma um grupo homogêneo de tumores com prognóstico e resposta a terapias desfavoráveis (33, 54). Ainda, Cheang *et al.* (55) concluíram que o mau prognóstico dos tumores TN seria relacionado àqueles com subtipo BS (55).

Numerosos estudos, de fato, relataram baixos índices de sobrevida livre de doença no subtipo BS (9, 38, 54, 56).

No momento do diagnóstico, tumores BS apresentam características adversas como alto grau nuclear, características histológicas desfavoráveis, como alto grau mitótico e pouca diferenciação (56).

Apesar dos tumores TN e BS não serem a mesma entidade, existe uma sobreposição entre elas (Figura 3).

Figura 3: Triplo-negativo x Basal-símile

Fonte: Carey et al., The Oncologist 2011;16(suppl 1):71–78

Até o momento, o termo TN é utilizado em muitas publicações, porém, ainda não existe um padrão ouro para identificar os tumores BS através da expressão gênica, embora métodos de análise genética como Mammaprint e PAM50 têm sido utilizados clinicamente (57).

3.4 Subtipos moleculares do câncer de mama triplo-negativo

Numerosos métodos têm sido utilizados para subclassificar os tumores TN. São classificações através da histologia e pela expressão gênica.

3.4.1 Classificação histológica

Tumores que apresentam o fenótipo TN incluem diversos tipos histológicos. Na maioria dos casos (>80%) dos tumores TN são carcinomas de tipo histológico não especial ou ductais invasivos. Outros tipos histológicos raros estão presentes, como: carcinomas metaplásicos, apresentando fenótipo mesenquimal; carcinoma medulares, apresentando um extenso infiltrado linfoplasmocitário; carcinomas apócrinos e adenoide cístico. Essas variações histológicas contribuem para heterogeneidade do grupo (8).

3.4.2 Classificação baseada na expressão gênica

Lehmann *et al.* em 2011, realizaram uma metanálise com 21 bancos de dados públicos de expressão gênica e identificaram mais de 500 carcinomas TN. Após sua análise, identificaram 6 subgrupos distintos denominados: BS1 (Basal-símile 1), BS2 (Basal-símile 2), imunomodulador (IM), mesenquimal (M), mesenquimal células tronco (MSL) e luminal androgênico (LAR). A maioria dos cânceres de mama com mutação do BRCA1 foi encontrada nos subtipos BS1 e BS2 (57).

A assinatura genética relacionada ao subgrupo IM apresenta um grupo de genes de sinalização imune associados com câncer de mama medular (53, 57). Os subgrupos M e MSL se sobrepõem ao grupo das claudinas baixas e são associados aos tumores metaplásicos (58, 59). Da mesma forma o subgrupo LAR esta relacionado ao grupo molecular e histológico apócrino (8, 60) (Figura 4). Liu *et al.* em 2016, através da análise do

transcriptoma de RNA mensageiro e RNA não codificante em microarranjos de 165 amostras de TN, classificou em 4 subgrupos, sendo: imunomodulador, luminal receptor de androgênio, mesenquimal-símile e subgrupo basal-símile imunossuprimido (61).

A mutação do p53 está presente em 60-70% dos tumores TN, principalmente truncagens e deleções além da mutação do PIK3CA em 11% dos casos (42).

Figura 4 - Classificação genética dos tumores TN segundo Lehmann et al. (2011).

3.5 Marcadores imunoistoquímicos

3.5.1 Citoqueratinas basais 5/6 e 14

Os carcinomas de tipo BS, conforme descrito anteriormente, são neoplasias que não expressam receptores hormonais, nem a proteína

do oncogene HER2, sendo por isso frequentemente referidos como tumores TN (37). Por outro lado, expressam citoqueratinas (CKs) basais (CK5/6, CK14 e CK17), de forma semelhante ao que se observa nas células mioepiteliais da mama normal. Atualmente não há consenso internacional determinando quais marcadores imunoistoquímicos devem ser empregados para melhor identificar os tumores do tipo basal. Entretanto, a maioria dos autores define carcinomas de fenótipo basal como tumores negativos para RE, RP e HER2, que expressam pelo menos uma das citoqueratinas basais (CK5, CK14 ou CK17) e/ou EGFR (62).

3.5.2 Citoqueratinas luminais 8 e 18

As citoqueratinas 8 e 18 são filamentos intermediários presentes em células epiteliais mamárias com diferenciação luminal, embora tumores TN possam expressar essas moléculas (63). Livasy *et al.* quando da definição de marcadores imunoistoquímicos associados a fenótipo basal-símile, encontraram positividade dessas CK luminais 8/18 em 83,3% dos casos (63). Em estudo multicêntrico de fase II que avaliou a combinação do panitumumabe com quimioterapia em 47 casos de tumores TN, os autores observaram que a resposta patológica completa esteve relacionada à alta expressão de EGFR associada à baixa expressão de CK 8/18 (64).

3.5.3 Receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR ou HER1)

O receptor de fator de crescimento epidermal (EGFR) é um receptor tirosino quinase denominado também como HER1. Outros membros dessa

família são o HER2, HER3 e HER4. A interação entre esses 4 receptores e seus vários ligantes regula e modula o crescimento e a sobrevivência celular (65). Existem numerosos estudos científicos avaliando o impacto biológico desse receptor no câncer de mama. Estudos imunoistoquímicos revelaram uma alta taxa de expressão do EGFR em tumores TN (66) (9). Em estudo retrospectivo recente, 57% dos tumores BS apresentam superexpressão do EGFR, enquanto que no grupo não BS, apenas 8% (9). Nieto *et al.* relacionaram a expressão desses receptores com pior sobrevida livre de doença em tumores iniciais (67). A comparação entre os tumores TN, definidos como RE, RP e HER2 negativos com o grupo BS, definidos pela presença de EGFR e CK5/6 mostraram um pior prognóstico nesse segundo grupo, destacando o papel da expressão do EGFR (55). A hiperatividade desse receptor parece ainda estar relacionada com resposta menos favorável à quimioterapia, além de menor sobrevida global, indicando que sua presença poderia ser útil no processo de escolha do melhor esquema terapêutico (68).

3.5.4 Receptor de androgênio

O receptor de androgênio (RA) constitui um receptor de esteroide sexual, expresso em 90% do câncer de mama com RE-positivo e em 55% dos RE-negativos (36, 69). A expressão de RA em carcinomas RE-negativos está associada ao perfil molecular apócrino identificado geneticamente e caracterizado por ativação da via de sinalização androgênica (60). As características histológicas dos carcinomas RE-negativos e RA-positivos têm

sido definidas, observando-se associação com padrão apócrino, frequente expressão de HER2, menor atividade proliferativa e, particularmente no grupo dos tumores TN, menor expressão de p53 (18, 70, 71).

Alguns estudos recentes têm restabelecido ao RA como um potencial alvo para o tratamento do câncer, especialmente nos casos de pacientes com tumores TN e doença avançada. Atualmente alguns estudos clínicos têm testado bloqueadores do RA com resultados promissores (72, 73). Gucalp *et al.* realizaram um estudo clínico no qual pacientes com RE/RP negativos e RA positivos receberam o antagonista de RA (bicalutamida) na dose de 150 mg/dia. De 424 pacientes RE/RP negativos, 12% apresentavam RA positivos. Como conclusão, houve benefício na utilização do bloqueador de RA demonstrado através da taxa de benefício clínico que se refere a pacientes com resposta completa, parcial ou doença estável pelo período maior que 6 meses (73).

3.5.5 Sistema E-caderina-cateninas

O sistema de moléculas de adesão, composto pelas e-caderina e cateninas, tem função de estabilizador morfológico de células epiteliais, atuando de forma complexa como responsável pela integridade e estabilidade celular e envolvimento com vias de sinalização intracelular, como, por exemplo, a via por Wnt (74). A via Wnt é dependente da beta-catenina e tem sido explorada para potenciais alvos terapêuticos. Uma característica básica da célula tumoral é a perda da adesão entre as células, ocupando também um papel importante no processo de formação de

metástases (74). Tem papel importante nos mecanismos de invasão em associação com outros membros da família das caderinas, envolvendo diversas linhas de sinalização (75). As e-caderinas têm uma estrutura transmembrana glicoproteica com três domínios distintos: intracitoplasmático, transmembrana e extracelular. A transição epitélio-mesênquima é facilitada pela perda da expressão das e-caderinas, tanto por amplificação como mutação de seus inibidores. Os fatores de transcrição como *Snail*, *Slug*, *Zeb*, *Twist* e *E12/47* estão envolvidos (76).

3.5.6 Claudinas

Recentemente estudos genômicos identificaram um novo subgrupo molecular de câncer de mama TN: os das claudinas baixas. São caracterizados pela baixa expressão dos genes das claudinas (58).

As claudinas são as principais proteínas transmembrana das *tight junctions*. Vários estudos têm demonstrado que mudanças na sua expressão estão presentes em algumas neoplasias, coincidindo com mudanças na iniciação e progressão de tumores sólidos (58).

No câncer de mama, várias claudinas têm sido estudadas. Dessas, a claudina 1 tem sido relacionada com invasão e metástases ao passo que as claudinas 3 e 4, com a diferenciação celular (77, 78). A maioria dos tumores claudina baixa são carcinomas ductais triplo negativo com mau prognóstico (58).

3.5.7 Vimentina

A transição epitélio-mesênquima (EMT) é definida como a perda das características epiteliais e aquisição do fenótipo mesenquimal. A EMT é fundamental no processo no qual as células epiteliais perdem suas características e têm sua polaridade alterada, adquirindo o fenótipo mesenquimal. Esse processo pode ter papel importante no processo de invasão e formação de metástases (79-81).

A EMT corresponde a fenômeno transitório, geneticamente determinado, em que ocorre mudança do fenótipo epitelial para mesenquimal, caracterizada pela perda de moléculas de adesão (E-caderina), *down-regulation* de marcadores epiteliais (citoqueratinas) e *up-regulation* de marcadores mesenquimais (vimentina). Alguns estudos correlacionam a EMT com fenótipo TN e alto grau histológico (82, 83), além do perfil BS. Atualmente a vimentina é considerada um importante marcador da EMT (81). Aumento na sua expressão tem sido relacionado com vários tipos de tumores, como câncer de mama, próstata, endométrio, melanoma e tumores gastrointestinais (84).

A expressão da vimentina parece estar relacionada com tumores de mau prognóstico e poderá servir como biomarcador (85).

3.5.8 Actina de músculo liso

Actina de músculo liso é uma proteína codificada pelo gene *ACTA2* localizado no cromossomo *10q22-q24*. AML é um marcador de diferenciação de músculo liso presente em células mioepiteliais normais e que se expressa

em carcinomas BS com diferenciação mioepitelial. Não é um marcador específico, pois células que tenham forte expressão para actina, por exemplo, miofibroblastos e vasos sanguíneos, podem ser positivas para AML. Esse fato pode se tornar um problema quando temos uma lesão próxima a vasos e miofibroblatos. Uma armadilha pode ser a presença de miofibroblastos dentro de estroma desmoplásico próximo a áreas de carcinoma invasivo, podendo ser confundidos com células mioepiteliais, levando a um resultado falso negativo (86) .

3.5.9 p63

O *p63* é um membro da família do *p53*, localizado no cromossomo 3q27. Esse gene é fundamental na manutenção da população de células-tronco em diversos tecidos epiteliais e necessário para o desenvolvimento normal da glândula mamaria (87, 88). O *p63* é expresso nas células epiteliais basais de vários órgãos como por exemplo: colo uterino, pele e próstata. Também é expresso no núcleo de células mioepiteliais dos ductos e lóbulos mamários normais (87, 88). Reis-Filho et al., descreveram, além do *p63*, outros marcadores mioepiteliais nos carcinomas metaplásicos da mama, sugerindo que esses tumores compartilham uma diferenciação celular mioepitelial (89). A expressão desse marcador nos tumores invasivos e mesenquimais de mama não foi completamente caracterizada. Porém, devido a especificidade do *p63* pela célula mioepitelial na mama, além da possível diferenciação mioepitelial dos carcinomas metaplásicos fusocelulares, Koker *et al.* defendem a utilização do *p63* como marcador na

diferenciação dos carcinomas metaplásicos fusocelulares e outras neoplasias mesenquimais (90).

3.5.10 ADLH1

Conforme descrito anteriormente, o câncer de mama apresenta uma grande variação na resposta ao tratamento, mesmo dentro de subgrupos semelhantes (36). Alguns estudos têm sugerido que essa variação ao tratamento, além da resistência à terapia, pode ser devido às células-tronco do câncer. Existem evidências que o câncer de mama se origina a partir de células tronco tumorais e esse fator pode contribuir nos casos de metástases e resistência aos quimioterápicos (91, 92). Foram caracterizados dois principais marcadores, as CD44+/CD24- e o ADLH1A1 (aldeído dehidrogenase 1 A1) (93). Ginestier *et al.* concluíram em seu estudo que o ALDH1A1 parece ser o melhor marcador (94). A expressão desse marcador está relacionada a alto grau histológico, receptores de estrogênio e progesterona negativos e HER2 positivo, ou seja, tumores de mau prognóstico (95).

O ALDH1 faz parte de uma família de enzimas e uma de suas principais funções é converter a vitamina A (retinol) em ácido retinoico, participa também no metabolismo do álcool (96). Estudos ainda demonstraram que a alta expressão desse marcador no tumor pode levar a resistência do câncer à quimioterapia, particularmente, a ciclofosfamida (97, 98). Apesar de existirem várias linhas de pesquisa em relação ao ALDH1A1, pouco se sabe a respeito do significado prognóstico desse marcador nos

subgrupos do câncer de mama ou mesmo a resposta à quimioterapia e radioterapia.

3.5.11 Índice de Proliferação Ki 67

O Ki-67 é uma proteína nuclear associada à proliferação celular e foi originalmente identificada por Gerdes *et al.* em 1983, que utilizaram em seu estudo, células de linhagem do linfoma de Hodgkin (99). O método de análise mais comum do Ki-67 é o imunoistoquímico. É sabido que o antígeno nuclear do ki-67 é expresso nas fases do ciclo celular S, G1, G2 e M, mas não expresso na fase G0 (100, 101). Através da imunoistoquímica, anticorpos monoclonais anti Ki-67 como o MIB-1 são usados para avaliar a fração de crescimento da população de células neoplásicas. Devido à variação que pode existir entre laboratórios e falta de procedimentos padrão, existe dificuldade na padronização dos valores de corte (102, 103).

Duas grandes metanálises mostraram o valor prognóstico do Ki-67 nos estágios iniciais do câncer de mama. Azambuja *et al.* relataram que a positividade do Ki-67 estava associada a maior risco de recidiva, tanto no grupo com linfonodo negativo quanto positivo (104). Outra metanálise com 43 estudos e 15790 pacientes correlacionaram a positividade do Ki-67 com piora na sobrevida livre de doença e sobrevida global (105). O papel prognóstico do Ki-67 é controverso. Muitos estudos que incluem populações heterogêneas, são retrospectivos e utilizam diferentes métodos de avaliação, além do fato de não existir padronização nos seus valores (106). Devido ao fato de se tratar de uma variável contínua, o que dificulta a

criação de limites nos seus valores, associado à dificuldade de padronizar sua análise, limita sua utilização na prática clínica (107).

3.6 O papel do infiltrado linfocitário

A perda da imunidade do hospedeiro tem sido muito correlacionada ao crescimento e progressão do câncer (108). A presença de linfócitos, infiltrando tumor (TILs) tem sido descrita há décadas e atualmente, em alguns estudos, correlacionada a bom prognóstico (109, 110). *Loi et al.* mostraram em estudo clínico prospectivo (BIG 02-98) com utilização de 2000 amostras de câncer de mama, que quanto maior a presença de TILs no estroma, melhor o prognóstico, mas somente no subgrupo TN. Além disso, postulou que regimes de quimioterapia com altas doses de antracíclicos poderiam promover uma imunidade anti-tumoral (111). Os TILs são mais frequentes nos tumores com alta proliferação, como por exemplo nos TN e HER2 positivos. Sua presença está associada à resposta patológica à quimioterapia neoadjuvante, melhor sobrevida livre de doença, além de maior sobrevida global (110, 111). Recentes estudos fase III como ECOG 2197 e ECOG 1199 tentam validar o impacto prognóstico do TILs nos tumores TN e sugerem a necessidade de estratificar esses achados (112). O câncer de mama com predomínio de infiltrado linfocitário tumoral (*LPBC-Lymphocyte-Predominant Breast Cancer*), corresponde a tumores com pelo menos 50 a 60% de TILs e que apresentam mais linfócitos que células tumorais (113). O grupo internacional de trabalho TILs criou uma metodologia padronizada para avaliar TILs no câncer de mama (113). Esses

critérios foram aplicados em uma coorte de 897 pacientes com TN do Instituto Europeu de Oncologia (114). Os autores relataram que pacientes com LPBC tiveram uma melhor sobrevida livre de doença, sobrevida livre de doença a distância e melhor sobrevida global. Além disso, observaram que a cada 10% de aumento de TILs pôde fortemente predizer melhor sobrevida, independente de outras variáveis prognósticas.

