HIROFUMI IYEYASU

Estudo de moléculas de adesão no câncer de mama bilateral

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

Área de concentração: Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Soares

São Paulo

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Iyeyasu, Hirofumi
Estudo de moléculas de adesão no câncer de mama bilateral / Hirofumi Iyeyasu. -- São Paulo, 2010.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Oncologia.
Orientador: Fernando Augusto Soares.

Descritores: 1.Carcinoma ductal de mama 2.Mama bilateral 3.Moléculas de adesão 4.Imunoistoquímica 5.Análise em microsséries

USP/FM/DBD-433/10

「天は人の上に人を造らず
人の下に人を造らず」

“O homem não nasce acima do homem, o homem não nasce abaixo do homem”

Confucio, 551 a.C. – 479 a.C.

DEDICATÓRIA

A Noriko Margarida Mogi, fiel companheira, mãe e esposa dedicada,

pela paciência e estímulo e a Rafael Hideaki Mogi Iyeyasu,

alicerce e incentivo para novas conquistas.

A meus pais, Hiromu Iyeyasu (*in memorian*) e Hiroko Iyeyasu (*in memorian*), pela

dedicação e abdicação para minha formação.

A meus irmãos, Tsunamiti Iyeyasu e Kazushi Iyeyasu,

pelo incentivo e pelo companherismo.

AGRADECIMENTOS

Hospital A.C. Camargo (Antônio Cândido Camargo) e seus pacientes pela minha formação oncológica e pela tese.

Prof. Dr. Ricardo Renzo Brentani pela oportunidade de completar minha pós-graduação.

Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, exemplo de dedicação ao espírito acadêmico e científico, pela honra de ter me aceitado como aluno de doutorado, pelas sugestões e pelos ensinamentos.

Prof[a]. Dra. Maria Mitzi Brentani, pelas sugestões e pela disposição incansável para auxiliar na formação dos pós-graduandos.

Dra. Maria Dirlei M. Ferreira de Souza Bergaminini, pelo preparo do TMA, pela revisão e pela leitura das lâminas. Agradeço pela dedicação, pela paciência e pela abdicação para completar a tese.

Prof. Dr. Roger Chammas, pela oportunidade para eu completar mais uma etapa da minha vida profissional.

Dr. Caetano da Silva Cardeal e Dra. Maria do Socorro Maciel, amigos e companheiros de residência, pelo incentivo e pelo estímulo.

Dra. Solange Maria Torchia de Carvalho, companheira de doutorado, pela ajuda no levantamento dos dados.

Clara Josino, pela dedicação e pelo profissionalismo na obtenção dos blocos de parafina, sem os quais não seria possível realizar este estudo.

Carlos Ferreira Nascimento, exemplo de dedicação ao trabalho, pelo preparo do TMA.

Severino da Silva Ferreira, pelo preparo das lâminas para revisão e pelo preparo do TMA.

Sueli Nonogaki, pela experiência e pela habilidade no preparo da imunoistoquímica e na referência dos anticorpos.

Suely Francisco, pela revisão das referências e pela formatação da tese.

Amandina Morbeck, pela revisão ortográfica e incentivo.

Elizangela Nivardo Dias, pelas orientações burocráticas durante a elaboração da tese.

Rosilene Arruda Carvalho Botelho, pela assistência junto à comissão de pós-graduação.

Maria José Gonçalves Benevides, pelas orientações para a completa finalização da tese.

Prof. Dr. Carlos Alberto de Bragança Pereira, pela assistência na análise estatística dos dados e pela paciência.

Aline Santos Damascena, pela finalização da análise estatística dos dados.

Aos meus amigos do Departamento de Mastologia, pela paciência e pelo incentivo durante a elaboração da tese.

A todos aqueles que diretamente ou indiretamente contribuíram para a realização deste projeto.

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

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journal Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias.* Elaborado por Annelise Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valeria Vilhena. 2ª ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação, 2004.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *Lis of Journal Indexed in Index Medicus.*

SUMÁRIO

Lista de figuras.....xi
Lista de tabelas.....xiii
Lista de quadros.....xv
Lista de siglas.....xvi
Resumo.....xvii
Summary.....xviii

1 Introdução..... 1

2 Objetivo..... 3

3 Justificativa..... **5**

4 Revisão da Literatura..... 8
4.1 Câncer de Mama Bilateral..... 9
4.2 Estudos da Origem Comum no Câncer de Mama Bilateral..... 14
4.3 Transição Epitélio–Mesenquimal (TEM)..... 23
4.4 Moléculas de Adesão Celular..... 26
4.4.1 Claudina 4 e 7..... 28
4.4.2 E-caderina (ecad)..... 34
4.4.3 β-catenina..... 40
4.4.4 Classificação Molecular do Câncer de Mama sem outras especificações..... 44
4.5 TMA (Tissue Microarray)..... 46

5 Métodos..... 48
5.1 Casuística..... 49
5.1.1 Critérios para Seleção..... 49
5.1.2 Dados Demográficos e Clínicos..... 50
5.1.3 Estadiamento Clínico..... 50
5.1.4 Evolução da Doença..... 51
5.2 Métodos..... 52

5.2.1 Dinâmica do Atendimento..... 52
5.2.2 Métodos Cirúrgicos, Radioterápicos e Sistêmicos..... 54
5.2.3 Revisão de Lâminas e Preparo do TMA..... 56
5.2.4 Imunoistoquímica..... 58
5.2.5 Avaliação das Expressões Imunoistoquímicas..... 59
5.2.6 Métodos Estatísticos..... 66

6 Resultados..... 67
6.1 Dados Demográficos e Clínicos..... 68
6.2 Relativo ao Tumor Primário e ao Tumor da Mama Contralateral..... 69
6.3 Tratamento Cirúrgico..... 70
6.4 Linfadenectomia Axilar..... 70
6.5 Tratamento Radioterápico..... 71
6.6 Tratamento Sistêmico..... 72
6.7 Variáveis histopatológicas do tumor primário e do tumor da mama contralateral..... 73
6.8 Fatores Prognósticos e Preditivos..... 76
6.8.1 Receptor de Estrógeno e Progesterona..... 76
6.8.2 Expressão de (C-erbB) Her2; P 53; Ki-67; Ck-4 E Ck-14..... 77
6.8.3 Expressão das Moléculas de Adesão e da β–Catenina..... 79
6.8.4 Perfil Fenotípico do Tumor Primário e do Tumor da Mama Contralateral.... 81
6.8.5 Distribuição das Moléculas de Adesão em Relação ao Perfil Fenotípico do Tumor Primário e da Mama Contralateral..... 82
6.8.6 Variáveis histopatológicas e dos marcadores nos tumores sincrônicos e metacrônicos..... 84
6.9 Estudo Estatístico das Variáveis Histopatológicas, dos Fatores Prognósticos e Preditivos e das Moléculas de Adesão..... 87

7 Discussão..... 89
7.1 Variáveis Clínicas..... 90
7.2 Variáveis Histopatológicas..... 91
7.3 Receptores de Estrógeno e de Progesterona, Her-2, Ki-67 E Citoceratinas-4 E 14..... 91
7.4 Perfil Molecular..... 92

7.5 Expressão das Moléculas de Adesão..... 93
7.6 Considerações Finais..... 94

8 Conclusões..... 96

9 Anexos..... 98
Anexo 1 Quadro Geral Pacientes..... 99
Anexo 2 Questionário..... 101
Anexo 3 Distribuição dos tumores no TMA..... 105
Anexo 4 Tecnica de Imunoistoquimica..... 106

10 Referências..... 108

Apêndices
Apêndice 1 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo
Apêndice 2 Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Etapas do processo de metástase..... 24

Figura 2 Modificações celulares na transição epitélio–mesenquimal..... 25

Figura 3 Tipos de aderência..... 27

Figura 4 Junção ocludente com as proteínas..... 29

Figura 5 Função das claudinas..... 29

Figura 6 Expressão das claudinas nos tumores..... 32

Figura 7 Expressão das claudinas no câncer de mama..... 32

Figura 8 ecad na junção aderente..... 35

Figura 9 Perfil fenotípico baseado na expressão gênica..... 40

Figura 10 β–catenina e seus ligantes..... 45

Figura 11 Técnica de confecção de TMA..... 46

Figura 12 Exemplo de TMA (receptor estrógeno)..... 47

Figura 13 Ilustração esquemática do método de avaliação por IHQ..... 60

Figura 14 Claudina-4 positiva..... 61

Figura 15 Claudina-4 negativa..... 61

Figura 16 Claudina-4 positiva em maior aumento. 61

Figura 17 Claudina-7 positiva..... 62

Figura 18 Claudina-7 negativa..... 62

Figura 19 Claudina-7 positiva em maior aumento..... 62

Figura 20 ecad positiva..... 63

Figura 21 ecad negativa..... 63

Figura 22 ecad positiva em maior aumento..... 63

Figura 23 β-catenina positiva..... 64

Figura 24 β-catenina negativa..... 64

Figura 25 β-catenina positiva em maior aumento..... 64

Figura 26 β-catenina positiva em maior aumento..... 64

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Distribuição dos tamanhos (T) e estadiamento clínico entre os tumores..... 69

Tabela 2 Distribuição do tratamento cirúrgico entre os tumores..... 70

Tabela 3 Distribuição das variáveis da linfadenctomia axilar..... 71

Tabela 4 Distribuição das variáveis do tratamento radioterápico entre os tumores..... 72

Tabela 5 Distribuição das variáveis do tratamento sistêmico..... 72

Tabela 6 Distribuição das variáveis histopatológicas entre os tumores..... 73

Tabela 7 Estudo de concordância dos graus histológico e nuclear entre os tumores..... 74

Tabela 8 Estudo de concordância do infiltrado e da necrose entre os tumores.. 75

Tabela 9 Estudo de concordância do grau de desmoplasia e de mitose entre os tumores..... 75

Tabela 10 Distribuição dos receptores de estrógeno e de progesterona entre os tumores..... 76

Tabela 11 Estudo de concordância dos receptores de estrógeno e de progesterona entre os tumores..... 77

Tabela 12 Distribuição do Her-2, do Ki-67 e do p53 entre os tumores..... 77

Tabela 13 Estudo de concordância do Her-2 e do Ki-67 entre os tumores..... 78

Tabela 14 Distribuição das citoceratinas entre os tumores..... 78

Tabela 15 Estudo de concordância do Ck-14 e do p53 entre os tumores..... 79

Tabela 16 Distribuição das moléculas de adesão entre os tumores..... 80

Tabela 17 Estudo de concordância das claudinas entre os tumores..... 80

Tabela 18 Estudo de concordância da E-caderina e da β-catenina entre os tumores..... 81