3.7 Tratamento sistêmico

Como não dispomos até o momento de terapia-alvo para os tumores TN, a única opção acaba sendo a quimioterapia. Diversas novas terapias sistêmicas têm sido estudadas, como por exemplo: terapias-alvo moleculares, terapias-alvo para o citoesqueleto, controle da migração celular, imunoterapia e vacinas, porém, todas ainda em fase de investigação.

Análises retrospectivas de um estudo clínico mostraram que a falta de receptores hormonais é preditiva para ótima resposta à quimioterapia quando comparado com o grupo RE positivo (115, 116). Vários estudos de quimioterapia neoadjuvante em pacientes com TN mostraram que a presença de resposta patológica completa (pCR) pode ser usada como marcador de maior sobrevida e maior tempo de sobrevida livre de doença (117). Von Minckwitz *et al.* Avaliaram 6377 pacientes com câncer de mama operáveis ou localmente avançado sem metástases, que receberam quimioterapia neoadjuvante com antracíclicos e taxanos com ou sem trastuzumabe. A conclusão do estudo foi que a pCR pode funcionar como

marcador de sobrevida nos grupos luminal B HER2 negativo, HER2 positivos e TN, porém , não para os grupos luminal A e luminal B H 2 positivos (118). Liedtke *et al.* estudaram 1118 pacientes com câncer de mama submetidas à quimioterapia neoadjuvante e concluíram que a taxa de pCR é maior no grupo TN quando comparada com o grupo não TN (22 versus 11%; $p=0.034$)(119). A resposta ao tratamento neoadjuvante nas pacientes TN pode ser bastante rápida, mesmo somente após 2 ciclos de quimioterapia (120). Não existem evidências que mostrem vantagens com quaisquer tipos de esquemas quimioterápicos de acordo com o tipo histológico (121). Atualmente o tratamento padrão para o câncer de mama é baseado na utilização de esquemas com antracíclicos e taxanos, sendo muito eficazes no grupo TN (122). Alguns autores demonstraram que tumores BS parecem ter uma resposta pior ao uso de antracíclicos quando comparados a outros subtipos (123). Inversamente, os tumores BS apresentam uma resposta melhor à terapia com taxanos quando comparado com os outros subtipos (123) .

Os tumores TN apresentam uma associação muito forte com a mutação do *BRCA1*. Células com esse tipo de mutação têm uma deficiência nos mecanismos de reparo do DNA tendo, portanto, uma sensibilidade maior aos agentes com platina (cisplatina, carboplatina) (122, 124). A falta do mecanismo de reparo do DNA nas pacientes *BRCA1* mutadas levam à apoptose celular. Alguns estudos mostraram que a adição de cisplatina nas quimioterapias neoadjuvantes no grupo de pacientes mutadas levou a uma taxa alta de pCR (72 a 90%). Porém, esses estudos apresentam pequeno

número de casos e são retrospectivos (125, 126).

Portanto, os tratamentos neoadjuvantes no TN podem ser usados como ferramenta para testarmos novos esquemas e novas drogas e a pCR acaba sendo um importante marcador para avaliar a sobrevida global. Até o momento, não existe um esquema de tratamento neoadjuvante ou adjuvante ideal para os tumores TN e novas drogas e outras combinações estão sendo testadas (127).

3.8 Terapias-alvo

Diversos estudos utilizando tecnologia molecular têm sido realizados com o objetivo de descobrir um tratamento mais racional para os tumores TN de acordo com as características moleculares de cada tumor. Algumas vias moleculares têm sido alvo nesse grupo como: fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), poli(ADP-ribose) polimerase (PARP), fator de crescimento epidermal (EGFR ou HER1), rapamicina alvo mamífero(mTOR), oncogene Src, histona deacetilase(HDAC) e receptor de androgênio. Faltam ainda biomarcadores para essas moléculas.

As proteínas superexpressas através da imunoistoquímica nos tumores TN como EGFR, CK5/6, CK14/17, p53, p15 e ciclina E estão associadas com sobrevida curta (55).

3.8.1 Inibidores do VEGF

Os tumores TN possuem alta taxa de proliferação, portanto, necessitam de intensa angiogênese no seu processo de crescimento. A

adição do anticorpo monoclonal anti-VEGF (bevacizumab) aos esquemas de quimioterapia em pacientes metastáticas mostrou ganho de sobrevida livre de progressão em estudos randomizados fase III (128, 129). No estudo trial RIBBON-1, houve benefício da adição do bevacizumabe nos esquemas de quimioterapia com capecitabina ou antraciclicos/taxanos nas pacientes TN (128). No estudo trial RIBBON-2, vários esquemas de quimioterapia foram testados com ou sem adição do bevacizumabe no tratamento de segunda linha de pacientes metastáticas. Nas pacientes TN houve um aumento significativo na sobrevida livre de progressão com a adição do bevacizumabe (média 6 versus 2,7 meses) com tendência a ganho de sobrevida global (130).

3.8.2 Inibidores da PARP

As PARPs correspondem a uma família de enzimas multifuncionais, sendo a PARP1 a mais abundante. Fazem parte do mecanismo de reparo da fita do DNA. Inibidores da enzima da PARP surgiram como possível tratamento para os tumores TN sem mutação do *BRCA1*, grupo esse que apresentou benefício (131). Atualmente vários estudos clínicos estão avaliando a combinação entre inibidores da PARP e quimioterápicos em pacientes não mutadas (NCT01149083).

3.8.3 Epotilonas

Epotilonas são agentes que agem nos microtúbulos e interferem na divisão celular. Em alguns estudos, esse grupo de drogas parece ter uma

eficácia maior que os taxanos e ainda com menos efeitos colaterais (132). Em estudo clínico neoadjuvante, ixabepilone tem mostrado aumento na pCR em pacientes ER-/EP- quando comparados com o grupo de receptores hormonais positivos (133).

3.8.4 Inibidores do EGFR

Um grande número de tumores TN superexpressão o EGFR e sua presença é considerada um fator de mau prognóstico (55). A utilização do anticorpo monoclonal cetuximabe em conjunto com a carboplatina tem mostrado resultados positivos em pacientes TN (134). Gefitinib, um inibidor da molécula menor da tirosina quinase(TKIs) tem mostrado mínima atividade em pacientes com doença metastática (135). Permanece desconhecido se a utilização dos TKIs apresenta algum benefício na terapia dos tumores TN (136). Entretanto, o uso de erlotinib e gefitinib em conjunto com docetaxel ou carboplatina nos TN tem mostrado algum tipo de benefício em estudos clínicos (137).

3.9 Aspectos epidemiológicos dos tumores triplo-negativos

No estudo de câncer de mama Carolina (1993-1996) foi determinada a distribuição dos subtipos do câncer de mama numa determinada população. Os tumores BS foram mais prevalentes nas mulheres afro-americanas na pré-menopausa (39%), enquanto a prevalência nas pós-menopausadas foi de 14%. O mau prognóstico do câncer de mama nas mulheres jovens de origem afro-americanas pode ter ocorrido devido à alta

prevalência de tumores BS e à baixa prevalência de tumores luminal A.(56). Bauer *et al.* Identificaram 6370 mulheres com câncer de mama TN numa população da Califórnia e comparou com outras 44704 portadoras de outros subtipos de câncer de mama em relação à raça/etnicidade , status socioeconômico, estadiamento, grau tumoral e sobrevida relativa. O estudo concluiu que os tumores TN foram mais prevalentes nas mulheres abaixo dos 40 anos e em negros não hispânicos. O TN apresentou a pior sobrevida em 5 anos nesses grupos (138). Um estudo comparando mulheres com câncer de mama TN nos Estados Unidos e em Gana concluiu que no país africano houve uma prevalência maior(82%), seguido pelas afro-americanas e em menor número nas caucasianas (139). Sullivan *et al.* compararam mulheres com tumores TN afro-americanas (n=94) com caucasianas (n=68). Estudaram as características clínico-patológicas, sobrevida global e sobrevida livre de doença. O câncer de mama TN das afro-americanas foi mais agressivo com tendência a maior comprometimento linfonodal, além de sobrevida global e sobrevida livre de doença menor (24). Carvalho *et al.* em estudo observacional retrospectivo compararam a distribuição dos subtipos do câncer de mama em 5 regiões do Brasil. Concluíram que os subtipos mais agressivos com HER2+ e TN são mais prevalentes na região norte do país. Fatores como influência de ancestrais africanos, questões socioeconômicas, climáticas e nutricionais podem estar envolvidos nessa distribuição (140).

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Aprovação institucional

O projeto foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) (Anexo1).

4.2 Pacientes

Selecionamos amostras de tecido de carcinoma mamário triplo-negativo a partir de banco de dados de estudo prévio, onde havíamos avaliado a distribuição dos subtipos moleculares de carcinoma mamário baseado no perfil imunoistoquímico em 5.687 pacientes consecutivas, encaminhadas para realização do perfil imunoistoquímico prognóstico e preditivo, no período de julho/2009 a março/2011, provenientes das cinco regiões geográficas (140).

Em nosso estudo anterior, os carcinomas triplo-negativos corresponderam a 15,7% dos casos (894/5.687) de todos os carcinomas e a 19,5% (271/1.386) entre as mulheres de até 45 anos. Selecionamos os últimos 130 casos consecutivos do período de estudo e estabelecemos os seguintes critérios de inclusão: idade até 45 anos, carcinoma invasivo, blocos de parafina disponíveis e perfil imunoistoquímico triplo-negativo. Excluímos 12 casos que não tinham blocos de parafina disponíveis ou com amostras inadequadas para análise, restando 118 pacientes para o estudo atual (Figura 5).

Figura 5 - Seleção de pacientes

4.3 Estudo anatomopatológico

Os casos selecionados foram revisados pela mesma patologista (FMC) para uniformização da classificação histológica, segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (141) e da graduação histológica, segundo critérios de Elston e Ellis (142).

Na revisão dos preparados histológicos foi selecionada uma área representativa do tumor com sinais de boa preservação do tecido,

caracterizados por boa coloração e ausência de artefatos técnicos. Sempre que possível, foi dado a preferência para a área do tumor mais próxima da interface com o tecido mamário circunjacente. Essa foi a área marcada para construção de bloco pela técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais, também denominadas de microarranjos de tecido (TMA) e estudo imunoistoquímico.

As seguintes características histológicas foram examinadas nos cortes no interior do tumor:

- Componente “in situ”: Avaliado como ausente (0), presente em <25% do volume da área total da neoplasia (1), presente entre 25% e 50% da área tumoral (2) ou presente em >50% da neoplasia (3).
- Embolização vascular peritumoral: Foi avaliada no tecido mamário circunjacente ao tumor e classificada como não identificada (0), presente em área focal (1) ou presente multifocal (2) (Figura 6).
- Contornos do tumor: Nos casos em que havia representação suficiente das bordas do tumor nos cortes histológicos, os contornos foram classificados como circunscritos (C), parcialmente circunscritos (P) (Figura 7) ou infiltrativos (I).

Figura 6 - Embolização linfática peritumoral (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).

Figura 7- Contorno tumoral parcialmente circunscrito (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 40x).

No estroma intratumoral foram avaliadas a desmoplasia, hialinização e infiltração linfocitária. A desmoplasia, correspondente à fibroplasia com participação de fibroblastos e miofibroblastos, geralmente associados a certo edema, foi classificada como ausente (0), discreta (1), moderada (2) ou intensa (3). A presença de hialinização estromal intratumoral, caracterizada pela presença de tecido pouco celular ou mesmo acelular substituído por substância hialina do tipo colágeno (Figura 8), foi classificada como ausente (0), focal e discreta (1), moderada (2) ou intensa (3). A infiltração linfocitária intratumoral foi categorizada como ausente (0) (Figura 9), discreta com focos periféricos (1), moderada (significativa, porém distribuída irregularmente na periferia, ou

difusa, porém em quantidade moderada, inferior a 60% das células estromais (2) (Figura 10), ou intensa (difusamente distribuída, correspondente a >60% das células do estroma) (3) (Figura 11). Com base na recomendação de Salgado *et al.* (113), classificamos os casos em dois grupos quanto à presença dos linfócitos intratumorais: rico em linfócitos (>50% de linfócitos no estroma intratumoral) e pobre em linfócitos (demais casos)

A presença de necrose tumoral (Figura 12) foi categorizada como ausente (0), focal (<10%) (1), moderada (10-50%) (2) ou intensa (>50%) (3).

A formação de túbulos ou glândulas pela neoplasia foi classificada como ausente (0) (figura 13), discreta (<10%) (1), moderada (10-50%) (2) ou intensa (>50%) (3) (figura 14).

Figura 8 - Hialinização estromal intratumoral (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).

Figura 9 - Infiltração linfocitária intratumoral ausente (hematoxilina-eosina - aumento microscópico original 100x).

Figura 10 - Infiltração linfocitária intratumoral moderada (hematoxilina-eosina - aumento microscópico original 100x).

Figura 11 - Infiltração linfocitária intratumoral intensa (aumento microscópico original 200x).

Figura 12 - Necrose tumoral (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).

Figura 13 - Formação de túbulos ausente (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).

Figura 14 - Formação de túbulos Intensa (hematoxilina-eosina-aumento microscópico original 200x).

4.4 Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA)

Os TMAs foram construídos com fragmentos cilíndricos da amostra do tumor com 2,0 mm de diâmetro montados em bloco receptor com intervalo de 1,0 mm entre as amostras, usando instrumento de precisão da marca Beecher Instruments (Silver Spring, MD). As amostras foram alinhadas em linhas e colunas, tendo como referência na posição 1A, a amostra de tecido hepático. Após a configuração final, os blocos foram aquecidos a 60°C por 10 minutos e selados com *Paraffin Tape-Transfer System* (Instrumedics, St. Louis, MO). Cortes histológicos com 3µm de espessura foram realizados com micrótomo

manual Leica (Leica Instruments, Wetzlar, Germany). As primeiras secções foram coradas pela hematoxilina-eosina e examinadas para verificação de possíveis perdas e necessidade de repetir a inclusão.

4.5 Método do exame imunoistoquímico

Todos os casos selecionados para o estudo haviam sido submetidos à pesquisa de receptores de estrogênio e progesterona e da oncoproteína HER2 realizados no mesmo laboratório Consultoria em Patologia, Botucatu, SP, com a mesma metodologia e pela mesma equipe. Para o receptor de estrogênio, utilizamos o clone SP1 de coelho (Neomarkers, Fremont, CA, EUA) na diluição de 1:1000. Para o receptor de progesterona, utilizamos o clone PgR 636 de coelho (Dako, Carpinteria, EUA) na diluição de 1:600. Para HER2, utilizamos o clone SP3 de coelho (1:300). A recuperação antigênica foi em panela de pressão para todos os casos.

As lâminas de TMA foram submetidas às reações imunoistoquímicas com sistema de detecção Envision FLEX (DAKO). Os marcadores estão listados na tabela 1, com seus clones, diluição e método de recuperação antigênica.

Tabela1 - Especificações dos anticorpos primários utilizados

Marcador	Clone	Marca	Diluição	Ph da Recuperação Antigênica	Tempo de Recuperação Antigênica
KI-67	MIB	Dako (Glostrup Denmark)	1:500	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
RA	F39.4.1	BIOGenex (Fremont, USA)	1:100	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
CK 5/6	D5/16B4	Dako (Glostrup Denmark)	1:04	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
EGFR	31G7	ZYMED (South San Francisco)	1:100	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
CK 8/18	B22.1 & B23.1	Cell Marque (Rocklin, CA USA)	1:1000	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
p16	G175-405	Zeta Corporation, Arcadia, CA USA	1:50	Tris-EDTA pH 9.0;	20 min a 97°C
e-caderina	EP700Y	Cell Marque (Rocklin, CA USA)	1:1200	Tris-EDTA pH 9.0	40 min a 97°C
Catenina-beta	14	Cell Marque (Rocklin, CA USA)	1:1000	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
Claudina 3	Polyclonal rabbit	Thermo Scientific (Rockford,US A)	1:2400	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
Claudina 4	Polyclonal mouse	Thermo Scientific (Rockford,US A)	1:18000	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
Claudina 7	Polyclonal rabbit	Thermo Scientific (Rockford,US A)	1:800	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
Vimentina	V9	Dako (Glostrup Denmark)	1:200	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
Actina de músculo liso	1A4	Dako (Glostrup Denmark)	1:600	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C
p63	EP174	Bio SB (Santa Barbara, CA USA)	1:2000	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
ALDH1	44	Cell Marque (Rocklin, CA USA)	1:2000	Tris-EDTA pH 9.0	20 min a 97°C
CK14	SP53	Cell Marque (Rocklin, CA USA)	1:1000	Citrato pH 6.1	20 min a 97°C

4.6 Interpretação imunoistoquímica

A expressão imunoistoquímica foi interpretada como positiva no padrão citoplasmático para citoqueratinas, vimentina, actina de músculo liso, calponina e ALDH1; padrão membrana para claudinas, caderina (Figura 15), catenina-beta (Figura 16) e EGFR; padrão nuclear para p63, Ki-67 e receptor de androgênio e padrões nuclear e/ou citoplasmático para p16 (Figura 17).

Figura 15 - Expressão tumoral de e-caderina, padrão membrana, difuso (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 16 - Expressão tumoral de catenina-beta, padrão membrana, difuso (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 17 – Expressão tumoral de p16 (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Para a avaliação da expressão de claudinas, utilizamos os critérios de classificação descritos por Kolokytha *et al.*(143): 0: negativo ou coloração inespecífica em <10% das células; 1+:fraca e incompleta em >10% das células; 2+: moderada e completa em >10% das células, e 3+: forte e completa em > 10% das células. Os escores 0 e 1+ foram considerados negativos, e 2+ ou 3+, positivos (Figuras 18-20). Esses mesmos critérios foram aplicados para o EGFR, e-caderina e catenina-beta.

Figura 18 - Expressão tumoral de claudina 3, padrão membrana (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 19 – Expressão tumoral de claudina 4, padrão membrana (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 20 - Expressão tumoral de claudina 7, padrão membrana (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Qualquer positividade de vimentina em células neoplásicas foi considerada resultado positivo, conforme defendido por Yamashita *et al.* (19). O mesmo critério foi aplicado para a expressão de p63, actina de músculo liso e p16.

A expressão de ALDH1 foi feita em células neoplásicas (Figura 21) e no estroma (Figura 22) e classificada como negativa (0), positiva em <10% (1), positiva em 10 a 50% (2) e positiva em >50% das células (3), conforme descrito por Khoury *et al.* (22). Os mesmos critérios foram utilizados para a expressão das citoqueratinas (Figura 23). Para análise estatística, os escores 1, 2 e 3 nas células neoplásicas foram considerados positivos (144).

Figura 21 - Expressão de ALDH1 em células neoplásicas (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x)

Figura 22 - Expressão de ALDH1 em células estromais e negativa nas células neoplásicas (imunoistoquímica – aumento microscópico original 100x).

Figura 23 - Expressão tumoral de citoqueratinas (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

A expressão de Ki-67 foi feita em porcentagem de células positivas após contagem de pelo menos 500 células em áreas de maior densidade de positividade. Esta leitura foi realizada em cortes inteiros do tumor (Figura 24) (Figura 25).

Figura 24 – Neoplasia com baixa atividade proliferativa mostrando marcação nuclear em células neoplásicas para Ki 67 de 10% (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 25 – Neoplasia com alta atividade proliferativa marcação nuclear em células neoplásicas para Ki 67 de 95% (imunoistoquímica – aumento microscópico original 400x).

De acordo com a expressão dos marcadores, definimos os seguintes grupos de tumores:

- Basal: Expressão de citoqueratinas basais (5/6 e/ou 14) (Figura 26) e/ou EGFR-positivo (Figura 27)
- Claudina-baixa: Pelo menos uma das claudinas negativa
- Mesenquimal: vimentina-positivo (Figura 28)
- Apócrino: receptor de androgênio-positivo (Figura 29)
- Mioepitelial: p63 ou actina de músculo liso (Figura 30) (Figura 31)

- Perfil de células tronco: ALDH1 positivo

Figura 26 - Marcação citoplasmática em células neoplásicas para CK5 (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 27 - Marcação de membrana em células neoplásicas para EGFR (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 28 - Expressão tumoral difusa de vimentina (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 29 – Carcinoma de tipo apócrino. Receptor de androgênio difusamente positivo nos núcleos das células neoplásicas (imunoistoquímica – aumento microscópico original 100x).

Figura 30 - Expressão tumoral de p63, padrão nuclear (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

Figura 31 - Expressão tumoral de actina de músculo liso em células neoplásicas esparsas. Note a difusa positividade em células estromais (imunoistoquímica – aumento microscópico original 200x).

4.7 Análise estatística

A idade das pacientes e as características histológicas dos tumores foram apresentadas de forma descritiva.

As comparações das distribuições da idade e da expressão de Ki-67 nas diferentes regiões geográficas foram feitas através do teste de Kruskal-Wallis de amostras independentes.

A comparação das médias de expressão do Ki-67 nos subgrupos moleculares determinados pelo perfil imunoistoquímico foi feita pelo teste de

ANOVA.

As comparações da distribuição da idade e da expressão de Ki-67 nos carcinomas quanto à infiltração linfocitária intratumoral foram realizadas com o teste U de Mann-Whitney de amostras independentes.

O teste do chi-quadrado de Pearson e/ou teste exato de Fisher foi/foram utilizado(s) para avaliação da associação das variáveis categóricas nos diferentes grupos.

O software utilizado para as análises estatísticas foi o IBM SPSS Statistics versão 22.0.

O valor de $p < 0,05$ foi considerado significativo.

5 RESULTADOS

A idade das pacientes incluídas no estudo variou de 26 anos a 45 anos (média $38,3 \pm 4,9$ e mediana 39 anos). Na tabela 2 está sumarizada sua distribuição nas cinco regiões geográficas. Não houve diferenças significativas nos grupos.

Tabela 2 – Distribuição da idade das pacientes com carcinomas mamários triplo-negativos de idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas

	Centro-oeste	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste
Número de pacientes	7	22	31	18	40
Faixa etária	34-44	28-45	26-45	31-42	27-45
Média de idade	$39,8 \pm 2,9$	$37,2 \pm 4,9$	$39,1 \pm 5,5$	$37,0 \pm 12,3$	$38,4 \pm 5,2$
Mediana	40	38	40	37	40

O tipo histológico mais frequente foi o carcinoma de tipo histológico não especial (107/118 casos; 90,7%). Os tipos histológicos medulares e metaplásicos foram identificados em 5 (4,2%) e 4 (3,4%) dos casos. Houve um carcinoma de tipo histológico lobular e um papilífero invasivo.

A distribuição dos tumores quanto ao grau histológico nas diferentes regiões geográficas pode ser observada na tabela 3. Observamos maior proporção de carcinomas de alto grau nas regiões nordeste, sul e sudeste. Ao compararmos os casos das regiões centro-oeste e norte com os das regiões nordeste, sul e sudeste, percebemos que a diferença é estatisticamente significativa ($p=0,03$).

Tabela 3 – Distribuição dos tumores quanto ao grau histológico nas diferentes regiões geográficas

Grau histológico	Centro-oeste	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste	Total
1 ou 2	4(57,1%)	10(45,5%)	9(30,0%)	2(11,1%)	11(27,5%)	36 (30,8%)
3	3(42,9%)	12(54,5%)	21 (70,0%)	16(88,9%)	29 (72,5%)	81 (69,2%)
Total	7	22	30	18	40	117

A presença de componente “in situ” foi identificada em 35/118 (29,7%) dos tumores e, destes 28/35 (80%) estava em fração inferior a 25%. A maioria dos carcinomas invasivos não apresentou componente “in situ” (83/118; 70,3%). A maioria dos carcinomas era totalmente sólido, sem nenhum arranjo tubular (96/118; 81,4%). Somente 23 (18,6%) casos mostraram alguma evidência de arranjo tubular pela neoplasia.

Os contornos do tumor puderam ser avaliados em 105 casos e eram circunscritos (19/105; 18,1%) ou parcialmente circunscritos (48/105; 45,7%) na maioria dos casos (57/105; 54,3%).

A presença de embolização vascular peritumoral pôde ser avaliada em 112 casos e foi identificada em 35/112 (31,2%) dos casos. Destes, 14/112 (12,5%) era focal e em 21/112 (18,8%), multifocal.

Necrose tumoral foi identificada em 78/118 (66,1%), inferior a 10% do tumor em 35 (29,7%) casos, entre 10 e 50% em 35 (29,7%) e em mais de 50% do volume tumoral em 8 (6,8%) casos.

As características do estroma intratumoral podem ser examinadas na tabela 4. Observamos que a infiltração linfocitária corresponde ao padrão mais frequente de reação estromal.

Tabela 4 - Características do estroma intratumoral em 118 casos de carcinoma mamário triplo-negativo em mulheres de até 45 anos

	ausente	discreta	moderada	intensa
desmoplasia	24 (20,7%)	46 (39,7%)	31 (26,7%)	15 (12,9%)
hialinização	71 (61,2%)	22 (19,0%)	17 (14,7%)	6 (5,2%)
Infiltração linfocitária	27 (23,3%)	18 (15,5%)	45 (38,8%)	26 (22,4%)

A expressão de Ki-67 variou de 5% a 95% (média $56,3 \pm 28,2$; mediana 65%) e sua distribuição nas diferentes regiões geográficas encontra-se na tabela 5. O gráfico 1 ilustra a distribuição dos casos.

Tabela 5 – Distribuição das médias de expressão do Ki-67 em carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas

	n	média±DP	Posto médio	Diferença (p<0,05) em relação à região
(1) Centro-oeste	7	$41 \pm 26,4$	39,6	(3)
(2) Norte	22	$45,7 \pm 31,2$	46,4	(3)
(3) Nordeste	31	$66,3 \pm 24,3$	71,5	(1)(2)
(4) Sul	18	$57,9 \pm 28,5$	61,2	
(5) Sudeste	40	$56,5 \pm 27,6$	60,1	

Gráfico 1 - Distribuição da porcentagem de expressão do Ki-67 em células neoplásicas de carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas

A expressão imunoistoquímica dos marcadores estudados nas diferentes regiões encontra-se na tabela 6. A expressão de citoqueratina luminal 8/18 foi observada em todos os casos, em 2 (1,7%) deles em menos do que 10% das células, em 3 (2,6%) em 10 a 50% das células neoplásicas, em 112 (95,7%) em mais de 50% das células. Nenhum dos marcadores utilizados mostrou

diferença na expressão entre as diferentes regiões geográficas.

Tabela 6 – Expressão imunoistoquímica em carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos nas cinco regiões geográficas

		Centro-oeste	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste	Total
CK 5/6	Positivo	4(57,1%)	12(57,1%)	17(56,7%)	13(76,5%)	21(53,8%)	67(58,8%)
	Negativo	3(42,9%)	9(42,9%)	13(43,3%)	4(23,5%)	18(46,2%)	47(41,2%)
	NA	0	1	1	1	1	4
CK 14	Positivo	2(28,6%)	11(52,4%)	11(35,5%)	10(58,8%)	21(52,5%)	55(47,4%)
	Negativo	5(71,4%)	10(47,6%)	20(64,5%)	7(41,2%)	19(47,5%)	61(52,6%)
	NA	0	1	0	1	0	2
EGFR	Positivo	3(42,9%)	12(54,5%)	20(64,5%)	9(50,0%)	18(45,0%)	62(52,5%)
	Negativo	4(57,1%)	10(45,5%)	11(35,5%)	9(50,0%)	22(55,0%)	56(47,5%)
	NA	0	0	0	0	0	0
RA	Positivo	1(16,7%)	1(4,5%)	4(12,9%)	0(0)	0(0)	6(5,2%)
	Negativo	5(83,3%)	21(95,5%)	27(87,1%)	17(100%)	39(100%)	109(94,8%)
	NA	1	0	0	0	1	2
Vimentina	Positivo	6(100%)	19(86,4%)	28(90,3%)	17(100%)	35(87,5%)	105(90,5%)
	Negativo	0(0)	3(13,6%)	3(9,7%)	0(0)	5(12,5%)	11(9,5%)
	NA	1	0	0	1	0	2
ALDH-1 em estroma	Positivo	6(85,7%)	20(95,2%)	29(93,5%)	16(94,1%)	36(90,0%)	107(92,2%)
	Negativo	1(14,3%)	1(4,8%)	2(6,5%)	1(5,9%)	4(10,0%)	9(7,8%)
ALDH-1 em epitélio	Positivo	1(16,7%)	2(9,1%)	5(16,7%)	3(17,6%)	10(25,0%)	21(18,3%)
	Negativo	5(83,3%)	20(90,9%)	25(83,3%)	14(82,4%)	30(75,0%)	94(81,7%)
Actina músculo liso	Positivo	1(14,3%)	5(22,7%)	8(25,8%)	7(43,8%)	15(37,5%)	36(31,0%)
	Negativo	6(85,7%)	17(77,3%)	23(74,2%)	9(56,3%)	25(62,5%)	80(69,0%)
p63	Positivo	0(0)	6(27,3%)	8(25,8%)	4(23,5%)	6(15,0%)	24(20,5%)
	Negativo	7(100%)	16(72,7%)	23(74,2%)	13(76,5%)	34(85,0%)	93(79,5%)
p16	Positivo	2(40,0%)	12(54,5%)	16(51,6%)	7(43,8%)	22(55,0%)	59 (51,8%)
	Negativo	3(60,0%)	10(45,5%)	15(48,4%)	9(56,3%)	18(45,0%)	55 (48,2%)
Claudina 3	Positivo	3(50,0%)	9(45,0%)	17(54,8%)	12(75,0%)	24(66,7%)	65(59,6%)
	Negativo	3(50,0%)	11(55,0%)	14(45,2%)	4(25,0%)	12(33,3%)	44(40,4 %)
Claudina 4	Positivo	4(66,7%)	15(75,0%)	23(76,7%)	14(87,5%)	35(97,2%)	91(84,3%)
	Negativo	2(33,3%)	5(25,0%)	7(23,3%)	2(12,5%)	1(2,8%)	17(15,7%)
Claudina 7	Positivo	5(83,3%)	16(80,0%)	27(87,1%)	15(93,8%)	30(83,3%)	93(85,3%)
	Negativo	1(16,7%)	4(20,0%)	4(12,9%)	1(6,2%)	6(16,7%)	16(14,7%)
	NA	1	2	0	2	4	9

Continuação tabela 6

		Centro-oeste	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste	Total
e-caderina	Positivo	5(100%)	17(77,3%)	19(63,3%)	12(66,7%)	30(76,9%)	83(72,8%)
	Negativo	0(0)	5(22,7%)	11(36,7%)	6(33,3%)	9(23,1%)	31(27,2%)
	NA	2	0	1	0	1	4
Catenina-beta	Positivo	6(100%)	17(89,5%)	26(83,9%)	18(100%)	33(84,6%)	100(88,5%)
	Negativo	0(0)	2(10,5%)	5(16,1%)	0(0)	6(15,4%)	13(11,5%)
	NA	1	3	0	0	1	5

NA= não avaliado

Não observamos associação entre a expressão de ALDH-1 em células neoplásicas e células do estroma intratumoral. Sua distribuição pode ser observada na tabela 7.