Tabela 19 Distribuição fenotípica ente os tumores..... 82

Tabela 20 Estudo de concordância do fenótipo entre os tumores..... 82

Tabela 21 Estudo de concordância do perfil fenotípico da mama 1 com as moléculas de adesão..... 83

Tabela 22 Estudo de concordância do perfil fenotípico da mama 2 com as moléculas de adesão..... 83

Tabela 23 Distribuição das variáveis histopatológicas e dos marcadores entre os tumores metacrônicos..... 84

Tabela 24 Distribuição das variáveis histopatológicas e dos marcadores entre os tumores sincrônicos..... 86

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 Análise da clonalidade baseado em métodos moleculares e de cariótipo..... 21

Quadro 2 Análise de clonalidade baseado em IHQ..... 22

Quadro 3 Tipos de complexo celulares mediadores da adesão celular..... 26

Quadro 4 Expressão das claudinas e localização nos cromossomos..... 30

Quadro 5 Anticorpos pesquisados, clones e diluição utilizada..... 59

Quadro 6 Teste McNemar das variáveis estudadas..... 88

LISTA DE SIGLAS

CCC	Complexo e-Cadherina Catenina
CIE	Componente Intraductal Extenso
CK	Citoceratina
CLD	Claudina
ecad	E-cadherina
FDA	Food Drug Administration
FISH	Fluorescent in situ Hibridyzation
HUMARA	Human Androgen Receptor
IHC	Imunoistoquimica
IS	Intensity Score
JAM	Junctional Adhesion Molecules
JO	Junção Ocludente
LOH	Loss of Heterozigozy
PS	Proportion Score
RE	Receptor de Estrogeno
RFLP	Restriction Fragment Lenght Polymorphism
RPg	Receptor De Progesterona
SBR	Scarf, Bloom e Richardson
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism
TEM	Transição Epitelio Mesenquimal
TMA	Tissue Microarray
TME	Transição Mesenquima Epitelial
TMX	Tamoxifen
TS	Total Score

RESUMO

Iyeyasu H. *Estudo de moléculas de adesão no câncer de mama bilateral*. [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 136p.

Carcinoma da mama com apresentação bilateral é uma doença pouco avaliada na literatura, com raros trabalhos científicos que comparam os aspectos moleculares de ambos os tumores. No presente estudo, analisamos os tumores de 45 pacientes portadoras de carcinoma ductal invasivo bilateral em relação às expressões de claudinas-4 e 7, de E-caderina e de β-catenina por meio de imunoistoquímica em TMA. Além desses marcadores, analisamos o estado dos receptores de estrógeno e de progesterona, bem como diversas características histopatológicas (grau histológico, nuclear, mitose, infiltrado, desmoplasia e necrose). A amostra foi caracterizado por média de idade de 52,4 anos e os tumores foram divididos em mama primário (MP) e mama secundário (MS). Não houve diferenças entre os dois grupos (MP e MS) nos marcadores testados, sendo que a expressão foi coincidente nas seguintes proporções: claudina-4 (83,8%, p=0,61), claudina-7 (82,2%, p=0,29), E-caderina (81%, p=0,48), β-catenina (89,7%, p=0,48), receptor de estrogeno (66%, p=0.75) e receptor de progesterona (55%, p=0.99). Em relação aos aspectos morfológicos, grau histológico (SBR) II, infiltrado inflamatório discreto, necrose, desmoplasia moderada e índice mitótico (<10fm/10cga) foram coincidentes em 57,8%, 60%, 55,6%, 63,6% e 55,6%, respectivamente. Os presentes resultados nos permitem inferir que os tumores de apresentação bilateral são, em sua maioria, similares do ponto de vista morfológico e da expressão dos marcadores testados.

Descritores: 1. Carcinoma ductal de mama 2. Mama bilateral 3. Moléculas de adesão 4. Imunoistoquímica 5. Análise em microsséries

SUMMARY

Iyeyasu H. *Analyse of adhesion molecules in bilateral breast câncer.* [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010. 136p.

Forty-five patients with invasive ductal carcinoma were evaluated for the expression of claudin-4, claudin-7, E-cadherin, and β-catenin through tissue microarray (TMA) and immunohistochemistry (IHC) analysis. Besides these markers, estrogen (ER) and progesterone receptor (PR) status was analyzed, in addition to histopathologic characteristics, i.e., histologic grade, nuclear, mitoses, infiltrate, desmoplasia, and necrosis. Tumors were divided into primary breast (PB) and secondary breast (SB). The expression of claudin-4 and -7 was coincident in PB and SB in 83.78% and 82.22% respectively. The expression of β-catenin and E-cadherin in PB and SB was coincident in 89.74% and 80.95% respectively. Estrogen receptor status was (+) in both breasts in 66%, while progesterone receptor status (+) was in 55%. The histological grade using the Nottingham-modified Scarff-Bloom-Richardson grading system (MSBR) showed mild infiltrate, necrosis (+), moderate desmoplasia and mitotic index (<10) was coincident in 57.77%, 60.00%, 55.55%, 63.63% and 55.55% respectively. The degree of agreement showed claudin-4 (p=0.61), claudin-7 (p=0.29), E-cadherin (p=0.48), and β-catenin (p=0.48). The expression of claudin-4 and -7, E-cadherin and β-catenin present a strong agreement between tumors, showing that bilateral tumors are not different. Histopathologic characteristics showed a lesser agreement between tumors.

Descriptors: 1. Invasive ductal carcinoma 2. Bilateral breast 3. Adhesion molecules 4. Imunoistoquímica 5. Microarray.

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente e a segunda causa de mortalidade entre as mulheres. No mundo, em 2008, a incidência mais alta de câncer de mama foi de 89,9/100.000 habitantes na Europa Ocidental, com mortalidade de 7,5/100.000 habitantes. Por outro lado, as incidências mais baixas foram encontradas na Ásia Oriental e na América Central, com 26/100.000 habitantes e mortalidade de 6 a 8/100.000 habitantes. Na América do Sul, a incidência e a mortalidade estão em torno de 44,3/100.000 e de 3,2/100.000 habitantes, respectivamente (Globocan 2008). Nos Estados Unidos da America (EUA), estima-se que ocorram cerca de 209.060 casos novos (28% de todos os tumores nas mulheres) e que morram cerca de 40.230 (15%). Contudo, a mortalidade vem diminuindo gradativamente desde 1991, com variação negativa de 22,5% (Jemal et al., 2010).

No Brasil, em 2010, segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), serão diagnosticados em torno de 50.000 casos novos, com incidência estimada de 49/100.000 habitantes. Infelizmente, a mortalidade continua a aumentar, provavelmente por causa de diagnóstico tardio (Ministério da Saúde 2009).

Melhora na terapêutica, associada ao diagnóstico de casos em estádios mais precoces, tende a aumentar a sobrevida global das pacientes, o que, por outro lado, também aumenta o número de pacientes sob risco de desenvolver um segundo câncer na mama contralateral. Estimativas referem que esse risco é de duas a seis vezes maior que a população geral. Assim, o entendimento dos aspectos clínico, morfológicos e moleculares do câncer de mama bilateral tem grande importância por causa das implicações terapêuticas, epidemiológicas e da prevenção.

OBJETIVO

2 OBJETIVO

Comparar, por meio dos aspectos morfológicos tradicionais, a expressão de marcadores (p53, claudinas-4 e 7, E-caderina [ecad] e β-catenina) e do perfil molecular por imunoistoquímica (IHC) os tumores ocorridos na primeira mama com os carcinomas ocorridos na mama contralateral.

JUSTIFICATIVA

3 JUSTIFICATIVA

No mundo, assim como no Brasil, câncer de mama é umas das neoplasias mais incidentes nas mulheres. Contudo, relatos dos EUA mostram diminuição gradativa da mortalidade desde 1991, apesar do aumento da incidência (Jemal et al., 2010). Segundo especialistas, essa observação provavelmente decorre do diagnóstico precoce e da melhora na terapêutica. Esse fenômeno ainda não é realidade no Brasil, onde ainda observamos aumento da mortalidade. Porém, o câncer de mama apresenta prognóstico relativamente bom se diagnosticado em sua fase inicial. Estima-se que a sobrevida média global cumulativa após cinco anos seja de 65% nos países desenvolvidos e de 56% nos países em desenvolvimento. Na população mundial, essa sobrevida está em torno de 61%. Assim, o número de pacientes sob risco de apresentar câncer na mama oposta é relativamente significativo. O risco estimado está em torno de 0,4% a 0,8% ao ano para mulheres tratadas e 5% a 10% delas desenvolverão a neoplasia na mama oposta. Esse risco é duas a seis vezes mais alto que o da população geral (Imyanitov e Hanson, 2003).

Faz alguma diferença para o clínico saber se a neoplasia na mama oposta é primária ou metastática? Sim, faz uma grande diferença, pois se a neoplasia da mama oposta for considerada primária, assim deve ser tratada; se for metastática, o tratamento sistêmico talvez seja o mais adequado. Assim, justifica-se o estudo da neoplasia na mama oposta, pois tem grande influência na conduta médica.

Na literatura consultada não encontramos estudos como este, que analisem o papel das moléculas de adesão (ecad e claudinas [CLD] 4 e 7), além do papel da β-

catenina e do p53 associado ao perfil fenotípico (luminal-A, luminal-B, hiperexpressão de Her-2, basal-like e triplo negativo) em 45 casos de câncer de mama bilateral tipo ductal invasivo.

REVISÃO DA LITERATURA

4 REVISÃO DA LITERATURA

4.1 CÂNCER DE MAMA BILATERAL

Câncer de mama contralateral aparece na literatura desde 1885, mas sua magnitude foi estudada pela primeira vez por Kilgore et al. em 1956. Nesse estudo, o autor relatou que a paciente tratada de câncer de mama tinha risco três a quatro vezes mais alto de desenvolver câncer na mama contralateral em relação à população geral, e que esse câncer se comportava clinicamente como primário e não como metastático. O primeiro estudo mais completo sobre o assunto apareceu em 1964, com Robbins e Berg (1964), que avaliaram 91 pacientes e mostraram que paciente com carcinoma de mama tem risco estimado cinco vezes mais alto do que na população geral feminina de desenvolver o segundo tumor na mama contralateral. Foote e Stewart (1945), comparando mamas com câncer e sem câncer, concluíram textualmente que *"o maior risco de apresentar câncer na mama contralateral é ter antecedente de câncer na mama oposta."*

Pacientes tratadas de câncer de mama inicial apresentam risco duas a seis vezes mais alto de desenvolver câncer na mama contralateral em relação à população feminina em geral. Em algum momento da vida, dois a onze por cento delas desenvolverão câncer na mama contralateral, que representa incidência de 4 a 8/1.000 pessoas por ano. O risco estimado é de 0,4% a 0,8% ao ano e permanece ao longo do tempo (Imyanitov e Hanson, 2003).

Câncer de mama bilateral pode ser classificado como sincrônico (diagnosticado simultaneamente) ou metacrônico (diagnosticado em tempos

diferentes), dependendo da definição do intervalo utilizado, que na literatura varia entre seis meses a um ano. Câncer sincrônico representa 0,5% a 1% do total e câncer metacrônico ocorre cinco a dez vezes mais frequentemente (Chen et al. 1999). Esses dados mostram a importância de se manter um controle periódico a longo tempo. Diagnóstico precoce é importante, pois diversos estudos mostram que existe relação entre tamanho do tumor e estádio do tumor contralateral (Chen et al., 1999; Imyanitov et al., 2002; Mertens et al., 2004).

A literatura relata vários fatores de risco para aparecimento de câncer na mama contralateral. Dentre esses, idade precoce ao diagnóstico do primeiro câncer, antecedentes familiares, mutação *BRCA1* e/ou *BRCA2*, deleção do gene *CHEK2*[*] *110delC*, tipo histológico de carcinoma lobular, peso corpóreo e submissão à radioterapia prévia e/ou à quimioterapia e/ou uso de tamoxifen estão entre os mais importantes. Desses, talvez antecedentes familiares e idade precoce ao diagnóstico do primeiro câncer sejam os mais aceitos. Entretanto, até o momento não existem marcadores que identifiquem essas pacientes (Broët et al., 1995; Montoro et al., 1995; Chen et al., 1999; Ji e Hemminki, 2007).

Bilateralidade sugere influência genética (hereditariedade) no desenvolvimento do câncer (Hartman et al., 2005). As características clínicas que ajudaram na busca de fatores genéticas no câncer de mama e culminaram com a descrição dos genes *BRCA1* e *BRCA2* foram bilateralidade, idade precoce ao diagnóstico e antecedente familiar de 1º grau (Hall et al., 1990; Wooster et al., 1994; Narod e Foulkes, 2004). Em estudo populacional com 705 mulheres com câncer de mama contralateral e portadoras de *BRCA1/2* mutado, comparadas com 1.398 mulheres com câncer de mama unilateral e sem mutação destes genes, demonstrou-se

que o risco para portadoras de mutações no gene *BRCA1* desenvolverem câncer de mama na mama contralateral foi de 4,5 e de 3,4 para portadoras do gene *BRCA2* mutado. O risco estimado para dez anos foi de 18,4%, enquanto nas não portadoras foi de 4,9%. Outros estudos mostraram risco cumulativo em torno de 26% em dez anos (Malone et al., 2010).

Estudos sobre a influência dos antecedentes familiares de câncer de mama mostraram aumento no risco de desenvolvimento de câncer de mama contralateral. Esse risco é particularmente importante quando os portadores são parentes de primeiro grau. Na literatura, esse risco relativo (RR) varia de 1,6 a 2,8 (Hislop et al., 1984; Horn et al., 1987; Hemminki et al., 2007).

Inúmeros estudos mostraram que idade ao diagnóstico do primeiro tumor é um fator de risco muito importante para câncer de mama contralateral. Quanto mais jovem, maior o risco, que varia de 1,3 a 9,9 (observado/esperado). Estudo de caso–controle (1.351 casos/1.351 controles) feito na Suécia mostrou que abaixo dos 50 anos de idade o risco (O/E) é de 9,9, ao passo acima de 50 anos ele diminui para 1 (Adami et al., 1985). Broët et al., (1995) encontraram RR de 1,4 para pacientes abaixo de 55 anos de idade, e de 1,0 para aquelas acima dessa idade.

Carcinoma lobular invasivo e *in situ* mostra risco elevado para câncer de mama contralateral. Na literatura, esse risco relativo varia de 1,42 a 6,55. Estudo de Robbins e Berg (1964) mostrou risco de 1,42. Segundo alguns autores, talvez essa alta frequência represente a diferença de comportamento biológico e/ou de etiologia entre lobular e ductal (Chen et al., 1999).

Estudo populacional recente feito na Suécia com 4.152 mulheres com câncer de mama, das quais 63 desenvolveram câncer na mama oposta, mostrou que se o

tumor primário não expressar receptor de estrógeno, o risco de desenvolver câncer na mama oposta é maior (SIR: 1,98) quando comparado com os casos em que o receptor estrogênico é positivo (SIR: 0,67) (Bouchardy et al., 2010).

Num estudo com 4.036 pacientes, Kurian et al. (2009) mostraram que mulheres com receptor de estrógeno negativo apresentam risco dez vezes maior de desenvolverem câncer na mama contralateral, enquanto aquelas com receptor de estrógeno positivo apresentam risco duas vezes maior comparado com a população geral.

Tratamento radioterápico do câncer de mama inicial não aumenta o risco de câncer de mama contralateral, apesar de a radioterapia ser considerada carcinógena. Alguns estudos esporádicos mostram aumento de risco (Harvey e Brinton, 1985; Kurtz et al., 1988; Boice et al., 1992).

Na maioria dos estudos, a quimioterapia reduz o risco de desenvolvimento de câncer de mama contralateral, assim como uso de tamoxifen. Estudos feitos na Inglaterra *Scotish Cancer Trials Breast Group e Cancer Research Campaign Breast Cancer Trials* mostraram risco relativo de 0,5 a 0,6. Uma metanálise com 75.000 mulheres e 133 estudos randomizados mostrou redução de 39% no risco de desenvolvimento de câncer de mama contralateral *Early Breast Cancer Trialists Collaborative Group* (Chen et al., 1999).

Em relação à sobrevida, os dados são conflitantes na literatura. Os estudos não referem os critérios para seleção nem o tipo histológico, alguns são com populações hospitalares e outros não hospitalares e a maioria não é ajustada para tratamento (Dawson et al., 1998). Um estudo realizado na Alemanha com 251 casos de câncer de mama bilateral (estudo populacional) mostrou que o prognóstico é pior

quando comparado com portadoras de câncer unilateral (Brenner et al., 1993). Revisão da literatura mostra quatro estudos que comparam tumores sincrônicos com aqueles de apresentação unilateral. Os resultados são contraditórios, pois dois deles não observaram diferença na sobrevida, enquanto outros dois relataram que bilateralidade teve impacto na sobrevida (Verkooijen et al., 2006). Resultado contraditório similar é visto na literatura quando se compara os tumores de surgimento metacrônico com aqueles unilaterais. Nesse campo, temos quatro estudos sem diferença (Healey et al., 1993; Heron et al., 2000; Carmichael et al., 2002; Verkooijen et al., 2006) e dois com pior sobrevida (Holmberg et al., 1988; Kollias et al., 2001).

Estudos que analisaram, em conjunto, tumores metacrônicos e sincrônicos, mostram resultados discrepantes em relação à sobrevida tres sem diferença (Wanebo et al., 1985; Mose et al., 1997; Newman et al., 2001) e dois com diferença (Abdalla et al., 1997; Gajalakshmi et al., 1999). Estudo recente avaliou 956 pacientes e mostrou que a sobrevida média no câncer metacrônico foi de 96 meses, com sobrevida em cinco anos de 90,5%, enquanto nos sincrônicos a sobrevida média foi de 66 meses e sobrevida em cinco anos de 80,3%. Portanto, o fato de os tumores serem sincrônicos teve impacto negativo na sobrevida (Quan et al., 2008). Análise com 6.550 mulheres com câncer de mama bilateral comparada com unilateral mostrou que aquelas diagnosticada com menos de 50 anos e com intervalo menor que cinco anos apresentaram risco de óbito 3,9 vezes maior que a unilateral, e aquelas diagnosticada com intervalo maior que dez anos apresentavam prognóstico semelhante às unilaterais (Hartman et al., 2007). O principal questionamento do clínico diante de uma paciente com câncer de mama contralateral é avaliar se é um

caso de câncer primário ou metastático da mama oposta. Essa diferença é muito importante para fins terapêuticos.

4.2 ESTUDOS DA ORIGEM COMUM NO CÂNCER DE MAMA BILATERAL

A teoria da origem clonal é a mais aceita na oncologia para explicar o desenvolvimento neoplásico. Baseado nessa teoria, a neoplasia origina-se num único clone celular e, a partir da expansão desse clone, ela se desenvolveria. Assim, todas as células da neoplasia, inclusive as metástases, deveriam, em princípio, manter certas características da célula original (Nowell, 1976; Garcia et al., 2000).

A pergunta de que o aparecimento do segundo tumor na mama contralateral representa um segundo tumor primário ou uma metástase tem intrigado os pesquisadores. Os critérios estabelecidos na prática foram propostos ao longo do tempo. Kilgore et al. (1956) descreveram os seguintes critérios para definir a independência dos tumores: 1) se o tumor contralateral for carcinoma intraductal; 2) intervalo maior que dois anos e sem evidência de metástase ou de recorrência nesse período; 3) tumor na mama contralateral sem evidência de metástase; e 4) evolução do tumor contralateral compatível com o primário.

Em 1984, Chaudary et al. descreveram os seguintes critérios, muito utilizados até hoje, para diferenciar câncer na mama contralateral como primário ou metastático: 1) achado de lesão *in situ* é considerado prova incontestável de que o tumor é primário; 2) se o tipo histológico for diferente do primeiro tumor, é considerado primário; 3) se o grau de diferenciação histológica for maior que o

primeiro, é considerado primário; e 4) se não apresentar diferença histológica e houver ausência de evidência de neoplasia local, regional ou a distância, é considerado primário.