Tabela 7 – Expressão de ALDH-1 em células neoplásicas e células do estroma intratumoral em carcinomas mamário triplo-negativos e idade até 45 anos

		ALDH-1 em estroma intratumoral				
		0	1	2	3	
ALDH-1 em células neoplásicas	0	8	41	34	8	
	1	1	8	3	6	
	2	0	1	0	1	
	3	0	1	1	0	

A distribuição dos subtipos moleculares baseada no perfil imunoistoquímico nas diferentes regiões geográficas pode ser observada na tabela 8. Não houve diferenças das frequências nas diferentes regiões.

Tabela 8 - Distribuição dos subtipos moleculares baseada no perfil imunoistoquímico de carcinomas mamários triplo-negativos em pacientes de até 45 anos nas diferentes regiões geográficas

Subtipo		Centro-oeste	Norte	Nordeste	Sul	Sudeste	Total
Basal	Sim	5(71,4%)	17(77,3%)	26(86,7%)	15(83,3%)	32(80%)	95(81,2%)
	Não	2(28,6%)	5(22,7%)	4(13,3%)	3(16,7%)	8(20%)	22(18,8%)
	Total	7	22	30	18	40	117
Apócrino	Sim	1(16,7%)	1(4,5%)	4(12,9%)	0(0)	0(0)	6(5,2%)
	não	5(83,3%)	21(95,5%)	27(87,1%)	17(100%)	39(100%)	109(94,8%)
	Total	6	22	31	17	39	115
Claudina-baixa	Sim	3(50%)	12(60,0%)	14(45,2%)	6(37,5%)	13(36,1%)	48(44,0%)
	Não	3(50%)	8(40,0%)	17(54,8%)	10(62,5%)	23(63,9%)	61(56,0%)
	Total	6	20	31	16	36	109
Mesenquimal	Sim	6(100%)	19(86,4%)	28(90,3%)	17(100%)	35(87,5%)	105(90,5%)
	Não	0(0)	3(13,6%)	3(9,7%)	0(0)	5(12,5%)	11(9,5%)
	Total	6	21	31	17	40	116
Célula-tronco	Sim	1(16,7%)	2(9,1%)	6(19,4%)	3(18,8%)	10(25%)	22(19,1%)
	Não	5(83,3%)	20(90,9%)	25(80,6%)	13(81,3%)	30(75%)	93 (80,9%)
	Total	6	22	31	16	40	115
Mioepitelial	Sim	1(14,3%)	10(45,5%)	13(41,9%)	9(52,9%)	19(47,5%)	52(44,4%)
	Não	6(85,7%)	12(54,5%)	18(58,1%)	8(47,1%)	21(52,5%)	65(55,6%)
	Total	7	22	31	17	40	117

Somente 5 casos não expressaram nenhum dos perfis de expressão imunoistoquímica pesquisados. Por outro lado, houve grande sobreposição de perfis. Não houve associação entre fenótipo de tipo basal com nenhum dos perfis imunoistoquímicos com perfil basal.

Tabela 9 – Associação entre os fenótipos de expressão imunoistoquímica com o perfil basal

Perfil imunoistoquímico		Basal	Não basal	Total
Mesenquimal	Sim	84(90,3%)	20(90,9%)	104(90,4%)
	Não	9(9,7%)	2(9,1%)	11(9,6%)
	Total	93	22	115
Célula-tronco	Sim	17(18,1%)	5(23,8%)	22(19,1%)
	Não	77(81,9%)	16(76,2%)	93(80,9%)
	Total	94	21	115
Mioepitelial	Sim	45(47,9%)	6(27,3%)	51(44,0%)
	Não	49(52,1%)	16(72,7%)	65(56,5%)
	Total	94	22	116
Apócrino	Sim	5(5,4%)	1(4,5%)	6(5,3%)
	Não	87(94,6%)	21(95,5%)	108(94,7%)
	Total	92	22	114
Claudina-baixa	Sim	39(43,8%)	8(42,1%)	47(43,5%)
	Não	50(56,2%)	11(57,9%)	61(56,5%)
	Total	89	19	108

A expressão de Ki-67 em cada um dos grupos de casos contendo os perfis imunoistoquímicos está apresentada na tabela 10. Observamos baixa atividade proliferativa determinada pela expressão do Ki-67 nos subgrupos com expressão do receptor de androgênio (apócrino) e sem expressão de vimentina (padrão não mesenquimal).

Tabela 10 - Expressão de Ki-67 em cada subgrupo contendo o perfil imunoistoquímico assinalado

Perfil imunoistoquímico		Média±DP	Total de casos	p
Basal	Sim	55,9±27,9	95	NS
	Não	57,0±30,1	22	
Mesenquimal	Sim	58,7±27,7	105	0,001
	Não	30,4±22,2	11	
Apócrino	Sim	29,2±27,3	6	0,02
	Não	57,8±27,8	109	
Claudina-baixa	Sim	56,5±31,1	43	NS
	Não	55,0±26,3	49	
Mioepitelial	Sim	56,5±28,0	52	NS
	Não	55,9±28,8	65	
Célula tronco	Sim	58,2±29,0	22	NS
	Não	56,1±28,2	94	

Estroma intratumoral rico em linfócitos foi identificado em 26/116 (22,4%) dos casos. A média de idade das pacientes neste grupo foi de 37,4±5,4 anos, inferior aos demais carcinomas (38,4±4,7 anos), porém a diferença não foi significativa. A média de expressão de Ki-67 foi maior do que nos demais carcinomas (57,7±23,3 vs. 55,9±29,5), mas essa diferença não foi significativa. As associações deste grupo com os marcadores imunoistoquímicos estudados estão na tabela 11. Na tabela 12, seguem os perfis imunoistoquímicos associados aos carcinomas ricos em linfócitos comparados aos demais. Existe menor frequência de marcadores imunoistoquímicos associados ao tipo molecular basal entre os tumores rico em linfócitos quando comparados aos demais.

Tabela 11 – Expressão imunoistoquímica dos carcinomas ricos em linfócitos comparado aos demais

Marcadores imunoistoquímicos		Carcinomas ricos em linfócitos	Carcinomas pobres em linfócitos	n	p
CK 5/6	Positivo	10(38,5%)	55(64,0%)	65(58,0%)	0,04
	Negativo	16(61,5%)	31(36,0%)	47(42,0%)	
	NA	0	4	4	
CK 14	Positivo	4(15,4%)	49(55,7%)	53(46,5%)	0,003
	Negativo	22(84,6%)	39(44,3%)	61(53,5%)	
	NA	0	2	2	
EGFR	Positivo	7(26,9%)	54(60,0%)	61(52,6%)	0,006
	Negativo	19(73,1%)	36(40,0%)	55(47,4%)	
	NA	0	0	0	
RA	Positivo	0(0)	6(6,9%)	6(5,3%)	0,38
	Negativo	26(100%)	81(93,1%)	107(94,7%)	
	NA	0	3	3	
Vimentina	Positivo	25(96,2%)	78(88,6%)	103(90,4%)	0,44
	Negativo	1(3,8%)	10(11,4%)	11(9,6%)	
	NA	0	2	2	
ALDH-1 em estroma	Positivo	26(100%)	79(89,8%)	105(92,1%)	0,09
	Negativo	0(0)	9(10,2%)	9(7,9%)	
	NA	0	2	2	
ALDH-1 em epitélio	Positivo	8(32%)	14(15,7%)	22(19,3%)	0,16
	Negativo	17(68%)	75(84,3%)	92(80,7%)	
	NA	1	1	2	
Actina músculo liso	Positivo	7(26,9%)	29(33,0%)	36(31,6%)	0,73
	Negativo	19(73,1%)	59(67,0%)	78(68,4%)	
	NA	0	2	2	
p63	Positivo	3(11,5%)	21(23,6%)	24(20,9%)	0,29
	Negativo	23(88,5%)	68(76,4%)	91(79,1%)	
	NA	0	1	1	
p16	Positivo	16(64%)	43(49,4%)	59(52,7%)	0,29
	Negativo	9(36%)	44(50,6%)	53(47,3%)	
	NA	1	3	4	
Claudina 3	Positivo	17(70,8%)	48(57,8%)	65(60,7%)	0,36
	Negativo	7(29,2%)	35(42,2%)	42(39,3%)	
	NA	2	7	9	
Claudina 4	Positivo	22(91,7%)	67(81,7%)	89(84,0%)	0,39
	Negativo	2(8,3%)	15(18,3%)	17(16,0%)	
	NA	2	8	10	
Claudina 7	Positivo	23(95,8%)	68(81,9%)	91(85,0%)	0,17
	Negativo	1(4,2%)	15(18,1%)	16(14,9%)	
	NA	2	7	9	
e-caderina	Positivo	11(61,1%)	71(79,8%)	82(76,6%)	0,16
	Negativo	7(38,9%)	18(20,2%)	25(23,4%)	
	NA	3	6	9	
Catenina-beta	Positivo	21(87,5%)	77(88,5%)	98(88,3%)	0,82
	Negativo	3(12,5%)	10(11,5%)	13(11,7%)	
	NA	2	3	5	

Tabela 12 – Perfis imunoistoquímicos presentes em carcinomas mamários triplo-negativos quanto à quantidade de linfócitos intratumorais

Perfil imunoistoquímico		Carcinomas ricos em linfócitos	Carcinomas pobres em linfócitos	Total	p
Basal	Sim	13(50,0%)	80(89,9%)	93(80,9%)	<0,0001
	Não	13(50,0%)	9(10,1%)	22(19,1%)	
	Total	26	89	115	
Mesenquimal	Sim	25(96,2%)	78(88,6%)	103(90,4%)	0,25
	Não	1(3,8%)	10(11,4%)	11(9,6%)	
	Total	26	88	114	
Apócrino	Sim	0(0)	6(6,9%)	6(5,3%)	0,33
	Não	26(100%)	81(93,1%)	107(94,7%)	
	Total	26	87	113	
Claudina-baixa	Sim	7(29,2%)	39(47,0%)	46(43,0%)	0,19
	Não	17(70,8%)	44(53,0%)	61(57,0%)	
	Total	24	83	107	
Mioepitelial	Sim	9(34,6%)	43(48,3%)	52(45,2%)	0,22
	Não	17(65,4%)	46(51,7%)	63(54,8%)	
	Total	26	89	115	
Célula tronco	Sim	8(32,0%)	14(15,7%)	22(19,3%)	0,16
	Não	17(68,0%)	75(84,3%)	92(80,7%)	
	Total	25	89	114	

6 DISCUSSÃO

No cenário atual com o desenvolvimento de novas terapias para o câncer de mama, o subgrupo de tumores TN representa um grande desafio pela falta de tratamento específico.

O comportamento desse grupo é tipicamente mais agressivo, com consequente menor sobrevida global e livre de doença. Além disso, apresenta maior chance de metástases para órgãos sólidos como pulmões e fígados. Alguns trabalhos recentes descrevem uma maior incidência de acometimento de sistema nervoso central. Provavelmente, tais características poderão ter impacto futuro nas estratégias de estadiamento (145). Os tumores TN acometem com maior frequência as pacientes mais jovens, na pré-menopausa e de ascendência afro-americana(56). Correspondem a aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama e constituem um grupo biologicamente distinto de neoplasias, exibindo na maioria dos casos um fenótipo basal e biologia bastante agressiva, compondo portanto, um grupo bastante heterogêneo. Novos subtipos têm sido descritos, porém não há dados disponíveis a respeito do impacto prognóstico. Desvendar essa heterogeneidade constitui um desafio e que para tal resolvemos, neste primeiro estudo, testar a expressão de vários marcadores através da imunoistoquímica como o objetivo de definir subtipos moleculares. Conhecendo melhor esses subtipos, novas terapias alvo poderão ser desenvolvidas e testadas.

Poucos estudos tentaram examinar diferenças moleculares nos tumores de mama de acordo com a idade. Carvalho *et al.* observaram uma alta

prevalência de tumores TN entre pacientes jovens (34,3% pacientes jovens vs. 16,3% pacientes idosas) e quanto ao fenótipo basal, associado à expressão de CK 5/6 e/ou EGFR, esteve presente em 74,3% vs. 68,4%, respectivamente(14). Outro achado bastante interessante foi a diferença entre o perfil molecular das pacientes mais jovens em relação às idosas. Nas pacientes com carcinoma TN jovens, apresentavam maior frequência de EGFR positivo (71,6% vs.47,3%) e menor frequência de CK 5/6 positiva (9,4% vs. 42,1%)(146). A expressão do EGFR tem sido relacionada com pior prognóstico em pacientes com tumores TN(147). Devido ao fato da maior prevalência de tumores TN em jovens, além da biologia mais agressiva nesse grupo, resolvemos restringir a faixa etária para pacientes na pré-menopausa. Com a escolha dessa faixa etária, conseguimos selecionar um grupo mais homogêneo. A idade das pacientes incluídas no estudo variou de 26 anos a 45 anos (média $38,3 \pm 4,9$ e mediana 39 anos). Não houve diferenças significativas nos grupos.

Um aspecto positivo do nosso estudo foi explorar o perfil imunoistoquímico dos tumores TN nas cinco regiões geográficas brasileiras, favorecendo a melhor compreensão da distribuição desse tipo de neoplasia na nossa população.

O Brasil é um país de dimensões continentais. Temos cinco regiões geográficas bastante distintas em relação a fatores climáticos, miscigenação, nível socioeconômico, fatores culturais, além de outros fatores desconhecidos que podem ter influências na gênese e progressão tumoral. Trata-se, portanto, de um país com uma grande diversidade na sua população. Ao estudar a idade

e a raça das pacientes, podemos criar novas estratificações que poderão ter aplicação direta na prática clínica. Ao entender melhor a distribuição dos tumores TN entre as diferentes regiões geográficas do Brasil poderemos também implementar ações personalizadas na saúde pública como por exemplo, novas estratégias de prevenção, detecção e tratamento.

Devido às características econômicas atuais do país, precisamos otimizar as políticas de saúde pública com objetivo de redução de custos e identificação de populações de maior risco. Dessa maneira, poderíamos intensificar o rastreamento em determinadas regiões.

Devemos considerar, no entanto, a dificuldade em definir raça no Brasil e a necessidade de uma classificação genômica. Pena *et al.* estimaram a proporção de ancestralidade europeia, africana e ameríndia, utilizando um painel validado de 40 polimorfismos de DNA de inserção-deleção em uma população composta por negros, brancos e morenos de quatro regiões mais populosas do Brasil (Norte, Sul, Nordeste e Sul) (156). Os autores foram incapazes de demonstrar diferenças estatisticamente significativas entre as quatro regiões estudadas. Os autores identificaram o predomínio da ascendência europeia em todas as regiões, variando de 60,6 % no Nordeste a 77,7 % no Sul (113). Talvez por esta razão não nos foi possível detectar qualquer diferença entre as diferentes regiões.

Observamos que em muitos casos, tumores TN de dimensões semelhantes e em pacientes com mesma faixa etária podem ter comportamentos clínicos distintos. Variáveis como idade, raça, localização geográfica, nível socioeconômico, fatores nutricionais, fatores climáticos,

fatores reprodutivos, além de estilo de vida, podem estar relacionados. Não sabemos quais desses fatores e de que forma podem interagir entre si na gênese tumoral. Sabemos que os tumores TN são mais prevalentes em determinadas subpopulações, porém seu comportamento é ainda desconhecido. Essas questões nos motivaram a delinear esse estudo.

Como limitação desse trabalho, podemos citar o pequeno número de casos e ser um estudo retrospectivo. Além disso, foi utilizada a técnica de TMA que, em algumas situações, leva à análise de parte da amostra, não representando, em alguns casos, as regiões mais importantes da lesão, podendo levar a erro amostral.

Apesar desse aspecto negativo, o TMA, descrito pela primeira vez por Kononen *et al.*(154), representa um método eficiente e econômico, permitindo realizar múltiplas análises simultâneas de um grande número de tumores. Tem sido cada vez mais utilizado no teste de novos marcadores imunoistoquímicos (155).

Outro problema em estudos como esse é a reprodução da análise anatomopatológica tanto na gradação histológica quanto na análise imunoistoquímica. Na tentativa de solucionar essa questão, nosso material foi interpretado pelo mesmo observador em todos os casos.