Presença de componente de carcinoma *in situ* geralmente é considerada como achado incontestável que se trata de um segundo tumor primário. Pandis et al. (1995) contesta essa afirmação, avaliando 16 casos de câncer de mama bilateral por meio da análise de cariótipo. Nesse artigo, os autores mostraram a mesma anormalidade cariotípica no primeiro tumor e no componente de carcinoma *in situ* da mama contralateral. Os autores argumentam que seria improvável ocorrer a mesma mutação nas duas mamas, com cariótipo idêntico e, portanto, deveria se tratar de um caso de metástase (Pandis et al., 1995).

Egan (1976) descreveu critérios baseados na presença de microcalcificações na mamografia para avaliar neoplasia de mama contralateral. No caso da lesão na mama contralateral, ela não apresentaria microcalcificações. Segundo o autor, disseminação à mama contralateral ocorreria através da rede linfática retroesternal (Egan, 1976). Há relatos de outros critérios, como de que o tumor primário geralmente localiza-se no parênquima mamário, ao passo que o metastático localiza-se na gordura mamária (Leis, 1980). Análise com 63 pacientes com câncer de mama bilateral revelou que, à mamografia, tumores de mama contralateral apresentam as mesmas características do primeiro tumor (Hall et al., 1999). Recentemente, análise de 42 casos com ressonância magnética mostrou que não houve diferença entre os tumores. Nesse estudo, a avaliação da forma, das margens, da intensidade de sinal em T2 e dos vasos adjacentes não mostrou diferenças significativas entre eles (Renz et al., 2010).

Na literatura, podemos encontrar estudos que analisam características da neoplasia usando técnicas variadas, desde estudo de cariótipo, análise molecular e IHQ, que é a técnica mais utilizada na tentativa de diferenciar a neoplasia (Fisher et al., 1984; Pandis et al., 1995; Agelopoulos et al., 2003). Alguns autores, com base em avaliação de características histopatológicas, clínica e IHQ, concluíram que os tumores são independentes (Sterns et al., 1991) ou metastáticos (Gong et al., 2007). Outros estudos utilizando técnicas de biologia molecular define que são independentes (Shibata et al., 1996) ou metastáticos (Kollias et al., 2000).

Ackerman et al. (1995) avaliaram 38 casos de carcinoma invasivo com análise por IHQ e por análise de polimorfismos do DNA (*single strand conformation polymorphism*). Mutação de *TP53* foi encontrada em 22% dos casos, mas apenas em três casos pareados; dois casos mostraram mutações em éxons semelhantes. Assim, segundo a autora e seus colaboradores, na maioria das neoplasias de mama bilateral o gene *TP53* não está mutado quando comparados os dois tumores, reforçando a ideia que sejam dois tumores primários. Outros estudos que avaliaram *TP53* referem também que na maioria dos casos bilaterais trata-se de duas neoplasias independentes (Lidereau, Soussi, 1992; Ackerman et al., 1995; Kinoshita et al., 1995; Stenmark-Askmalm et al., 2001; Janschek et al., 2001)

Estudos baseados em IHQ são a maioria na literatura. Os marcadores utilizados são bastante variados e incluem receptores hormonais, p53, PTEN, BCL-2, α/β e γ-catenina, Her-2, Ki-67 e CK 5/6. Os mais frequentemente utilizados são os receptores de estrógeno e de progesterona.

Num estudo em que o autor utilizou seis marcadores (72.3, DF3, HER2, SP-1, H59 e CEA) para análise por IHQ de 88 pacientes, não houve concordância completa

para nenhum deles entre os tumores, permitindo a conclusão de que são independentes (Dawson et al. 1991).

Boa parte dos estudos realizados nesse sentido buscou as diferenças entre o primeiro e o segundo tumor. Temos resultados discrepantes na literatura, com números que diferem de 25% a 97% (Holdaway et al., 1988; Branković-Magić et al., 1995; Coradini et al, 1998; Matsuo et al., 2001; Stenmark-Askmalm et al., 2001; Cavaliere et al., 2004; Intra et al., 2004; Kollias et al., 2004). Alguns trabalhos não mostraram diferenças na comparação entre os dois tumores no que tange a expressão dos receptores hormonais (Coradini et al., 1998; Stenmark-Askmalm et al., 2001; Intra et al., 2004). Entretanto, outros trabalhos mostraram que os tumores podem diferir em sua expressão dos receptores hormomais em mais do que 50% dos casos (Holdaway et al., 1988; Branković-Magić et al., 1995).

Com o advento do tratamento hormonal, alguns estudos analisaram a expressão dos receptores hormonais em relação ao uso ou não de tamoxifen. Em estudo analisando pacientes usuários de tamoxifen, o receptor de estrógeno e de progesterona apresentou expressões semelhantes, mas quando comparadas a pacientes que não usaram tamoxifen, a expressão foi totalmente diferente. Por isso, com base nesse achado, o autor conclui que os tumores eram independentes (Arpino et al., 2005). Outro estudo que analisa o comportamento dos receptores em função do uso de tamoxifen mostra o seguinte: 1) na não-usuária de tamoxifen, se o receptor de estrógeno for positivo no primeiro tumor, no segundo será igualmente positivo em 85% dos casos e para receptor de progesterona, em 70% dos casos; 2) na usuária, a positividade do receptor de estrógeno e de progesterona foi de 56% e de 78%, respectivamente. Segundo a autora, na usuária de tamoxifen a expressão do receptor

foi menor provavelmente por causa do uso do medicamento e não fez referência sobre clonalidade (Swain et al., 2004). Outros autores mostram resultados semelhantes (Stark et al., 2005).

Estudo feito na Suécia com 374 pacientes mostrou que nos tumores sincrônicos o RE positivo foi encontrado em 23% (bilateralmente) e nos metacrônicos foi positivo no primeiro tumor em 4% e 28% no segundo. O autor sugere que pacientes com RE negativo têm mais risco de desenvolver tumor contralateral, provavelmente pelo fato de usarem tamoxifen (Verkooijen et al., 2006). Resultado semelhante mostra casuística com 150 pacientes - nas usuárias de tamoxifen a incidência de tumores RE negativo foi de 37% e de 18% nas não-usuárias (na mama contralateral) (Kaas et al., 2003).

Na literatura, encontramos estudos relacionados a outros marcadores. Um estudo com oito casos avaliou CD4, E/P e N-caderina. Não houve correspondência entre tumores, porém entre tumor primário e metástase linfonodal a correlação foi significativa para P-caderina e β-catenina (Bassarova et al., 2005a). Os mesmos autores avaliaram a expressão de HER2, receptor estrógeno-α, KI67, bcl-2 e p53. A expressão do receptor estrógeno-α e HER2 foi coincidente em 75%, enquanto a expressão de p53 o foi em apenas em 13% dos casos (Bassarova et al., 2005b). Outro autor estudou dois marcadores (DF.3 e B72.3) em 36 casos com IHQ, encontrou correlação entre os tumores metacrônicos para B72.3 e conclui que, na verdade, eles comportam-se como sincrônicos (Lundy et al., 1987).

Estudos que avaliaram expressão de outros marcadores mostraram resultados diversos. Os que analisaram p53 mostraram positividade variável de 8% a 44%. A maioria dos autores refere que o p53 não tem participação diferencial na

carcinogênese é que, portanto, deve se tratar de dois tumores primários (Kinoshita et al., 1995; Ozer et al., 1998; Janschek et al., 2001; Kollias et al., 2004). Estudo que analisou CK6/5 e PTEN em 88 casos descobriu que CK5/6 era positivo em 26% dos casos e expresso nos dois tumores em 18% dos casos; PTEN era expresso em 58 (66%) dos casos (Piekarski e Biernat, 2006).

Relatos de análise de HER2 mostram positividade nos bilaterais variando de 9% a 76% (Matsuo et al., 2002; Intra et al., 2004; Saad et al., 2008; Renz et al., 2010).

Biologia molecular trouxe novos métodos para se avaliar a clonalidade das neoplasias bilaterais de mama. Na literatura aparecem métodos variados: relacionado ao G6PD, análise citogenética, RFLP ligado ao cromossomo X, perda de heterozigose (LOH/AI – *allele imbalance*), translocações cromossômicas, DNA *fingerprinting* e mutações, entre outros. Quando um tumor desenvolve metástase ou recorrência, geralmente mantém a LOH/AI do tumor de origem ou desenvolve outras (Schlechter et al., 2004).

Imyanitov et al. (2000) analisaram 23 casos e encontraram 1 com instabilidade de microsatélite (MI) e 11 com LOH nas duas mamas. O nível de concordância não foi significativo, por isso o autor concluiu que eram tumores independentes (Imyanitov et al., 2000). Baseados nessa técnica, outros autores chegaram à mesma conclusão (Schlechter et al., 2004; Saad et al., 2008). Contudo, em estudo com 31 casos que avaliou a LOH, a concordância da perda foi de 54% entre os tumores, sugerindo a mesma origem genética (Kollias et al., 2000).

Estudo que avaliou a amplificação de *HER2*, *c-MYC* e *CCND1* em 50 casos descobriu que nos tumores sincrônicos a amplificação foi encontrada em 24%, nos

metacrônicos em 13% e nos unilaterais em 28%. A maior concordância entre os sincrônicos provavelmente é por causa da história natural quase idêntica nesses tumores (Suspitsin et al., 2006).

Um estudo interessante, que avaliou 28 pacientes por meio da análise de alelos (alelotipagem), mostrou um caso de carcinoma intraductal na mama contralateral com modificações que sugeriam metástase, mas a maioria apresentava perfil de tumores primários (Imyanitov et al., 2002). Usando a mesma técnica em 13 casos, outros autores chegaram à mesma conclusão (Tse et al., 2003).

Outra técnica que aparece com frequência na literatura é a hibridização genômica comparativa (*comparative genomic hybridization*). Em estudo com 16 casos, o autor concluiu que a maioria dos tumores era primária (Agelopoulos et al., 2003), assim como outro estudos estudos (Teixeira et al., 2004; Ghazani et al., 2007). Em análise com 36 casos o autor encontrou concordância de 18,7% entre tumores sincrônico e de 10,7% entre metacrônicos (Park et al., 2007b).

Numa análise usando a técnica (inativação do cromossomo X) mais mutação no p53 em 49 casos de câncer de mama bilateral, a autora encontrou 2 com p53 mutado e 3 com inativação de alelos diferentes e conclui que eram tumores independentes (Shibata et al., 1996). Outro, analisou as alterações ligadas ao gene receptor de andrógeno (HUMARA). Num estudo com dez casos, oito casos foram considerados tumores primários (Banelli et al., 2010).

Esses trabalhos estão resumidos nos Quadros 1 e 2.

Quadro 1 - Análise da clonalidade baseado em métodos moleculares e de cariótipo.

Kinoshita et al. (1995)	p53 molecular	38 bilateral 62 unilateral	mutação (+) bilateral 50% unilateral: 26% tumor: 44% 2 tumor: 68%. São primários.
Ackerman et al. (1995)	p53 IHC/molecular	38 casos	mutação 2 casos semelhantes. São metástases. Maioria são primários.
Pandis et al. (1995)	cariotipo	16 casos	2 metastases.(mesma alteração cariótipo) 14 primários.
Askmalm-Stenmark et al. (2001)	p53 IHC/molecular	34 casos	RE (+) 22 casos. RPg (+)7 casos. p53 IHC (+) 1caso. missense 1 caso. são primarios. p53 não influência
Janschek et al. (2001)	p53 molecular	33 casos	2 mesma mutação. 20 casos sem mutação. maioria são primarios
Park et al., (2007b)	CGH	10 casos	Sao independdentes
Saad et al. (2008)	LOH/ microsatelite	12 casos	Não concordante 100%. São primários. Tu = metástase linfonodo (metástase)
Banelli et al. (2010)	HUMARA	10 casos	Não concordante 100% . são primarios

RE–receptor de estrógeno; RPg–receptor de progesterona; IHC-imunoistoquímica; TMX-tamoxifen; CIE-componente intraductal extensivo. LOH-*loss of heterozigozy*; HUMARA (*human androgen gene*).

Quadro 2 - Análise de clonalidade baseado em IHQ.

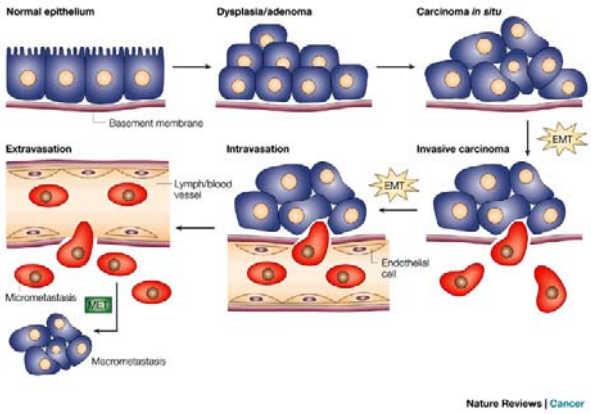
Holdaway et al. (1988)	RE/RPG IHC	99 casos.	RE(+) 47%. são tumores primários
Dawson et al. (1991)	72.3/ er2/ CEA IHC	83 casos	72.3 (+) 41%. her2:(+) 95. CEA (+) 12.5% são tumores primários. não há predisposiação genetica
Ozer et al. (1998)	Her2/Ki-67. IHC	18 casos.	Her2 (+) 44%; ki-67(+) 39%
Brankovic-Magic et al. (1995)	RE/RPg. IHC	57 casos.	RE (+) 5 casos. discordante (97%). são tumores primários.
Coradini et al. (1998)	RE/RPg. IHC	399 casos.	RE/RPg : semelhantes. é primario.
Brown (2001)	RE/ RPg IHC	1.407casos	RE/RPg (+)HER2(--)→ RE (+) 84% Her 2(+)→ Her 2 (+) 35% triplo negativo → triplo negativo (61%) sao primarios
Samant et al. (2001)	RE. IHC	236bilateral. 18.000 unilateral	RE(+) 28%. Unilateral RE (+) 28% bilateral.
Matsuo et al. (2001)	RE/her2/P53.IHC	54 casos	RE(+) 18%. RPg (+) 17% p53 (+) 22% her2 (+) 27%
Safal et al. (2002)	Her2/IHC	58casos. 21casos unilateral	c-erbb2 (+) 70%/ 34% unilat. RE(+) 51%
Bachleitner-Hofmann et al. (2002)	RE. IHC	35 casos.	RE (+) 27/35. usuario tmx
Swain et al. (2004)	RE. (NSABP) IHC	176 casos	não usuario tmx.RE(+) → 89% (--). RE (--) → 70% (--) usuario tmx RE(+) → 56%(+). RE (--) → 78% (--)
Intra et al. (2004)	RE/RPg/her2/Ki67. IHC	143 casos	RE (+) 88%. RPg (+) 80% her2 (+) 14 % Ki-67(+) 38% CIE: (27%) exlcui metastase
Kollias et al. (2004)	RE / RPg/ her2. IHC	79 casos	Her2 (--) → 43% (--) RE (+) → 48% (+) p53 (+) → 45% (--) RPg(+) → 30% (+)
Kaas et al. (2003)	RE. IHC	150 casos	não usuaria tmx. RE (--) → 82% (+). usuario tmx. RE (--) → 63% (+
Piekarski, Biernat (2005)	CK5/6 E PTEN. IHC	88 casos	RE (+) 31 %. RPg (+) 33%. Her2 (+) 44%. p53 (+) 23%. PTEN (+) 63% relação inversa RE/ ck5/6
Arpino et al. (2005)	RE. IHC	193 bilateral 193 unialteral	RE (+) → RE (--) 75%. não usuario tmx. RE(+) →RE(+) 47% RE (--) 53%. usuário tmx.RE do 1 tumor não preve o 2 tumor
Stark et al. (2005)	RE/ her2. IHC	44 casos.	1RE(+) 20%. RE(--) usuario tmx. Her2 (+) 15.8%. tem concordância.
Bassarova et al. (2005a)	RE/ er2/ i-67/ BCL-2/ p53. IHC	8 casos	RE(+) 67%. RPg (+)33%. Ki-67 (+)67%. bcl-2 (+)73%. p53 (+)13%. Her2 (+) 67%.
Kurian et al. (2009)	RE. IHC	4927 casos.	1 tumor RE(+)/ 2 tumor RE(+): 2.27 1 tumor RE(--)/ 2 tumor RE(--): 9.81
Bassarova et al. (2005b)	β-CATENINA/E,P, N-CADERIN. IHC	8 casos	β-catenina:80%. linfonodo: 89% não há concôrdancia entre tumores
Verkooijen et al. (2006)	RE IHC	474 casos	Sincrônico: 1 tumor (+) 23% 2 tumor (25%) Metacrônico: 1 tumor (+)4% 2 tumor (28%)

IHC-imunoistoquímica; RE-receptor de estrógeno; RPg-receptor de progesterona; CIE-componente intraductal extenso; TMX-tamoxifen.

4.3 TRANSIÇÃO EPITÉLIO–MESENQUIMAL (TEM)

Câncer de mama apresenta mortalidade de aproximadamente 25% e a causa principal são as metástases. Uma parte das pacientes (10%–15%) desenvolverá metástase em três anos após o diagnóstico inicial do câncer, mas não é raro a metástase aparecer 10-20 anos após o tratamento. Em média, quimioterapia reduz em a mortalidade em torno de 30% (Hellman e Harris, 2000).

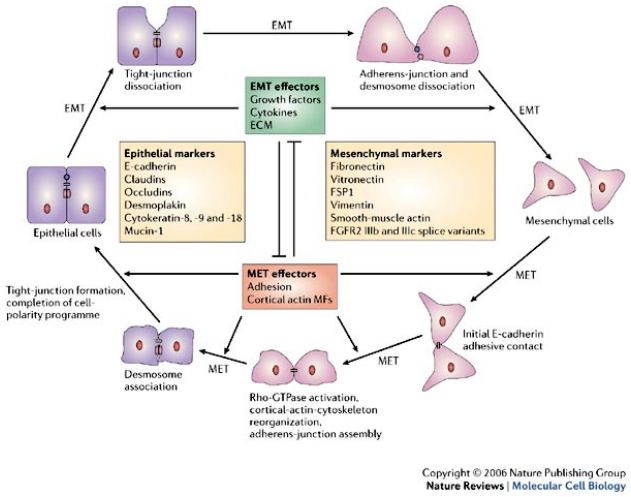
Classicamente, o processo da metástase apresenta as seguintes fases: 1) célula neoplásica perde a adesividade intercelular com a matriz extracelular. Nesse processo há inibição da expressão de ecad, ponto inicial do processo de TEM; outras moléculas dos múltiplos complexos de adesão são igualmente inibidas, como as claudinas, e o citoesqueleto de ceratina sofre modificações. Finalmente, esse processo se completa com a expressão dos marcadores mesenquimais (vimetina, fibronectin e SMA [do inglês, *smooth muscle actin*]); 2) a TEM permite maior mobilidade celular e ocorre invasão da matriz extracelular; 3) ganho da circulação sanguínea e/ou linfática, em que a sobrevivência na corrente sanguínea é problemática à celular tumor; em modelo animal, menos de 0,01% das células circulantes desenvolve metástases; 4) célula rompe o capilar do órgão e extravasa ao parênquima local; e 4) interação com microambiente local e início do processo de crescimento neoplásico metastático. Nessa fase, ocorre um processo inverso, em que a célula readquire suas características epiteliais, fenômeno conhecido como TME. Nessa fase, o tumor pode expressar novamente os marcadores epiteliais (Figura 1).



Fonte: Thiery (2002)

Figura 1 - Etapas do processo de metástase.

A TEM é um conjunto de modificações nos complexos celular e molecular da célula epitelial, no qual ela perde as características de diferenciação, de polaridade e de adesividade e passa a ter capacidade para invadir para adquirir as características de célula mesenquimal, que são perda da adesividade, da invasibilidade e da resistência à apoptose (Weigelt et al., 2005 b; Chiang, Massagué, 2008; Polyak, Weinberg, 2009). Ela pode ser induzida por sinais geralmente originados no mesênquima, por diversas vias metabólicas, como a do TGFβ (do inglês, *transforming growth factor β*), a WNT, a Notch e/ou a ativação de diversos receptores tirosina-quinase. A ativação dessas vias faz com que vários fatores de transcrição, como os da família SNAI1, TWIST e SLUG, sejam ativados e todos, em última análise, levem à repressão da expressão da ecad (Polyak, 2007) (Figura 2).



Fonte: Thiery e Sleeman (2006)
Figura 2 - Transição epitélio-mesenquimal.