Ainda em relação à heterogeneidade dos tumores TN, técnicas de análise da expressão gênica têm sido uma ferramenta importante na melhor compreensão deste grupo, levando à identificação de subtipos distintos. Entretanto, além do fato de que essas metodologias apresentam um custo elevado, não há consenso para uma estratificação funcional baseada em perfis

consistentes. A imunoistoquímica se apresenta como uma ótima opção, sendo um método de fácil execução e reprodutibilidade, acessível a laboratórios comuns e de baixo custo. Porém, não apresenta, ainda, critérios suficientemente estudados para aplicação prática.

Embora a maioria dos tumores TN apresentem um perfil genético basal, eles não são sinônimos pois apresentam discordância em cerca de 25% dos casos (7). Entretanto, os carcinomas TN basais são mais homogêneos geneticamente do que os TN não basais, indicando que dentro dos carcinomas TN talvez o mais importante seria identificarmos o subgrupo basal. As citoqueratinas basais em conjunto com a expressão imunoistoquímica do EGFR têm sido usadas como melhor preditor do fenótipo basal-símile (9, 55). Isoladamente, tanto citoqueratinas basais CK5/6, como EGFR têm sido associados ao pior prognóstico (148).

Na tentativa de melhor entender essa heterogeneidade, várias linhas de pesquisa tentam estratificar os tumores TN. Desse modo, poderíamos abordar cada grupo de forma personalizada. Existem estratificações baseadas na expressão gênica e outras baseadas na IH.

Lehmann *et al.* apresentaram uma tentativa de subclassificar os tumores TN baseados na expressão gênica. Eles identificaram seis subtipos com perfil único: dois basal-símile, um imunomodulador, um mesenquimal, um células tronco-símile e um luminal receptor de androgênio (57). Liu *et al.*, utilizando a técnica de microarranjos, analisaram os perfis do transcriptoma de 165 amostras de TN (61). Ao integrar a expressão de ambos os mRNAs e perfis de RNAs longos não codificadores, os autores identificaram quatro subtipos:

imunomoduladores, luminais receptores de androgênio, mesenquimais e basal-símile imunossuprimido (61). Não existe um consenso a respeito dessas estratificações. Enquanto não temos um perfil que seja fidedigno e que possamos aplicar diretamente na prática clínica, estudos tentam buscar indicadores na tentativa de estratificar esse grupo.

Estudos recentes começaram a delinear alguns grupos. Particularmente, o subtipo luminal receptor de androgênio poderá representar um grupo consistente e com terapia alvo promissora. Gucalp *et al.*, apresentaram resultados promissores em um estudo fase II, com a utilização da bicalutamida nas pacientes TN com receptor de androgênio positivo (73). Apesar do pequeno número de casos em nossa população jovem de tumores RA positivos, estes têm fenótipo menos agressivo, com menor atividade proliferativa e tendência a menor grau histológico.

Outro grupo que chama bastante a atenção é o dos imunomoduladores. O sistema imunológico desempenha papel complexo na biologia do câncer e sua compreensão tem sido fundamental para desenvolvimentos imunoterápicos.

Dificuldades na previsão do comportamento biológico a partir do perfil genético podem estar relacionadas à modulação pelo microambiente. Como exemplo temos o tipo histológico medular que, apesar de se tratar de um tumor basal do ponto de vista genético, tem melhor prognóstico. Essas neoplasias apresentam grande quantidade de linfócitos (149). O sistema imune pode ter um papel importante no comportamento biológico. Portanto, nesses casos, fatores epigenéticos podem estar envolvidos. Lee *et al.* avaliaram a correlação

entre a expressão de diversos genes relacionados à resposta imune e nível de linfócitos, infiltrando tumor (TILs) em pacientes tratadas com quimioterapia neoadjuvante com antraciclina, ciclofosfamida e docetaxel (150).

Os autores observaram que genes relacionados com moléculas T de superfície celular (*CD96*, *CD2*, *IL2RG*, *IL2RB*, *CD3D*, *CD8A*, *CD3E*, *CD28* e *IL7R*), receptor de células T e componentes das vias de sinalização das citocinas (*STAT4*, *TRAF1*, *JAK2* e *NFKB1*), moléculas citotóxicas (*GZMB*, *GNLY*, *GZMA*, *PRF1* e *KLRD1*), moléculas T helper 1 (*IFNG*, *CXCL 10*, *TBX21*, *CXCL9*, *CXCL11* e *CCL4*), marcadores de imunossupressão (*LAG3*, *IDO1*, *CTLA- 4*, *TIGIT*, *BTLA* e *FOXP3*), marcadores de células B (*BLNK* e *CD79a*) e receptores de reconhecimento padrão (*GBP5*, *CXCR6*, *IL18RAP*, *IL18*, *TLR4* e *TLR7*) foram significativamente correlacionados com o nível de TILs (151).

Em uma revisão sistemática e metanálise para avaliar a TILs e resposta à quimioterapia neoadjuvante, TILs mais elevados foram associados com maior resposta patológica completa (PCR) em TN (OR = 2,49; IC 1,61-3,83)(152). No estudo GeparSixto, tumores com predomínio de infiltrado linfocitário apresentaram maior PCR com carboplatina em comparação com tumores sem predomínio linfocitário (153).

Nossos resultados na comparação dos carcinomas rico em linfócitos com os demais indicam que o fenótipo basal, comumente associado a comportamento mais agressivo, é menos frequente neste grupo.

Claramente, os tumores TN são um grupo heterogêneo com subtipos distintos. A tentativa de subclassificar essa patologia constitui um grande desafio. Em muitas situações, quando avaliamos os RE/RP e HER2, os termos

TN e BS são utilizados como o mesmo grupo, mas existem discordâncias, incluindo alguns tumores HER2 positivos e RE positivos entre os basais. Até o momento não dispomos de terapias-alvo específicas para esse grupo, embora potenciais novas terapias estejam sendo investigadas.

Para haver uma evolução no tratamento dos tumores TN, precisamos aprender mais sobre a heterogeneidade desse grupo e isso ajudará a personalizarmos as condutas terapêuticas de acordo com características moleculares. O microambiente tumoral será um provável alvo para o tratamento no futuro, assim como a prevenção de recorrências.

A maior prevalência dos carcinomas TN em mulheres jovens e das regiões norte, nordeste e centro oeste em países de dimensões continentais, como o Brasil, com uma grande diversidade racial, cultural e econômica, associada à sua grande heterogeneidade biológica, nos motivam a buscar sua estratificação com vistas a diagnóstico e tratamento personalizados. Infelizmente, até o presente não há classificação com impacto prático. Com os dados até o momento, os subgrupos apócrino e basal talvez sejam os mais promissores e, este último, sob forte influência do microambiente, sobretudo do sistema imune.

7 CONCLUSÕES

Os carcinomas mamários triplo-negativos em pacientes de até 45 anos de idade:

1. Não apresentam diferenças nas médias de idade nas cinco regiões geográficas.
2. Características histológicas: Correspondem ao tipo histológico não especial em mais de 90% dos casos e com frequências dos tipos medular e metaplásico de, respectivamente, 4,2% e 3,4%. Em 69,2% dos casos são de alto grau, com maior frequência destes nas regiões Nordeste, Sul e Sudeste. Apresentam contornos do tumor circunscritos ou parcialmente circunscritos na maioria dos casos e são predominantemente sólidos, com frequente embolização vascular peritumoral e necrose tumoral. A associação com componente “in situ” é pouco frequente. Apresentam estroma intratumoral com reação predominantemente linfocitária e em 22,4% dos casos se apresentam ricos em linfócitos.
3. Os marcadores imunoistoquímicos estudados não mostraram diferenças nas frequências entre as diferentes regiões geográficas.
4. Os subtipos moleculares determinados através da expressão imunoistoquímica não mostraram diferenças nas frequências entre as diferentes regiões geográficas
5. Os tumores das regiões Nordeste, Sul e Sudeste apresentam maior atividade proliferativa. A expressão de receptor de androgênio (perfil apócrino) e a ausência de expressão de vimentina se associam a menor

atividade proliferativa. Não há diferença na distribuição do Ki-67 entre os tumores ricos em linfócitos e os demais

6. Carcinomas ricos em linfócitos intratumorais apresentam menor frequência de marcadores basais e do perfil imunoistoquímico basal (citoqueratinas basais e/ou EGFR).

8 ANEXO

Anexo 1- Aprovação pela Comissão Ética

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 17/11/2010, APROVOU o Protocolo de Pesquisa nº 311/10 intitulado: "Identificação de subtipos moleculares baseado no perfil imunoistoquímico de carcinomas mamários triplo-negativos em mulheres abaixo dos 45 anos e sua distribuição nas diferentes regiões geográficas do Brasil" apresentado pelo Departamento de PATOLOGIA

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP- FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 466/12, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Filomena Marino Carvalho Pesquisador (a)

Executante: Sérgio M. Masili-Oku

CEP-FMUSP, 27 de Janeiro de 2016.

Profa. Dra. Maria Aparecida Azevedo Koike Folgueira
Coordenador
Comitê de Ética em Pesquisa

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e-mail: cep.fm@usp.br

REFERÊNCIAS

1. Torre LA, Siegel RL, Ward EM, Jemal A. Global Cancer Incidence and Mortality Rates and Trends-An Update. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2016;25(1):16-27.
2. Althuis MD, Dozier JM, Anderson WF, Devesa SS, Brinton LA. Global trends in breast cancer incidence and mortality 1973-1997. *International journal of epidemiology.* 2005;34(2):405-12.
3. Schottenfeld D FJJ. Breast cancer. *Cancer epidemiology and prevention.* 3rd ed. New York: Oxford University Press; 2006. p. 995-1012.
4. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, et al. Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *Jama.* 2002;288(3):321-33.
5. Colditz GA, Sellers TA, Trapido E. Epidemiology - identifying the causes and preventability of cancer? *Nature reviews Cancer.* 2006;6(1):75-83.
6. Enggebraaten O, Vollan HK, Borresen-Dale AL. Triple-negative breast cancer and the need for new therapeutic targets. *The American journal of pathology.* 2013;183(4):1064-74.
7. Prat A, Adamo B, Cheang MC, Anders CK, Carey LA, Perou CM. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple-negative breast cancer. *The oncologist.* 2013;18(2):123-33.
8. Hirshfield KM, Ganesan S. Triple-negative breast cancer: molecular subtypes and targeted therapy. *Current opinion in obstetrics & gynecology.* 2014;26(1):34-40.
9. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2004;10(16):5367-74.
10. Choi J, Jung W-H, Koo JS. Clinicopathologic features of molecular subtypes of triple negative breast cancer based on immunohistochemical markers. *Histology and Histopathology.* 2012;27(11):1481-93.
11. McNamara KM, Yoda T, Takagi K, Miki Y, Suzuki T, Sasano H. Androgen receptor in triple negative breast cancer. *The Journal of steroid biochemistry and molecular biology.* 2013;133:66-76.
12. Carvalho FM, Bacchi LM, Pincerato KM, Van de Rijn M, Bacchi CE. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. *BMC Womens Health.* 2014;14:102.
13. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Modern pathology : an official journal of the United States and Canadian Academy of Pathology, Inc.* 2010;23(1):123-33.
14. Carvalho FM, Bacchi LM, Santos PP, Bacchi CE. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics.* 2010;65(10):1033-6.
15. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Bottiglieri L, Montagna E, Luini A, et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast cancer research and treatment.* 2009;116(2):317-28.
16. Perou CM. Molecular Stratification of Triple-Negative Breast Cancers. *The oncologist.* 2011;16(Supplement 1):61-70.

17. Tang D, Xu S, Zhang Q, Zhao W. The expression and clinical significance of the androgen receptor and E-cadherin in triple-negative breast cancer. *Medical oncology*. 2012;29(2):526-33.
18. Tsutsumi Y. Apocrine carcinoma as triple-negative breast cancer: novel definition of apocrine-type carcinoma as estrogen/progesterone receptor-negative and androgen receptor-positive invasive ductal carcinoma. *Japanese journal of clinical oncology*. 2012;42(5):375-86.
19. Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, et al. Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *Journal of cancer research and clinical oncology*. 2013;139(5):739-46.
20. Yigit S, Pehlivan FS, Evcim G, Etit D. Clinicopathologic features of the mixed epithelial and mesenchymal type metaplastic breast carcinoma with myoepithelial differentiation in a subset of six cases. *Pathology, research and practice*. 2012;208(3):147-50.
21. Yilmaz KB, Pak I, Irkkan C, Ozaslan C, Atalay C. Metaplastic carcinoma of the breast: clinicopathological features and immunohistochemical analysis. *J BUON*. 2011;16(4):652-6.
22. Khoury T, Ademuyiwa FO, Chandraseekhar R, Jabbour M, DeLeo A, Ferrone S, et al. Aldehyde dehydrogenase 1A1 expression in breast cancer is associated with stage, triple negativity, and outcome to neoadjuvant chemotherapy (vol 25, pg 388, 2012). *Modern Pathology*. 2012;25(6):917-.
23. Ohi Y, Umekita Y, Yoshioka T, Souda M, Rai Y, Sagara Y, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 expression predicts poor prognosis in triple-negative breast cancer. *Histopathology*. 2011;59(4):776-80.
24. Sullivan HC, Oprea-Ilie G, Adams AL, Page AJ, Kim S, Wang J, et al. Triple-negative Breast Carcinoma in African American and Caucasian Women: Clinicopathology, Immunomarkers, and Outcome. *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*. 2014;22(1):17-23.
25. ESTATÍSTICA I-IBDGE. Estimativa da população do Brasil e do mundo em tempo real.; 2006 [Available from: http://www.ibge.gov.br/paisesat/main_frameset.php].
26. Jemal A. Global Cancer Statistics (vol 61, pg 69, 2011). *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2011;61(2):134-.
27. Brouckaert O, Wildiers H, Floris G, Neven P. Update on triple-negative breast cancer: prognosis and management strategies. *International journal of women's health*. 2012;4:511-20.
28. Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer Statistics, 2010. *Ca-a Cancer Journal for Clinicians*. 2010;60(5):277-300.
29. Vineis P, Wild CP. Global cancer patterns: causes and prevention. *Lancet (London, England)*. 2014;383(9916):549-57.
30. Ehni HJ. Expensive cancer drugs and just health care. *Best practice & research Clinical gastroenterology*. 2014;28(2):327-37.
31. Nelson B. Genomic medicine: a question of value: despite the promise of personalized medicine, genomic testing has yet to prove its cost-effectiveness. *Cancer cytopathology*. 2014;122(8):557-8.
32. Payne SJ, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer--the present. *Histopathology*. 2008;52(1):82-90.
33. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2009;15(7):2302-10.

34. Schechter AL, Stern DF, Vaidyanathan L, Decker SJ, Drebin JA, Greene MI, et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. *Nature*. 1984;312(5994):513-6.
35. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. *Science*. 1987;235(4785):177-82.
36. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
37. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. 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*. 2001;98(19):10869-74.
38. 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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(14):8418-23.
39. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF, Ibrahim N, Cristofanilli M, Anderson K, et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2005;11(16):5678-85.
40. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 2004;40(18):2667-75.
41. Russnes HG, Vollan HK, Lingjaerde OC, Krasnitz A, Lundin P, Naume B, et al. Genomic architecture characterizes tumor progression paths and fate in breast cancer patients. *Science translational medicine*. 2010;2(38):38ra47.
42. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2012;490(7418):61-70.
43. Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, et al. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast cancer research : BCR*. 2008;10(4):R65.
44. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2010;16(3):876-87.
45. Sorlie T. Molecular classification of breast tumors: toward improved diagnostics and treatments. *Methods in molecular biology (Clifton, NJ)*. 2007;360:91-114.
46. Curtis C, Shah SP, Chin SF, Turashvili G, Rueda OM, Dunning MJ, et al. The genomic and transcriptomic architecture of 2,000 breast tumours reveals novel subgroups. *Nature*. 2012;486(7403):346-52.
47. Kwei KA, Kung Y, Salari K, Holcomb IN, Pollack JR. Genomic instability in breast cancer: pathogenesis and clinical implications. *Molecular oncology*. 2010;4(3):255-66.
48. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *Journal of the National Cancer Institute*. 2003;95(19):1482-5.
49. De Summa S, Pinto R, Sambiasi D, Petriella D, Paradiso V, Paradiso A, et al. BRCAness: a deeper insight into basal-like breast tumors. *Ann Oncol*. 2013;24 Suppl 8:viii13-viii21.

50. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *Journal of clinical pathology*. 2011;64(11):937-46.
51. Prat A, Adamo B, Fan C, Peg V, Vidal M, Galvan P, et al. Genomic analyses across six cancer types identify basal-like breast cancer as a unique molecular entity. *Scientific reports*. 2013;3:3544.
52. Cohen AL, Piccolo SR, Cheng L, Soldi R, Han B, Johnson WE, et al. Genomic pathway analysis reveals that EZH2 and HDAC4 represent mutually exclusive epigenetic pathways across human cancers. *BMC medical genomics*. 2013;6:35.
53. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *International journal of cancer Journal international du cancer*. 2008;123(1):236-40.
54. Morris SR, Carey LA. Gene expression profiling in breast cancer. *Current opinion in oncology*. 2007;19(6):547-51.
55. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. 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*. 2008;14(5):1368-76.
56. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *Jama*. 2006;295(21):2492-502.
57. Lehmann BD, Bauer JA, Chen X, Sanders ME, Chakravarthy AB, Shyr Y, et al. Identification of human triple-negative breast cancer subtypes and preclinical models for selection of targeted therapies. *The Journal of clinical investigation*. 2011;121(7):2750-67.
58. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2010;12(5):R68.
59. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast cancer research and treatment*. 2009;117(2):273-80.
60. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V, Tubiana-Hulin M, Fumoleau P, Larsimont D, et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene*. 2005;24(29):4660-71.
61. Liu YR, Jiang YZ, Xu XE, Yu KD, Jin X, Hu X, et al. Comprehensive transcriptome analysis identifies novel molecular subtypes and subtype-specific RNAs of triple-negative breast cancer. *Breast cancer research : BCR*. 2016;18(1):33.
62. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Advances in anatomic pathology*. 2007;14(5):358-73.
63. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006;19(2):264-71.
64. Nabholz JM, Abrial C, Mouret-Reynier MA, Dauplat MM, Weber B, Gligorov J, et al. Multicentric neoadjuvant phase II study of panitumumab combined with an anthracycline/taxane-based chemotherapy in operable triple-negative breast cancer: identification of biologically defined signatures predicting treatment impact. *Ann Oncol*. 2014;25(8):1570-7.
65. Citri A, Yarden Y. EGF-ERBB signalling: towards the systems level. *Nature reviews Molecular cell biology*. 2006;7(7):505-16.

66. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2007;13(15 Pt 1):4429-34.
67. Nieto Y, Nawaz F, Jones RB, Shpall EJ, Nawaz S. Prognostic significance of overexpression and phosphorylation of epidermal growth factor receptor (EGFR) and the presence of truncated EGFRvIII in locoregionally advanced breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(28):4405-13.
68. Nogi H, Kobayashi T, Suzuki M, Tabei I, Kawase K, Toriumi Y, et al. EGFR as paradoxical predictor of chemosensitivity and outcome among triple-negative breast cancer. *Oncology reports*. 2009;21(2):413-7.
69. Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K, Ikeda K, Tokunaga S, Nagahara H, et al. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol*. 2008;13(5):431-5.
70. Sotiriou C, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2009;360(8):790-800.
71. Lin FeM, Pincerato KM, Bacchi CE, Barakat EC, Carvalho FM. Coordinated expression of oestrogen and androgen receptors in HER2-positive breast carcinomas: impact on proliferative activity. *J Clin Pathol*. 2012;65(1):64-8.
72. Gucalp A, Traina TA. Triple-negative breast cancer: role of the androgen receptor. *Cancer journal (Sudbury, Mass)*. 2010;16(1):62-5.
73. Gucalp A, Tolaney S, Isakoff SJ, Ingle JN, Liu MC, Carey LA, et al. Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic Breast Cancer. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. 2013;19(19):5505-12.
74. Nelson WJ. Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex. *Biochemical Society transactions*. 2008;36(Pt 2):149-55.
75. Andrews JL, Kim AC, Hens JR. The role and function of cadherins in the mammary gland. *Breast cancer research : BCR*. 2012;14(1):203.
76. Schmalhofer O, Brabletz S, Brabletz T. E-cadherin, beta-catenin, and ZEB1 in malignant progression of cancer. *Cancer metastasis reviews*. 2009;28(1-2):151-66.
77. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, et al. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 2009;454(6):647-56.
78. Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Human pathology*. 2004;35(12):1531-6.
79. Gupta GP, Massague J. Cancer metastasis: building a framework. *Cell*. 2006;127(4):679-95.
80. Savagner P. Leaving the neighborhood: molecular mechanisms involved during epithelial-mesenchymal transition. *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology*. 2001;23(10):912-23.
81. Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nature reviews Cancer*. 2002;2(6):442-54.
82. Jeong H, Ryu YJ, An J, Lee Y, Kim A. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer correlates with high histological grade and triple-negative phenotype. *Histopathology*. 2012;60(6b):E87-95.

83. Sarrio D, Rodriguez-Pinilla SM, Hardisson D, Cano A, Moreno-Bueno G, Palacios J. Epithelial-mesenchymal transition in breast cancer relates to the basal-like phenotype. *Cancer Res.* 2008;68(4):989-97.
84. Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cellular and molecular life sciences : CMLS.* 2011;68(18):3033-46.
85. Calaf GM, Balajee AS, Montalvo-Villagra MT, Leon M, Daniela NM, Alvarez RG, et al. Vimentin and Notch as biomarkers for breast cancer progression. *Oncology letters.* 2014;7(3):721-7.
86. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World journal of clinical oncology.* 2014;5(3):382-92.
87. Barbareschi M, Pecciarini L, Cangi MG, Macri E, Rizzo A, Viale G, et al. p63, a p53 homologue, is a selective nuclear marker of myoepithelial cells of the human breast. *The American journal of surgical pathology.* 2001;25(8):1054-60.
88. DiRenzo J, Signoretti S, Nakamura N, Rivera-Gonzalez R, Sellers W, Loda M, et al. Growth factor requirements and basal phenotype of an immortalized mammary epithelial cell line. *Cancer Res.* 2002;62(1):89-98.
89. Reis-Filho JS, Milanezi F, Paredes J, Silva P, Pereira EM, Maeda SA, et al. Novel and classic myoepithelial/stem cell markers in metaplastic carcinomas of the breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2003;11(1):1-8.
90. Koker MM, Kleer CG. p63 expression in breast cancer: a highly sensitive and specific marker of metaplastic carcinoma. *The American journal of surgical pathology.* 2004;28(11):1506-12.
91. Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast cancer research : BCR.* 2008;10(3):R53.
92. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2009;106(33):13820-5.
93. Neumeister V, Agarwal S, Bordeaux J, Camp RL, Rimm DL. In situ identification of putative cancer stem cells by multiplexing ALDH1, CD44, and cytokeratin identifies breast cancer patients with poor prognosis. *The American journal of pathology.* 2010;176(5):2131-8.
94. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell stem cell.* 2007;1(5):555-67.
95. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research.* 2005;11(3):1154-9.
96. Vasiliou V, Nebert DW. Analysis and update of the human aldehyde dehydrogenase (ALDH) gene family. *Human genomics.* 2005;2(2):138-43.
97. Bunting KD, Townsend AJ. De novo expression of transfected human class 1 aldehyde dehydrogenase (ALDH) causes resistance to oxazaphosphorine anti-cancer alkylating agents in hamster V79 cell lines. Elevated class 1 ALDH activity is closely correlated with reduction in DNA interstrand cross-linking and lethality. *The Journal of biological chemistry.* 1996;271(20):11884-90.
98. Canuto RA, Muzio G, Salvo RA, Maggiora M, Trombetta A, Chantepie J, et al. The effect of a novel irreversible inhibitor of aldehyde dehydrogenases 1 and 3 on tumour cell growth and death. *Chemico-biological interactions.* 2001;130-132(1-3):209-18.

99. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *International journal of cancer Journal international du cancer*. 1983;31(1):13-20.
100. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*. 1984;133(4):1710-5.
101. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology*. 2000;182(3):311-22.
102. Yerushalmi R, Woods R, Ravdin PM, Hayes MM, Gelmon KA. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. *The Lancet Oncology*. 2010;11(2):174-83.
103. Luporsi E, Andre F, Spyrtos F, Martin PM, Jacquemier J, Penault-Llorca F, et al. Ki-67: level of evidence and methodological considerations for its role in the clinical management of breast cancer: analytical and critical review. *Breast cancer research and treatment*. 2012;132(3):895-915.
104. de Azambuja E, Cardoso F, de Castro G, Jr., Colozza M, Mano MS, Durbecq V, et al. Ki-67 as prognostic marker in early breast cancer: a meta-analysis of published studies involving 12,155 patients. *British journal of cancer*. 2007;96(10):1504-13.
105. Stuart-Harris R, Caldas C, Pinder SE, Pharoah P. Proliferation markers and survival in early breast cancer: a systematic review and meta-analysis of 85 studies in 32,825 patients. *Breast*. 2008;17(4):323-34.
106. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2007;25(33):5287-312.
107. Coates AS, Winer EP, Goldhirsch A, Gelber RD, Gnant M, Piccart-Gebhart M, et al. -Tailoring therapies-improving the management of early breast cancer: St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2015. *Ann Oncol*. 2015;26(8):1533-46.
108. Schreiber RD, Old LJ, Smyth MJ. Cancer immunoediting: integrating immunity's roles in cancer suppression and promotion. *Science*. 2011;331(6024):1565-70.
109. Aaltomaa S, Lipponen P, Eskelinen M, Kosma VM, Marin S, Alhava E, et al. Lymphocyte infiltrates as a prognostic variable in female breast cancer. *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)*. 1992;28a(4-5):859-64.
110. Denkert C, Loibl S, Noske A, Roller M, Muller BM, Komor M, et al. Tumor-associated lymphocytes as an independent predictor of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(1):105-13.
111. Loi S, Sirtaine N, Piette F, Salgado R, Viale G, Van Eenoo F, et al. Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2013;31(7):860-7.
112. Adams S, Gray RJ, Demaria S, Goldstein L, Perez EA, Shulman LN, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trials: ECOG 2197 and ECOG 1199. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2014;32(27):2959-66.

113. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol.* 2015;26(2):259-71.
114. Pruneri G, Vingiani A, Bagnardi V, Rotmensz N, De Rose A, Palazzo A, et al. Clinical validity of tumor-infiltrating lymphocytes analysis in patients with triple-negative breast cancer. *Ann Oncol.* 2016;27(2):249-56.
115. Clarke M, Coates AS, Darby SC, Davies C, Gelber RD, Godwin J, et al. Adjuvant chemotherapy in oestrogen-receptor-poor breast cancer: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet (London, England).* 2008;371(9606):29-40.
116. Berry DA, Cirincione C, Henderson IC, Citron ML, Budman DR, Goldstein LJ, et al. Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer. *Jama.* 2006;295(14):1658-67.
117. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A, et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(5):778-85.
118. von Minckwitz G, Untch M, Blohmer JU, Costa SD, Eidtmann H, Fasching PA, et al. Definition and impact of pathologic complete response on prognosis after neoadjuvant chemotherapy in various intrinsic breast cancer subtypes. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(15):1796-804.
119. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2008;26(8):1275-81.
120. Huober J, von Minckwitz G, Denkert C, Tesch H, Weiss E, Zahm DM, et al. Effect of neoadjuvant anthracycline-taxane-based chemotherapy in different biological breast cancer phenotypes: overall results from the GeparTrio study. *Breast cancer research and treatment.* 2010;124(1):133-40.
121. Straver ME, Glas AM, Hannemann J, Wesseling J, van de Vijver MJ, Rutgers EJ, et al. The 70-gene signature as a response predictor for neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast cancer research and treatment.* 2010;119(3):551-8.
122. Metzger-Filho O, Tutt A, de Azambuja E, Saini KS, Viale G, Loi S, et al. Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2012;30(15):1879-87.
123. Martin M, Romero A, Cheang MC, Lopez Garcia-Asenjo JA, Garcia-Saenz JA, Oliva B, et al. Genomic predictors of response to doxorubicin versus docetaxel in primary breast cancer. *Breast cancer research and treatment.* 2011;128(1):127-36.
124. Isakoff SJ. Triple-negative breast cancer: role of specific chemotherapy agents. *Cancer journal (Sudbury, Mass).* 2010;16(1):53-61.
125. Byrski T, Huzarski T, Dent R, Gronwald J, Zuziak D, Cybulski C, et al. Response to neoadjuvant therapy with cisplatin in BRCA1-positive breast cancer patients. *Breast cancer research and treatment.* 2009;115(2):359-63.
126. Byrski T, Gronwald J, Huzarski T, Grzybowska E, Budryk M, Stawicka M, et al. Pathologic complete response rates in young women with BRCA1-positive breast cancers after neoadjuvant chemotherapy. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology.* 2010;28(3):375-9.
127. Joensuu H, Gligorov J. Adjuvant treatments for triple-negative breast cancers. *Ann Oncol.* 2012;23 Suppl 6:vi40-5.
128. Robert NJ, Dieras V, Glaspy J, Brufsky AM, Bondarenko I, Lipatov ON, et al. RIBBON-1: randomized, double-blind, placebo-controlled, phase III trial of

- chemotherapy with or without bevacizumab for first-line treatment of human epidermal growth factor receptor 2-negative, locally recurrent or metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2011;29(10):1252-60.
129. Miller K, Wang M, Gralow J, Dickler M, Cobleigh M, Perez EA, et al. Paclitaxel plus bevacizumab versus paclitaxel alone for metastatic breast cancer. *The New England journal of medicine*. 2007;357(26):2666-76.
130. Brufsky A, Valero V, Tiangco B, Dakhil S, Brize A, Rugo HS, et al. Second-line bevacizumab-containing therapy in patients with triple-negative breast cancer: subgroup analysis of the RIBBON-2 trial. *Breast cancer research and treatment*. 2012;133(3):1067-75.
131. Farmer H, McCabe N, Lord CJ, Tutt AN, Johnson DA, Richardson TB, et al. Targeting the DNA repair defect in BRCA mutant cells as a therapeutic strategy. *Nature*. 2005;434(7035):917-21.
132. Rivera E, Lee J, Davies A. Clinical development of ixabepilone and other epothilones in patients with advanced solid tumors. *The oncologist*. 2008;13(12):1207-23.
133. Baselga J, Zambetti M, Llombart-Cussac A, Manikhas G, Kubista E, Steger GG, et al. Phase II genomics study of ixabepilone as neoadjuvant treatment for breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2009;27(4):526-34.
134. Carey LA, Rugo HS, Marcom PK, Mayer EL, Esteva FJ, Ma CX, et al. TBCRC 001: randomized phase II study of cetuximab in combination with carboplatin in stage IV triple-negative breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2012;30(21):2615-23.
135. Baselga J, Albanell J, Ruiz A, Lluch A, Gascon P, Guillem V, et al. Phase II and tumor pharmacodynamic study of gefitinib in patients with advanced breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2005;23(23):5323-33.
136. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009;20(12):1913-27.
137. Corkery B, Crown J, Clynes M, O'Donovan N. Epidermal growth factor receptor as a potential therapeutic target in triple-negative breast cancer. *Ann Oncol*. 2009;20(5):862-7.
138. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007;109(9):1721-8.
139. Stark A, Kleer CG, Martin I, Awuah B, Nsiah-Asare A, Takyi V, et al. African ancestry and higher prevalence of triple-negative breast cancer: findings from an international study. *Cancer*. 2010;116(21):4926-32.
140. **Carvalho F**, Bacchi L, Pincerato K, West R, Van de Rijn M, Bacchi C. Geographic differences in the distribution of molecular subtypes of breast cancer in Brazil. 2014.
141. Lakhani SR, Cancer IAfRo, Organization WH. WHO classification of tumours of the breast / edited by Sunil R. Lakhani ... [et al.]. France: Lyon : International Agency for Research on Cancer, 2012.; 2012. 240 p p.
142. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.