Estudo com 479 casos de câncer de mama invasivo em TMA (do inglês *tissue microarray)* mostrou que o fenômeno de TEM é comum, constatando a hiperexpressão de vimetina, de SMA, de N-caderina e de caderina–(11), de SPARC, de laminina e de fascina associada a redução de ecad e de citoceratinas. Essas alterações foram observadas preferencialmente em tumores de fenótipo basal-like (Sarrió et al., 2008).

Estudos recentes sugerem que metástases são compostas por células com perfil fenotípico semelhante ao tumor primário (Ramaswamy et al., 2003). Um estudo que avaliou o perfil da expressão gênica de tumor primário e de metástase mostrou que são semelhantes mesmo após longo tempo de latência (Weigelt et al., 2003). Estudo similar que avaliou o DNA do tumor primário, de metástase de cérebro e de implante em camundongo mostrou semelhança nos três tumores. O

autor concluiu que uma subpopulação de células do tumor original foi responsável pela metástase (Ding et al., 2010).

Os locais mais afetados pela metástase no câncer de mama são os pulmões, os ossos e o fígado; metástases para a mama são raras. As séries de autopsia mostram envolvimento de 1,7% a 6,6% por neoplasias extramamárias. Os tumores mais comum incluem melanoma, linfoma e carcinomas dos pulmões. Aparentemente, neoplasias da mama contralateral são, na maioria, primárias (Abrams et al., 1950; Akçay 2002; Lee et al. 2010).

4.4 MOLÉCULAS DE ADESÃO CELULAR

Como discorrido anteriormente, há diversos complexos de adesão celular nas células epiteliais. O Quadro 3 mostra, de forma resumida, alguns deles.

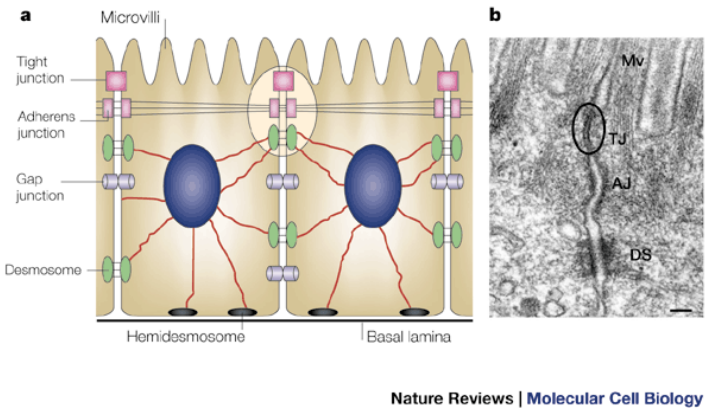
Quadro 3 - Tipos de complexo celulares mediadores da adesão celular.

A - Junções ocludente Junções. Compactas (*tight junction-claudin*)
B - Junções ancoramentos Ligação de filamento actina 1. Célula-célula: junção aderente (*adherens j*. – ecad) 2. Junção matriz célula: adesão focal Ligação de filamento intermediário 1. J. célula-célula (desmossomos) 2. J. matriz célula (hemidesmossomo)
C - Junções comunicantes 1. J. tipo fenda (*gap junction*)

Fonte: Adaptado de Alberts et al. (1998)

O tecido epitelial apresenta as características de polaridade, de imobilidade em relação ao tecido adjacente e de forte adesão celular, conforme comentado. O estrato epitelial está assentado sobre a lâmina basal, que é um tipo de matriz extracelular. As células estão unidas por meio das adesões célula-célula. A estrutura celular é mantida por meio de filamentos intracelulares (componentes do citoesqueleto) que se ligam a junções especializadas. Essas junções mantêm as células aderidas umas às outras ou à lâmina basal (Figura 3).

Essas junções são classificadas como ocludentes (claudinas), de ancoramento (ecad) e comunicantes (*gap junctions*) (Quadro 3). Cada uma delas tem funções diferentes e componentes variados.



Fonte: Tsukita e Furuse (2001)

Figura 3 - Tipos de aderência.

Junções ocludentes (JO) têm como função selar o espaço intercelular, separando o fluido compartimental do polo apical do basolateral da célula. Também controlam a passagem de solutos entre as células e têm a função de transdutor da sinalização celular (papel na diferenciação celular, na polaridade celular, no crescimento e na proliferação); as proteínas agem como moléculas de adesão célula-

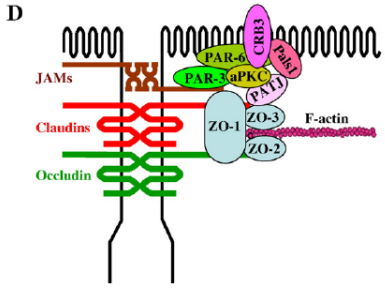
célula e impedem a migração celular. São compostas de várias proteínas, sendo as principais as ocludinas, as JAM (do inglês, *junctional adhesion molecules*) e as claudinas.

Junção aderente forma uma espécie de "cinto de adesão" (*adherens junction*) ao redor da célula, logo abaixo da JO, e mantém as células unidas por meio das caderinas, que atuam como proteínas de adesão transmembrânica. Essas caderinas se unem aos filamentos de actina (citoesqueleto celular) por meio das cateninas (α, β e γ-catenina) (Niessen e Gottardi 2008).

4.4.1 Claudinas-4 e 7

Descrito em 1998 por Tsukita e Furuse, a família das moléculas chamadas de claudinas (CLD) é o principal elemento da JO. O nome se origina do do latim, *claudere*, que significa fechar.

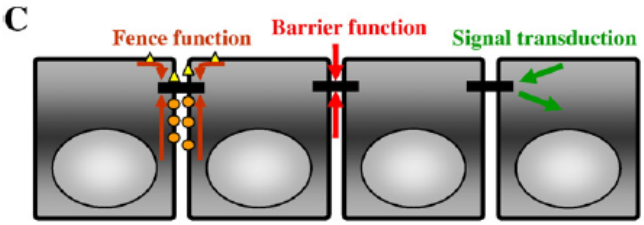
CLD são proteínas de 20 a 27kDa e fazem parte da família das tetraspaninas transmembrânicas. Essa família de proteínas é composta de 24 membros e, até o momento, é dividida em CLD clássicas e não-clássicas com base em seus aspectos funcionais. CLD 1 a 10, 14, 15, 17 e 19 são consideradas clássicas e as restantes, não-clássicas (Krause et al., 2008). Na JO formam-se pontes de adesão ao se associar as CLD da célula adjacente com a CLD da membrana da mesma célula e com as moléculas, como zona (ZO), que está ligada ao citoesqueleto, ao MUPP-1 (do inglês, *multi-DPZ domain protein-1*) e ao PATJ (Oliveira e Morgado-Díaz, 2007; Paris et al., 2008; Hartsock et al, 2008; Chiba et al., 2008).



Fonte: Chiba et al. (2008).

Figura 4 - Junção ocludente.

De modo geral, sua função na JO é promover a permeabilidade seletiva de solutos na região paracelular, mantendo o gradiente entre as regiões apical e baso-lateral da célula e a polaridade, a estrutura e a função celular. Essa permeabilidade celular é ampla, variando desde o completo impedimento à passagem de solutos, como na bexiga, até a formação de poros para alguns cátions e ânions, como no túbulo renal (Figura 5) (Tsukita et al., 2001; Oliveira e Morgado-Díaz, 2007; Krause et al., 2008; Martin et al., 2009).



Fonte: Chiba et al. (2008).

Figura 5 - Função das claudinas.

A expressão das CLD é bastante ampla e pode ser encontrada em vários tecidos epiteliais e endoteliais. Mais de uma CLD pode estar expressa na mesma célula epitelial. Além dessa variabilidade de expressão, a localização nos

cromossomos também é ampla. A maioria parece concentrar-se nos cromossomos 3, 7, 16 e 21 (Quadro 4) (Mitic et al., 2000; Hewitt t al., 2006; Chiba et al., 2008).

A principal característica das CLD-3 e CLD-4 é serem receptores para a toxina do *clostridium perfringes* e estarem associadas ao complexo β-catenina/Tcf (Kominsky 2006).

Quadro 4 - Expressão das claudinas e localização nos cromossomos.

	Coração	Cérebro	Pulmão	Fígado	Rim	Testículo	Lócus
Cld-1	+	+	+	+	+	+	
Cld-2	--	---	---	+	+	--	
Cld– 3	---	----	+	+	+	+	7q11
Cld-4	---	+	+	----	+	---	7q11.23
Cld-6	--	----	----	----	----	-----	16p13.3
Cld-7	--	+	+	+	+	+	17p12
Cld-8	---	---	+	---	+	+	21q22.1
Cld-10	---	----	+	---	+	---	13q31-34
Cld-11	---	+	---	----	---	+	3q26.2
Cld-15					+		7q21.3
Cld-16			+		+		3q

Fonte: Adaptado Mitic et al. (2000) e de Tsukita et al. (2001)

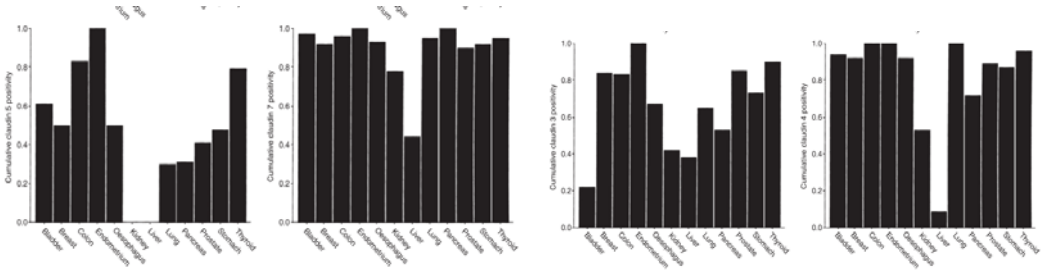
Regulação das CLD pode ser feita por fosforilação que induz a uma alteração da permeabilidade paracelular; palmitolação (adição de ácido palmítico), que aumenta a associação com a membrana celular; endocitose (transporte ao interior da célula por meio de vesículas especializadas), que poderia explicar o achado das claudinas no citoplasma das células normal e tumoral; ação do fator de transcrição Snail (age como repressor cld-3, 4 e 7), implicado na regulação da TEM; regulação de fatores de crescimento (EGF e TGF-β) e de citoquinas (interferon-γ; interleucinas

e fator TNF); e metilação Swisshelm, 2005; Oliveira e Morgado-Díaz, 2007; Osanai et al., 2007; Mittal et al., 2010).

Anormalidades nas CLD são associadas a algumas doenças e ao câncer. Mutação germinativa no gene de *CLD–1* relaciona–se à ictiose neonatal; CLD-2 está hiperexpressa na doença de Crohn; mutação de *CLD-14* associa-se a surdez não sindrômica; e mutação em *CLD-16* causa hipomagnesemia renal familiar (Oliveira e Morgado-Díaz, 2007; Krause et al., 2008; Findley e Koval, 2009).

A maioria das neoplasias malignas originadas do epitélio caracteriza-se pela proliferação descontrolada e perda da diferenciação celular e da arquitetura tecidual, além de perda da adesividade celular, que é uma característica marcante (Osanai et al., 2007). Ultimamente, os estudos mostram que vários elementos da JO participam direta ou indiretamente do processo de progressão do câncer. Além disso, a JO pode ser uma ponte de ligação com as junções aderentes (ecad), pois apresenta interação com a α–catenina (parte do complexo ecad–β-catenina-citoesqueleto) (Hartsock et al., 2008; Martin et al., 2009).

Em relação às alterações das claudinas em câncer, observamos expressões bastante variadas, dependendo do órgão afetado. Um estudo feito para avaliar a expressão das CLD 1, 2, 3, 4, 5 e 7 em diferentes carcinomas mostrou resultados bem diversos. Por exemplo, CLD-2 e CLD-5 apresentam baixa expressão no câncer de mama e de próstata, enquanto nos carcinomas hepático e renal há baixa expressão de CLD-4 e de CLD-5. Esse estudo mostrou que linfomas não expressam CLD. Especificamente as CLD-4 e CLD-7, objetos de nosso estudo, estão superexpressas no câncer de mama (Figura 6) (Soini, 2005).



Fonte: Soini (2005).

Figura 6 - Expressão das claudinas em tumores.

Na literatura, encontramos diversos estudos e resultados variados avaliando a relação e a expressão das claudinas (CLD) no câncer de mama. Algumas são pouco expressas, como CLD-1 e CLD-2, ou apresentam níveis variáveis (CLD-3, CLD-4 e CLD-7) (Figura 7).

Table 1. Claudin expression in cancer

Cancer	Claudin gene	Expression	References
Breast	*CLDN1*	Down	(9)
	CLDN7	Down	(12)
	CLDN1, CLDN3, CLDN4	Variable	(10)
	CLDN3	Up	(26)
	CLDN4	Up	(26)
Breast and Paget's disease	*CLDN2, CLDN3, CLDN4, CLDN5*	Variable	(44)
Colon	*CLDN1*	Variable	(11)
Gastric	*CLDN4*	Down	(45)
Hepatocellular carcinoma	*CLDN10*	Up	(36)
Hepatocellular carcinoma (mouse model)	*Cldn7*	Up	(46)
Head and neck squamous cell carcinoma	*CLDN7*	Down	(13)
Squamous cell carcinoma	*CLDN1*	Up	(47)
	CLDN4	Up	(47)
Ovarian	*CLDN3*	Up	(21, 24, 25, 48)
	CLDN4	Up	(21, 23, 25)
	CLDN16	Up	(49)
Pancreatic	*CLDN4*	Up	(28–30, 32)
Pancreatic (intraductal papillary mucinous neoplasms)	*CLDN4*	Up	(31)
Prostate	*CLDN3*	Up	(27)
	CLDN4	Up	(27)
Thyroid papillary cancer	*CLDN10*	Up	(50)

Fonte: Adaptada de Morin (2005).

Figura 7 - Expressão das CLDs no câncer de mama.

Um estudo avaliou a CLD-7 com RT-PCR/*Western blot* e mostrou expressão diminuída em relação ao tecido normal. Estudo imunoistoquímico mostrou novamente o mesmo achado em 355 casos de carcinoma ductal invasivo, com

relação direta com o grau histológico, e também em tumores com linfonodos axilares comprometidos por metástase. Segundo os autores, esse achado relaciona-se com a falta de adesão nos tumores de alto grau (Kominsky et al., 2003). Contudo, outros mostram hiperexpressão da CLD-7 (Nacht et al., 1999; Soini, 2005; Tokés et al. 2005a; Hewit et al., 2006). Num estudo com 60 pacientes, Tokés et al. (2005b) encontraram o mesmo resultado: baixa expressão da CLD-7 nos casos de carcinoma de grau III. Nesse estudo, a CLD-1 estava pouco expressa, enquanto a CLD-3 estava hiperexpressa.

Estudo em cultura de tecido com câncer de mama com alta capacidade de produzir metástase hepática mostra ausência de CLD-4 e de CLD-7, indicando que, durante o processo de carcinogênese, houve perda de expressão dessas CLD (Erin et al., 2009). Recentemente, mostrou-se que o fator de transcrição SNAI1P pode inibir epigeneticamente a CLD-7 (Mittal et al., 2010).

Estudo realizado com cDNA microarrays mostrou expressão da CLD-7 no carcinoma ductal invasivo de mama no grupo receptor de estrógeno e de progesterona positivo, mas aconteceu o contrário no grupo receptor de estrógeno e de progesterona negativo (Nagai et al., 2004).

Um estudo com 52 casos de carcinoma de mama constatou baixa expressão ou ausência de CLD-4, sendo que a maioria dos casos era de grau histológico I, sugerindo algum papel na diferenciação e na carcinogênese (Tokés et al., 2005a), mas esses resultados são contraditórios (Soini, 2005).

Análises da CLD-4 mostram associação de sua expressão com o fenótipo basal–like. Em 38 casos analisados, a expressão de CLD-4 estava significativamente mais expressa no tipo basal que no não-basal grau histológico III (Kulka et al., 2009).

Em outra avaliação com 125 casos, a autora encontrou expressão de CLD-1, de CLD-3 e de CLD-4 no grupo de receptor de estrógeno positivo, com 5%, 89% e 52%, e no grupo receptor negativo com 39%, 79% e 79%, respectivamente. Essa diferença foi significativamente diferente (Blanchard et al., 2009). Estudo com 300 casos mostrou que em 88 casos avaliados por meio de *Western blot*, a hiperexpressão de CLD-4 teve relação negativa com receptor de estrógeno e relação positiva com grau histológico. Análise posterior de 299 casos por IHQ mostrou correlação positiva com grau histológico e c-erbB2 e correlação negativa com receptor de estrógeno e pior sobrevida (Lanigan et al., 2009).

As outras CLD mostram expressões diversas: CLD-2 (52%), CLD-3 (93%), CLD-5 (47%) (Soini, 2005), CLD-11 (baixa expressão), CLD-2 (100%) e CLD-3 (100%) (Tokés et al. 2005b). Num estudo comparativo, os autores encontraram baixa expressão de CLD-1 em 26 casos de recorrência em comparação com 57 casos não recorrente (Morohashi et al., 2007).

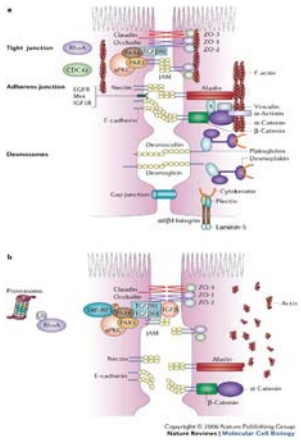
Avaliação de 124 casos com CLD-16 mostrou que nos casos com linfonodos comprometidos sua expressão ficou significativamente diminuída (Martin et al., 2008). Baixa expressão de CLD-2, num estudo com 37 casos, mostrou que estava associada com linfonodo positivo e alto grau histológico. Não foi encontrada relação com tamanho do tumor, receptor de estrógeno, progesterona e HER2 (Kim et al., 2008).

4.4.2 E-caderina (ecad)

Por volta de 1977, Takeichi, citado por Takeichi (1988) descreveu uma proteína cálcio-dependente com propriedades adesivas; em 1985, ele a denominou

caderina (cálcio-dependente), com 120 kDa (cromossomo 16q22). Acrescentou prefixo E (encontrado no tecido epitelial), além de P (placenta) e de N (neural). Assim, atualmente são conhecidos como E/P e N–caderina. Em 1988, clonou cDNA da ecad, mostrando que sua proteína tem função de adesão célula-célula.

Em 1989, mostrou-se a interação da porção citoplasmática com as "cateninas", comprovando-se sua propriedade de supressão da malignidade (Ozawa et al., 1989; Takeichi, 1991). Em 1995, foi descrita a inativação da ecad em casos de câncer esporádico e no câncer gástrico difuso hereditário (Berx et al., 1998; van Roy e Berx, 2008). Recentemente, foi a vez da inativação transcripcional da ecad (Cano et al., 2000; Heuberger e Birchmeier, 2009). Caderinas são classificadas em clássicas (ecad) e não clássicas (moléculas relacionadas à caderina) (van Roy e Berx, 2008).



Fonte: Thiery e Sleeman (2006)

Figura 8 - ecad na junção aderente.

Com o complexo nectina/afadina, o complexo caderina/catenina compõe as unidades de adesão da junção de aderência, que liga a membrana ao citoesqueleto (filamento de actina) (Niessen e Gottardi, 2008). A molécula de ecad é composta por

uma porção extracelular, uma transmembrânica e uma intracelular. A extracelular liga-se à ecad extracelular da célula epitelial vizinha, formando pontes e mantendo a adesão e a integridade da célula. Assim, sua função básica é manter a adesividade célula-célula e impedir que a célula se desconecte do epitélio (Figura 8) (Takeichi, 1991; Birchmeier et al., 1994, 1995).

A porção intracelular conecta-se à β e à γ-catenina (placoglobina), que se liga à α-catenina (complexo caderina-catenina-catenina–CCC) e aos filamenteos de actina. Essa β-catenina, como veremos adiante, faz parte do complexo Wnt/β-catenina, relacionada ao desenvolvimento de neoplasias (Heuberger e Birchmeier, 2009). Integridade da β-catenina, assim como das outras cateninas, é importante para conexão com a ecad e para funcionalidade. Além disso, também pode funcionar como transdutor de sinal entre as células.

Sua perda/inativação relaciona-se com invasibilidade tumoral, indução e propagação de metástases e progressão tumoral. Estudo feito em camundongos mostrou que a perda de expressão da ecad coincidiu com a transição de adenoma diferenciado para carcinoma invasivo (Perl et al., 1998); outros estudos sobre câncer de mama mostram que a perda da ecad/ß-catenina está relacionada ao fenótipo mesenquimal e essa alteração não tem relação com ativação da via Wnt (van de Wetering et al., 2001; Sormunen et al., 1999).