143. Kolokytha P, Yiannou P, Keramopoulos D, Kolokythas A, Nonni A, Patsouris E, et al. Claudin-3 and claudin-4: distinct prognostic significance in triple-negative and luminal breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2014;22(2):125-31.
144. Resetkova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, et al. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. *Breast cancer research and treatment*. 2010;123(1):97-108.
145. Graesslin O, Abdulkarim BS, Coutant C, Huguet F, Gabos Z, Hsu L, et al. Nomogram to predict subsequent brain metastasis in patients with metastatic breast cancer. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2010;28(12):2032-7.
146. Carvalho FM, Bacchi LM, Santos PPC, Bacchi CE. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics*. 2010;65(10):1033-6.
147. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P, Bottiglieri L, Montagna E, Luini A, et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast cancer research and treatment*. 2009;116(2):317-28.
148. Inanc M, Ozkan M, Karaca H, Berk V, Bozkurt O, Duran AO, et al. Cytokeratin 5/6, c-Met expressions, and PTEN loss prognostic indicators in triple-negative breast cancer. *Medical oncology*. 2014;31(1):801.
149. Malyuchik SS, Kiyamova RG. Medullary breast carcinoma. *Experimental oncology*. 2008;30(2):96-101.
150. Lee HJ, Lee JJ, Song IH, Park IA, Kang J, Yu JH, et al. Prognostic and predictive value of NanoString-based immune-related gene signatures in a neoadjuvant setting of triple-negative breast cancer: relationship to tumor-infiltrating lymphocytes. *Breast cancer research and treatment*. 2015;151(3):619-27.
151. Abelev B, Adam J, Adamova D, Adare AM, Aggarwal MM, Aglieri Rinella G, et al. D meson elliptic flow in noncentral Pb-Pb collisions at $\sqrt{s_{NN}}=2.76$ TeV. *Physical review letters*. 2013;111(10):102301.
152. Mao Y, Qu Q, Zhang Y, Liu J, Chen X, Shen K. The value of tumor infiltrating lymphocytes (TILs) for predicting response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer: a systematic review and meta-analysis. *PloS one*. 2014;9(12):e115103.
153. Denkert C, von Minckwitz G, Brase JC, Sinn BV, Gade S, Kronenwett R, et al. Tumor-infiltrating lymphocytes and response to neoadjuvant chemotherapy with or without carboplatin in human epidermal growth factor receptor 2-positive and triple-negative primary breast cancers. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 2015;33(9):983-91.
154. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, et al. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nature medicine*. 1998;4(7):844-7.
155. Pinder SE, Brown JP, Gillett C, Purdie CA, Speirs V, Thompson AM, et al. The manufacture and assessment of tissue microarrays: suggestions and criteria for analysis, with breast cancer as an example. *Journal of clinical pathology*. 2013;66(3):169-77.
156. Pena SD, Di Pietro G, Fuchshuber-Moraes M, Genro JP, Hutz MH, Kehdy Fde S, et al. The genomic ancestry of individuals from different geographical regions of Brazil is more uniform than expected. *PloS one*. 2011;6(2):e17063.

10 APÊNDICE

Apêndice 1 – Descrição dos casos estudados quanto à região geográfica, idade das pacientes e características histológicas

No. caso	Região	Idade	Tipo histológico	Grau histológico	Grau nuclear	Componente in situ	Embolização vascular	Contorno tumor	desmoplasia	Linfócitos estroma	hialinização	necrose	túbulos
cb10021/11	SE	41	CDI	2	3	0	0	P	0	2	0	1	0
cb10155/11	SE	43	CDI	3	3	0	0	C	1	3	0	1	0
cb10271/10	NE	34	CDI	3	3	1	0	P	3	0	2	2	0
cb10615/11	N	38	CDI	2	2	1	2	I	3	1	0	0	0
cb10650/11	SE	37	CDI	3	3	1	0	P	1	0	0	2	0
cb11052/11	SE	40	CDI	3	3	1	2	P	0	2	1	1	0
cb11094/11	SE	27	CDI	3	3	0	0	P	0	2	1	2	0
cb11950/11	N	45	CDI	2	3	2	0	I	2	2	2	0	0
cb12084/11	CW	41	CDI	2	2	0	0	I	3	0	3	0	0
cb12148/10	SE	42	CDI	3	3	2	2	I	2	2	1	0	0
cb12160/11	SE	39	CDI	3	3	0	1	P	1	1	0	3	0
cb12544/11	NE	44	MEDUL	3	3	0	0	C	0	3	0	1	0
cb12714/10	NE	43	CDI	3	3	0	0	C	0	3	0	2	3
cb13093/11	SE	38	CDI	3	3	0	0	P	0	2	1	1	0
cb13617/11	SE	43	CDI	2	3	0	0	I	1	0	1	1	0
cb13654/11	NE	44	CDI	2	3	1	2	I	2	2	1	0	1
cb14264/11	SE	39	MEDUL	3	3	0	0	C	0	3	0	2	0
cb14861/11	SE	45	CDI	3	3	1	0	I	2	0	3	0	0
cb15484/10	S	41	CDI	3	3	0	0	P	2	3	0	0	0
cb15635/10	CW	34	CDI	3	3	0	0	NA	2	2	0	1	0
cb15786/11	NE	45	CDI	2	3	1	0	I	2	1	1	0	1
cb16101/11	N	32	CDI	2	3	0	0	I	1	0	1	2	0
cb16137/10	SE	43	CDI	3	3	1	0	I	3	0	2	1	1
cb16304/11	SE	43	CDI	3	3	2	2	I	2	2	0	0	0

No. caso	Região	Idade	Tipo histológico	Grau histológico	Grau nuclear	Componente in situ	Embolização vascular	Contorno tumor	desmoplasia	Linfócitos estroma	hialinização	necrose	túbulos
cb16778/11	SE	34	CDI	3	3	0	0	NA	1	2	0	0	0
cb17054/09	SE	44	CDI	2	3	0	1	NA	1	2	0	2	0
cb17135/09	N	38	CDI	2	3	1	2	I	3	2	0	0	1
cb17370/09	NE	39	CDI	2	3	0	2	I	3	1	2	1	1
cb17856/09	NE	44	CDI	2	3	0	1	I	0	0	0	3	0
cb17870/09	NE	38	CDI	3	3	0	0	C	0	0	2	3	0
CB1923/11	NE	33	CDI	3	3	0	NA	NA	1	3	0	2	0
cb1934/11	NE	45	MET	3	3	0	0					2	0
cb19392/11	SE	31	CDI	3	3	0	0	I	1	2	0	0	1
cb20111/09	SE	44	CDI	2	2	1	1	I	2	0	0	1	0
cb20114/09	SE	35	MEDUL	3	3	0	0	C	0	3	0	2	0
cb20122/09	SE	42	CDI	3	3	0	0	P	1	2	0	1	0
cb2101/11	SE	31	CDI	2	3	0	0	I	3	0	3	0	1
cb2104/11	CW	40	CDI	2	3	1	2	I	2	3F	0	0	0
cb21819/09	SE	43	CLI	1	1	0	0	I	1	0	0	0	0
cb21903/09	SE	37	CDI	3	3	0	NA	NA	0	2	0	2	0
cb220/10	SE	32	CDI	3	3	1	NA	NA	1	2	0	0	0
cb22109/09	NE	27	PAPILIFERO		3	0	0	P	2	3I	0	0	2
cb22278/11	N	40	CDI	3	3	0	0	I	2	2	0	0	0
cb22388/11	SE	40	CDI	3	3	0	0	P	1	2	1	2	1
cb2288/11	N	38	CDI	3	3	0	2	I	2	2	1	1	0
cb22908/09	NE	40	CDI	2	3	0	2	I	1	0	0	1	0
cb2378/11	N	35	CDI	2	3	0	NA	P	0	3F	0	2	0
cb23854/11	NE	30	CDI	3	3	0	0	P	0	2	0	1	0
cb23864/11	CW	40	CDI	3	3	1	2	P	0	1	0	0	0
cb24163/11	SE	43	CDI	3	3	0	0	P	1	2	0	0	0
cb24277/11	S	40	CDI	3	3	0	0	P	1	2	1	1	0
cb24424/11	N	40	CDI	3	3	0	0	P	1	2	0	3	0

No. caso	Região	Idade	Tipo histológico	Grau histológico	Grau nuclear	Componente in situ	Embolização vascular	Contorno tumor	desmoplasia	Linfócitos estroma	hialinização	necrose	túbulos
cb24714/09	SE	29	CDI	3	3	1	0	P	1	1	2	2	0
cb2559/10	SE	40	CDI	3	3	0	0	P	1	3	0	2	0
cb2590/11	S	31	CDI	3	3	0	0	P	1	1	0	3	0
cb26119/11	N	28	CDI	3	3	0	0	I	1	1	1	3	0
cb26216/09	SE	44	CDI	2	3	0	0	P	1	0	2	1	0
cb26403/11	S	38	CDI	3	3	0	NA	NA	1	1	0	0	0
cb26591/09	S	35	CDI	3	3	0	0	P	1	2	0	0	0
cb2674/11	SE	43	CDI	3	3	0	0	P	0	3	0	2	0
cb2696/11	NE	33	CDI	3	3	0	2	P	0	0	1	2	0
cb27102/11	N	35	CDI	3	3	0	0	P	1	1	1	2	0
cb27130/11	N	38	CDI	3	3	0	1	P	2	2	2	2	0
cb2756/11	NE	26	CDI	3	3	0	0	C	1	3	0	2	0
CB27576/11-2	S	35	CDI	3	3	0	0	C	0	3	0	1	1
cb27824/09	SE	32	CDI	3	3	1	1	P	2	1	1	2	0
cb28156/11	N	28	MET	3	3	1	1	C	1	2	0	1	0
cb28761/11	NE	45	CDI	3	3	1	0	I	2	2	0	1	0
cb29085/09	S	34	MEDUL	3	3	0	0	C	0	3	0	1	0
cb29520/11	N	32	CDI	3	3	0	0	I	1	0	0	3	0
cb29529/11	N	32	CDI	2	2	0	NA	NA	2	0	3	0	1
cb29537/11	CW	40	MET	2	2	1	0	P	3	2	0	1	2
cb30037/11	S	36	CDI	3	3	1	0	P	2	2	1	2	0
cb3007/11	NE	41	CDI	3	3	1	0	NA	1	0	2	1	0
cb30762/11	N	43	CDI	2	2	0	0	NA	2	2	0	0	0
cb31217/11	S	37	CDI	3	3	1	2	I	1	2	0	0	1
cb3484/11	S	37	CDI	3	3	0	0	C	1	3I	0	2	0
cb3487/10	S	31	MEDUL	3	3	0	0	C	0	3	0	2	0
cb390/11	NE	44	CDI	2	3	0	2	I	0	3	0	1	0
cb3970/10	CW	44	CDI	2	2	1	2	I	3	0	2	1	1

No. caso	Região	Idade	Tipo histológico	Grau histológico	Grau nuclear	Componente in situ	Embolização vascular	Contorno tumor	desmoplasia	Linfócitos estroma	hialinização	necrose	túbulos
cb4339/11	NE	43	CDI	3	3	0	0	C	1	3	0	1	0
cb435/10	SE	37	CDI	3	3	1	0	I	2	0	3	0	0
cb4446/11	NE	45	CDI	3	3	2	0	I	2	0	0	0	1
cb4652/11	NE	35	CDI	3	3	0	0	C	0	3	0	1	0
cb4736/11	S	36	CDI	3	3	1	2	P	0	2	1	2	0
cb4774/11	SE	43	CDI	3	3	0	0	P	1	3	0	1	0
cb5065/11	S	38	CDI	2	3	0	0	I	3	1	2	0	0
cb5332/11	S	41	MET	3	3	0	0	P				1	0
cb5531/11	N	42	CDI	2	3	0	0	I	2	2	1	0	1
cb585/10	N	36	CDI	3	3	0	1	P	1	0	0	0	0
cb6165/10	NE	33	CDI	3	3	0	1	C	1	2	2	1	0
cb6244/11	NE	40	CDI	2	3	0	0	C	2	2	2	0	1
cb6245/11	N	42	CDI	2	3	1	1	P	3	2	0	2	1
cb6257/11	NE	42	CDI	3	3	0	0	P	3	0	0	0	0
CB626/11	SE	29	CDI	2	3	0	2	NA	1	3	0	1	0
cb6260/11	SE	45	CDI	3	3	0	1	C	0	2	0	2	0
cb6325/10	N	45	CDI	3	3	1	2	I	3	0	2	1	0
cb6632/10	NE	35	CDI	2	3	0	0	P	1	2	0	1	0
cb6939/10	NE	38	CDI	3	3	3	0	I	2	2	0	0	1
cb710/11	CW	40	CDI	3	3	2	0	I	3	3I	0	0	0
cb7308/11	NE	45	CDI	3	3	1	2	C	1	2	2	2	0
cb7317/11	S	42	CDI	3	3	0	0	C	1	1	0	2	0
cb7383/10	SE	37	CDI	2	3	0	2	I	2	2	0	0	0
cb7468/10	S	33	CDI	3	3	0	0	P	1	0	1	2	0
cb7606/11	N	37	CDI	3	3	0	2	P	1	3	0	2	0
cb7747/11	SE	42	CDI	2	3	1	0	P	2	3	2	0	0
cb7813/11	SE	34	CDI	3	3	0	1	P	1	1	0	2	0
cb7824/11	N	40	CDI	3	3	0	0	P	1	2	1	3	2

No. caso	Região	Idade	Tipo histológico	Grau histológico	Grau nuclear	Componente in situ	Embolização vascular	Contorno tumor	desmoplasia	Linfócitos estroma	hialinização	necrose	túbulos
cb7836/11	N	34	CDI	2	2	0	0	P	1	1	0	0	0
cb8620/11	SE	32	CDI	3	3	0	0	P	1	2	0	1	0
cb8986/10	NE	39	CDI	3	3	0	0	P	2	2	0	2	0
cb8987/10	NE	42	CDI	2	2	0	0	I	2	0	0	0	0
cb9029/11	NE	43	CDI	3	3	0	1	P	0	2	1	1	0
cb9030/11	NE	38	CDI	3	3	2	1	I	2	1	0	2	0
cb9046/11	S	40	CDI	2	3	0	0	P	2	1	3	0	1
cb9344/11	SE	42	CDI	3	3	0	0	NA	2	0	2	2	0
sp10149/11	SE	33	CDI	2	3	0	0	P	1	3	1	0	0
sp13346/11	S	42	CDI	3	3	0	0	P	3	1	0	1	0

Vide texto para explicação dos escores

NA: não avaliável

Apêndice 2 – Expressão imunoistoquímica em 118 tumores mamários triplo-negativos de pacientes de até 45 anos

CASO	catenina	CADERiNA	RA	Ki67	CK8/18	CK5/6	EGFR	VIMENT	ACTiN	p63	ALDH1-T	ALDH1-E	CK7	CK14	p16	CLAUD 3	CLAUD 4	CLAUD 7
cb10021/11	3	3	0	80	3	0	0	1	0	0	0	2	3	0	0	3	3	3
cb10155/11	1	0	0	70	3	0	1	1	1	0	0	2	2	0	1	3	3	3
cb10271/10	3	3	0	25	3	0	3	1	1	0	0	2	3	0	0	2	2	2
cb10615/11	3	1	0	25	3	0	0	0	0	0	0	2	3	0	0	1	1	1
cb10650/11	3	3	0	70	3	1	0	1	0	0	0	2	3	1	0	2	2	2
cb11052/11	1	1	0	5	3	0	3	1	0	0	1	1	3	0	0	2	2	1
cb11094/11	3	2	0	80	3	0	2	1	1	0	1	0	2	1	1	2	3	3
cb11950/11	NA	2	0	20	NA	NA	3	1	0	0	0	NA	NA	NA	0	1	2	1
cb12084/11	3	NA	NA	75	3	2	1	NA	0	0	0	0	3	1	NA	NA	NA	NA
cb12148/10	2	2	0	25	3	2	3	0	0	1	2	3	3	0	0	2	2	3
cb12160/11	0	0	0	60	1	0	3	1	0	0	3	1	0	0	1	1	2	1
cb12544/11	2	2	0	90	3	0	1	1	1	0	1	3	3	0	1	3	2	3
cb12714/10	1	0	0	35	2	1	1	1	0	1	0	2	0	0	0	1	1	2
cb13093/11	2	0	0	90	3	0	0	1	0	0	0	2	2	0	1	1	2	3
cb13617/11	1	1	0	80	3	0	1	1	0	0	0	0	2	1	1	1	3	3
cb13654/11	3	3	0	70	3	2	1	1	0	0	0	1	3	0	1	3	3	3
cb14264/11	2	2	0	35	3	0	3	1	0	0	1	2	3	0	0	1	2	3
cb14861/11	3	3	0	80	3	2	3	1	0	0	0	2	3	1	0	3	3	3
cb15484/10	2	1	0	35	3	0	0	1	0	0	1	3	3	0	1	1	2	2
cb15635/10	2	2	0	35	3	1	3	1	0	0	0	2	3	1	1	3	3	3
cb15786/11	3	3	85	15	3	1	0	0	0	0	0	2	3	0	0	2	2	3
cb16101/11	3	3	0	90	3	0	3	1	0	0	0	1	3	2	1	2	3	3
cb16137/10	3	2	0	80	3	2	1	1	1	0	0	1	3	0	1	3	3	3
cb16304/11	3	3	0	40	3	2	2	0	0	0	0	2	3	2	1	3	3	3
cb16778/11	3	2	0	15	3	1	3	1	0	0	0	1	3	2	1	3	3	3
cb17054/09	3	2	0	90	3	2	2	1	0	0	0	1	3	1	0	NA	NA	NA
cb17135/09	3	2	0	60	3	2	3	1	0	0	0	2	3	1	1	2	3	3
cb17370/09	3	3	0	70	3	2	2	1	0	1	0	0	3	1	1	1	1	2
cb17856/09	0	0	0	80	3	0	0	1	0	0	0	0	3	0	0	0	0	1
cb17870/09	2	2	0	90	3	3	3	1	0	0	0	1	2	2	1	0	1	1
CB1923/11	2	1	0	40	3	0	3	1	0	0	0	1	3	0	0	3	3	3
cb1934/11	2	1	0	90	3	1	3	1	0	0	0	1	3	3	0	1	2	2
cb19392/11	3	3	NA	30	3	NA	0	1	1	0	0	2	3	1	0	2	2	2
cb20111/09	2	2	0	75	3	0	0	1	1	1	0	2	3	2	1	1	2	2
cb20114/09	2	1	0	25	3	0	1	1	0	0	0	2	2	0	0	3	3	2
cb20122/09	3	2	0	25	3	3	3	1	0	1	1	1	3	1	0	1	2	3
cb2101/11	3	3	0	85	3	0	0	1	1	0	0	1	3	3	1	1	3	3
cb2104/11	NA	NA	0	20	3	0	0	1	0	0	NA	3	0	0	NA	1	1	1
cb21819/09	0	0	0	35	3	0	0	1	0	0	0	0	2	3	1	2	3	3
cb21903/09	3	2	0	90	3	0	1	1	0	0	0	1	3	2	0	NA	NA	NA
cb220/10	2	0	0	95	3	1	2	1	1	1	0	1	3	0	1	2	2	1
cb22109/09	2	NA	0	80	3	0	0	1	0	0	0	1	3	0	1	2	3	3
cb22278/11	3	2	0	85	3	1	0	1	1	1	0	1	2	2	0	1	3	1
cb22388/11	3	3	0	20	3	3	3	0	0	1	1	1	3	3	0	1	2	3

CASO	catenina	CADERiNA	RA	Ki67	CK8/18	CK5/6	EGFR	Viment	ACTiN	p63	ALDH1-T	ALDH1-E	CK7	CK14	p16	CLAUD 3	CLAUD 4	CLAUD 7
cb2288/11	3	3	0	15	3	3	3	1	0	1	0	1	3	1	0	0	1	3
cb22908/09	3	3	100	40	3	1	3	0	0	0	0	2	3	0	0	3	2	3
cb2378/11	3	0	0	20	3	0	0	1	1	0	0	1	3	0	1	0	2	3
cb23854/11	2	1	0	95	3	0	2	1	0	0	1	1	1	0	1	0	NA	3
cb23864/11	3	3	0	22	3	2	2	1	1	0	0	2	1	0	1	3	3	3
cb24163/11	3	3	0	80	3	3	1	1	0	0	1	2	3	0	1	2	3	3
cb24277/11	3	1	0	35	3	1	0	1	1	0	0	1	3	3	0	2	2	1
cb24424/11	0	0	0	10	3	0	0	1	0	0	0	2	3	0	0	0	1	2
cb24714/09	3	2	0	80	3	3	3	1	0	0	0	1	3	1	1	3	3	3
cb2559/10	3	3	0	35	3	1	3	0	0	0	0	2	2	0	0	2	2	3
cb2590/11	3	2	0	90	3	3	2	1	0	1	0	1	2	1	0	2	3	3
cb26119/11	NA	3	0	75	3	1	3	1	1	0	0	1	3	0	1	2	3	3
cb26216/09	3	3	0	35	3	2	3	1	0	1	0	1	3	1	1	2	3	3
cb26403/11	3	3	0	45	3	1	3	1	1	0	0	1	3	0	0	2	3	3
cb26591/09	3	2	0	90	3	0	0	1	0	0	0	1	3	0	1	NA	NA	NA
cb2674/11	3	2	0	95	3	0	1	1	1	0	1	3	1	0	1	2	2	3
cb2696/11	3	2	0	95	2	0	3	1	0	0	0	2	0	0	1	0	0	2
cb27102/11	NA	2	0	80	3	1	0	1	1	0	0	1	3	0	1	NA	NA	NA
cb27130/11	2	2	0	15	3	3	3	0	0	1	0	1	3	1	0	1	1	3
cb2756/11	2	1	0	80	3	3	2	1	0	0	0	3	3	0	1	1	2	3
CB27576/11-2	3	2	0	70	3	0	0	1	0	0	1	3	1	0	1	3	3	3
cb27824/09	3	3	0	80	3	3	3	1	1	0	0	1	3	3	1	1	3	1
cb28156/11	3	3	0	90	3	3	3	1	0	1	0	2	3	2	1	2	3	3
cb28761/11	3	3	0	80	3	NA	1	1	1	0	0	3	3	0	1	1	2	3
cb29085/09	3	3	0	95	3	0	3	1	0	0	0	3	3	0	1	3	3	3
cb29520/11	2	2	0	15	3	0	0	1	0	0	0	1	3	2	1	1	2	2
cb29529/11	3	3	70	10	3	0	0	0	0	0	0	2	0	0	0	2	3	3
cb29537/11	3	3	0	75	3	0	3	1	0	0	2	1	2	0	0	1	2	3
cb30037/11	3	2	0	75	3	2	3	1	0	0	0	2	3	1	0	3	3	3
cb3007/11	2	2	0	75	3	0	0	1	1	0	0	1	1	2	1	1	2	3
cb30762/11	3	3	0	45	3	0	3	1	0	0	0	1	3	0	0	2	3	3
cb31217/11	3	3	0	75	3	1	3	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	NA	2	2	3
cb3484/11	2	0	0	85	3	3	0	1	0	0	0	3	3	3	1	1	2	3
cb3487/10	2	0	0	70	3	1	1	1	1	1	0	3	3	1	1	3	3	3
cb390/11	1	0	0	65	3	0	0	1	0	0	3	2	1	0	0	2	2	2
cb3970/10	3	3	95	10	3	1	0	1	0	0	0	3	3	0	0	1	1	3
cb4339/11	3	3	0	75	3	1	3	1	0	0	1	3	3	0	1	3	3	2
cb435/10	3	3	0	20	3	1	1	1	1	0	0	1	3	1	0	0	0	1
cb4446/11	3	2	0	80	3	3	3	1	1	1	1	3	2	3	0	3	3	3
cb4652/11	3	1	0	60	3	1	1	1	0	1	0	1	3	0	1	2	2	2
cb4736/11	3	2	0	30	3	2	1	1	1	0	0	2	3	0	NA	NA	NA	NA
cb4774/11	NA	2	0	45	3	2	0	1	0	0	0	1	2	3	1	NA	NA	NA
cb5065/11	3	3	0	35	3	2	3	1	1	1	0	1	3	1	0	2	3	3
cb5332/11	3	1	0	25	3	3	1	1	0	0	0	1	3	3	0	1	2	2
cb5531/11	2	3	0	55	3	3	3	1	1	0	0	1	3	2	1	1	2	2
cb585/10	2	2	0	65	3	0	2	1	0	1	0	2	3	0	0	3	3	1
cb6165/10	1	0	0	40	3	1	1	1	0	0	0	2	3	1	0	2	2	3

CASO	catenina	CADERiNA	RA	Ki67	CK8/18	CK5/6	EGFR	Viment	ACTiN	p63	ALDH1-T	ALDH1-E	CK7	CK14	p16	CLAUD 3	CLAUD 4	CLAUD 7
cb6244/11	3	3	0	80	3	1	3	1	1	1	0	1	3	1	1	1	2	3
cb6245/11	0	1	0	5	3	2	0	1	0	0	0	2	3	0	0	0	1	2
cb6257/11	2	1	80	20	3	2	3	1	0	1	0	1	3	1	0	2	2	3
CB626/11	3	3	0	60	3	1	3	1	1	0	0	2	3	0	0	3	3	3
cb6260/11	3	1	0	30	3	2	1	1	1	0	0	2	3	2	1	3	3	3
cb6325/10	3	3	0	70	3	1	3	1	0	0	0	1	3	2	1	2	3	3
cb6632/10	3	3	0	35	3	1	2	1	1	0	0	2	3	0	1	3	3	2
cb6939/10	3	3	0	80	3	2	3	1	0	0	0	2	3	0	0	3	3	3
cb710/11	3	3	0	50	3	0	1	1	0	0	0	1	3	0	0	3	3	3
cb7308/11	3	3	0	35	1	0	2	1	0	0	0	3	0	0	0	1	2	1
cb7317/11	3	3	0	7	3	1	3	1	1	0	0	3	3	0	0	2	2	3
cb7383/10	2	2	0	35	3	1	1	1	0	0	0	1	3	2	1	3	3	3
cb7468/10	2	1	0	90	3	1	3	1	0	0	0	1	2	2	1	2	1	2
cb7606/11	3	2	0	35	3	2	0	1	0	0	1	1	3	2	1	3	3	3
cb7747/11	3	2	0	70	3	0	0	1	0	0	0	1	3	0	1	2	3	3
cb7813/11	1	2	0	20	3	1	1	0	0	0	0	2	3	0	0	1	2	1
cb7824/11	3	2	0	95	3	3	3	1	0	1	1	1	3	3	1	1	2	3
cb7836/11	2	1	0	25	3	0	0	1	0	0	0	0	3	0	1	NA	NA	NA
cb8620/11	3	2	0	40	3	0	2	1	1	0	1	1	3	0	0	2	2	3
cb8986/10	1	0	0	90	3	0	3	1	0	0	0	2	2	1	1	3	2	3
cb8987/10	3	3	0	90	3	0	3	0	0	1	0	2	2	0	0	2	3	2
cb9029/11	3	2	0	75	2	0	3	1	0	0	0	1	2	1	0	0	1	0
cb9030/11	3	3	85	80	3	3	3	1	1	1	1	2	0	1	1	0	1	3
cb9046/11	3	3	0	20	3	3	3	1	1	0	1	1	3	1	0	3	3	3
cb9344/11	2	2	0	95	3	0	0	1	1	0	0	0	3	0	1	1	2	3
sp10149/11	2	NA	0	60	3	0	1	1	1	0	0	1	2	0	0	NA	NA	NA
sp13346/11	3	2	NA	70	3	NA	1	1	NA	1	0	0	NA	3	0	0	1	3

Apêndice 3 – Subtipo baseado no perfil imunoistoquímico

Idade	Ki-67	Perfil imunoistoquímico					
		apocrino	mesenquimal	mioepitelial	Célula tronco	basal	claudina-baixa
41	80	0	1	0	0	0	1
43	70	0	1	1	0	0	1
34	25	0	1	1	0	0	1
38	25	0	0	0	0	0	0
37	70	0	1	0	0	1	1
40	5	0	1	0	1	0	0
27	80	0	1	1	1	1	1
45	20	0	1	0	0		0
41	75			0	0	1	
42	25	0	0	1	1		1
39	60	0	1	0	1	0	0
44	90	0	1	1	1	0	1
43	35	0	1	1	0		0
38	90	0	1	0	0	0	0
43	80	0	1	0	0	1	0
44	70	0	1	0	0		1
39	35	0	1	0	1	0	0
45	80	0	1	0	0	1	1
41	35	0	1	0	1	0	0
34	35	0	1	0	0	1	1
45	15	1	0	0	0		1
32	90	0	1	0	0	1	1
43	80	0	1	1	0		1
43	40	0	0	0	0	1	1
34	15	0	1	0	0	1	1
44	90	0	1	0	0	1	
38	60	0	1	0	0	1	1
39	70	0	1	1	0	1	0
44	80	0	1	0	0	0	0
38	90	0	1	0	0	1	0
33	40	0	1	0	0	0	1
45	90	0	1	0	0	1	0
31	30		1	1	0	1	1
44	75	0	1	1	0	1	0
35	25	0	1	0	0	0	1
42	25	0	1	1	1	1	0
31	85	0	1	1	0	1	0
40	20	0	1	0		0	0
43	35	0	1	0	0	1	1
37	90	0	1	0	0	1	
32	95	0	1	1	0		0
27	80	0	1	0	0	0	1
40	85	0	1	1	0	1	0
40	20	0	0	1	1	1	0
38	15	0	1	1	0	1	0
40	40	1	0	0	0		1

Idade	Ki-67	Perfil imunoistoquímico					
		apocrino	mesenquimal	mioepitelial	Célula tronco	basal	claudina-baixa
30	95	0	1	0	1	0	0
40	22	0	1	1	0		1
43	80	0	1	0	1		1
40	35	0	1	1	0	1	0
40	10	0	1	0	0	0	0
29	80	0	1	0	0	1	1
40	35	0	0	0	0		1
31	90	0	1	1	0	1	1
28	75	0	1	1	0		1
44	35	0	1	1	0	1	1
38	45	0	1	1	0	1	1
35	90	0	1	0	0	0	
43	95	0	1	1	1	0	1
33	95	0	1	0	0	0	0
35	80	0	1	1	0	1	
38	15	0	0	1	0	1	0
26	80	0	1	0	0	1	0
35	70	0	1	0	1	0	1
32	80	0	1	1	0	1	0
28	90	0	1	1	0	1	1
45	80	0	1	1	0		0
34	95	0	1	0	0	0	1
32	15	0	1	0	0	1	0
32	10	1	0	0	0	0	1
40	75	0	1	0	1	0	0
36	75	0	1	0	0	1	1
41	75	0	1	1	0	1	0
43	45	0	1	0	0	0	1
37	75	0				1	1
37	85	0	1	0		1	0
31	70	0	1	1	0	1	1
44	65	0	1	0	1	0	1
44	10	1	1	0	0	1	0
43	75	0	1	0	1	1	1
37	20	0	1	1	0	1	0
45	80	0	1	1	1	1	1
35	60	0	1	1	0	1	1
36	30	0	1	1	0	1	
43	45	0	1	0	0	1	
38	35	0	1	1	0	1	
41	25	0	1	0	0	1	0
42	55	0	1	1	0	1	0
36	65	0	1	1	0	0	0
33	40	0	1	0	0	1	
40	80	0	1	1	0	1	0
42	5	0	1	0	0	1	0
42	20	1	1	1	0	1	
29	60	0	1	1	0	1	

Idade	Ki-67	Perfil imunoistoquímico					
		apocrino	mesenquimal	mioepitelial	Célula tronco	basal	claudina-baixa
45	30	0	1	1	0	1	
45	70	0	1	0	0	1	
35	35	0	1	1	0	1	
38	80	0	1	0	0	1	
40	50	0	1	0	0	0	
45	35	0	1	0	0	0	0
42	7	0	1	1	0	1	
37	35	0	1	0	0	1	
33	90	0	1	0	0	1	0
37	35	0	1	0	1	1	
42	70	0	1	0	0	0	
34	20	0	0	0	0	1	0
40	95	0	1	1	1	1	0
34	25	0	1	0	0	0	
32	40	0	1	1	1	0	
39	90	0	1	0	0	1	
42	90	0	0	1	0	0	
43	75	0	1	0	0	1	0
38	80	1	1	1	1	1	0
40	20	0	1	1	1	1	
42	95	0	1	1	0	0	0
33	60	0	1	1	0	0	
42	70		1	1	0	1	0