Na glândula mamária, as células luminais ficam aderidas por meio da ecad e as células mioepiteliais, via P-caderina. Evidências recentes indicam que componentes da junção compacta podem influenciar a junção aderente, que apresenta alguma forma de intercomunicação (van Roy e Berx, 2008). Perda da adesividade celular é um das características da célula neoplásica e vários estudos mostram que a

perda da ecad associa-se à malignidade (Frixen et al. 1991; Cavallaro e Christofori, 2004; Knudsen e Wheelock, 2005; van Roy e Berx, 2008).

Adesão celular pode ser alterada por vários mecanismos: 1) alteração na composição do complexo caderina (ZO-1 e α-catenina podem afetar a força adesão da ecad); 2) fosforilação da tirosina do complexo caderina (Kemler, 1993); 3) intercomunicação com moléculas associadas ($p^{120ctn)}$ pode alterar a função da ecad); e 4) mediadores de sinal intracelular (Rac, Rho e CDC42 regulam a adesão ecad mediada) (Jiang e Manse, 2000).

Anormalidades da adesão ecad mediada no câncer de mama: 1) nível reduzido de ecad (observado na maioria dos tumores); 2) localização anômala da ecad (se localizado na região apical não apresenta funcionalidade); 3) mutação da ecad - a mais conhecida é a LOH do cromossomo 16q21, que pode ser encontrada no carcinoma ductal (50%), porém mais frequentemente no carcinoma lobular invasivo (>85%) (Cowin et al., 2005) e a maioria acomete a porção extracelular da ecad (Berx et al., 1996). Foram descritas várias mutações no câncer esporádico (Berx et al., 1998) (exceto no câncer gástrico, não parece ser a causa em outros tumores); 4) perda da ecad (metaloproteinases [MMP] podem degradar parte da molécula), 5) mutação ou nível anormal da α-catenina (não acontece a ligação correta com a ecad); 6) anormalidades na β-catenina (mutações e nível anormal podem alterar a função ou impedir a ligação com o actina da ecad) (Oyama et al., 1994); 7) alteração no controle da β-catenina (causa excesso e consequente anomalias na ecad; 8) alteração na fosforilação da ecad ou β-catenina; e 9) ecad está envolvida diretamente na TEM.

Perda de expressão da ecad é uma característica do carcinoma de mama e seus principais mecanismos são: 1) hipermetilação foi identificada como importante

alteração hipergenética da ecad (Hirohashi, 1998); 2) além da via de sinalização Wnt/ β-catenina, que inibe a expressão da ecad, existem outros fatores, como fator de transcrição Snail, Slug e Twist, que podem reprimir a ecad; 3) ação das MMP (MMP3 e MMP7); *stromelisyn* pode danificar a porção intracitoplasmática (van Roy e Berx, 2008; Onder et al., 2008). Todas essas vias que influenciam a ecad podem causar mudança nas células, com características epitelial para mesenquimatoso (Jiang e Manse, 2000; Wijnhoven et al., 2000; Cavallaro e Christofori, 2004; Onder et al., 2008).

Estudos mostram que o receptor de estrogênio, agindo negativamente sobre Snail, mantém a expressão da ecad, o que poderia explicar o mau prognóstico do tumor receptor negativo, em parte pela perda da ecad (Cowin et al., 2005; Heuberger e Birchmeier, 2009).

Endocitose pode remover a ecad da membrana citoplasmática e posteriormente reciclá-la novamente nos pontos de aderência (Wirtz-Peitz e Zallen, 2009).

Durante a carcinogênese, a perda da ecad é frequentemente associada com a expressão de caderina mesenquimal, como a N-caderina, fenômeno denominado *cadherin switching*. A repressão da ecad pelo Snail pode induzir a N-caderina expressa durante a TEM, sugerindo que essa re-expressão pode ser parte de uma reprogramação de desdiferenciação (Cano et al., 2000).

Na literatura, encontramos resultados conflitantes nos estudos que avaliaram a ecad no câncer de mama. Em relação a sua expressão nessa neoplasia, encontramos valores de 55% a 70% (Kowalski et al., 2003; Park et al., 2007a; Mahler-Araujo et

al., 2008), mas muitos estudos mostram redução que varia de 45% a 63% (Oka et al., 1993; Siitonen et al. 1996).

Alguns mostram relação com sobrevida (Maguire et al., 1997; Tan et al., 1999; Heimann et al., 2000; Asgeirsson et al., 2000; Harigopal et al., 2005; Paredes et al., 2008; Kashiwagi et al., 2010), mas outros não relacionam com sobrevida ou com intervalo livre de doença (Lipponen et al., 1994; Parker et al., 2001). Muitos mostram relação inversa em relação ao tamanho do tumor, ao grau de diferenciação histológico e ao comprometimento linfonodal (Oka et al., 1993; Hunt et al., 1997; Bànkfalvi et al., 1999; Nakopoulou et al., 2000; Madhavan et al., 2001; Bukholm et al., 1998, 2006), ao passo que outros não encontraram os mesmos resultados (Gamallo et al., 1993; Moll et al., 1993; Maguire et al., 1997; Gonzalez et al., 1999). Ao estudar tumor primário e a metástase correspondente, um autor encontrou ecad expressa em 45% dos tumores e em 100% das metástases. Segundo ele, isso pode ter sido provocado por alterações translacionais (Kowalski et al., 2003).

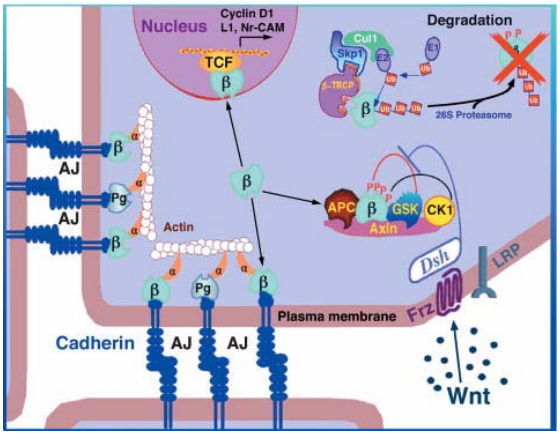
Em estudo com 245 casos de carcinoma invasivo, o autor descobriu que a não expressão de ecad estava associado ao tipo basal–like. Nesse estudo, 182 casos de carcinoma ductal invasivo foram avaliados por meio de IHQ em TMA. Ausência ou baixa expressão de ecad foi associada à ausência de expressão do receptor de estrógeno, à baixa expressão de ciclinas1, à positividade para citoceratina 5/6 e 17, à EGFR, ao p53, ao Ki-67 elevado, ao fenótipo basal-like e ao triplo negativo (Mahler-Araujo et al., 2008)

Num outro estudo com 574 casos de carcinoma ductal invasivo, 123 (21,4%) casos eram triplo negativo. Nesse subgrupo, os casos com expressão negativa de ecad tiveram pior evolução (Kashiwagi et al., 2010). Esses estudos mostram que

baixa expressão da ecad foi associada a tumores mais agressivos e, mesmo num grupo de mau prognóstico ela foi fator prognóstico independente.

4.4.3 β-Catenina

Complexo ecad-β-catenina.



Fonte: Grigoryan et al. (2008)

Figura 9 - β-Catenina.

Clonado por McCrea e Gumbiner (1991), a β-catenina não é propriamente uma molécula de adesão, mas faz parte do complexo ecad-catenina, além ter papel importante na via de sinalização Wnt/ β-catenina. Denominado catenina, vem do latim *catena*, que significa ponte e está localizado no cromossomo 16.

Em 1993, descobriu-se a interação com a proteína APC (*adenomatous polyposis coli*), que posteriormente mostrou-se importante para estabilização da β-catenina (Su et al., 1993; Polakis, 2000). Em 1996, foi descrita a interação da β-catenina com LEF (*lymphoid enhancer factor*) e TCF (*T-cell factor*) no núcleo que modula a expressão de genes (Behrens et al., 1960). No ano seguinte, foi descoberto o processo de fosforização da β-catenina e a posterior ação do sistema de degradação

das proteases. Inativação desse sistema provoca acúmulo de β-catenina no citoplasma, que se desloca posteriormente ao núcleo, onde interage com LEF/TCF e com outras proteínas (TBL1/dishevelled/c-jun) para formar um complexo de transcrição (Figura 9) (Li et al., 2008; Klaus e Birchmeier, 2008; MacDonald et al., 2009).

β-catenina é uma proteína multifuncional envolvida na adesão célula-célula mediado pela caderina e responde por várias vias de transdução, incluindo canônica Wnt/ β-catenina, Akt/proteína quinase B, fator de crescimento epidérmico (EGF), fator de crescimento insulina-like, fator nuclear κB, PTEN, p53 e receptor de ácido retinoico, entre outros (Heuberger, Birchmeier, 2006).

Sua função mais conhecida é na via canônica Wnt/ β-catenina. No núcleo, associa-se ao LEF/TCF, que promove a expressão dos genes c-myc, ciclina D1, c-jun, TCF-1, LEF-1, conductin/axina2 e MMP (Lin et al., 2000; Hatsell et al., 2003; Rowlands et al., 2004).

No citoplasma, a β-catenina (associada a APC/axina), na ausência de anormalidades, é fosforilada pelo complexo GSK3 (*glycogen synthase kinase 3*) e pela CKI (*casein kinase I),* que promovem a adição da ubiquitina (proteína), que possibilita degradação pelas enzimas. Quando da ativação da Wnt, o sistema GSK3/CKI não consegue mais fosforilar β-catenina, que não é degradada (estabilizada), acumula-se no citoplasma e desloca-se para o núcleo para associar-se ao TCF/LEF (Gumbiner et al., 1997; Smalley e Dale, 2001; Brembeck et al., 2006).

Estudos indicam que a β-catenina que faz parte do sistema Wnt/ β-catenina é a mesma do complexo ecad-catenina. Assim, o sistema de adesão célula-célula, ao competir pela mesma catenina, mostra que existe intercomunicação entre esses dois

sistemas e que as anormalidades de um afetam de alguma maneira o outro (Barth et al., 1997; Heuberger e Birchmeier, 2009). Exemplos dessas anormalidades: 1) proteólise das caderinas afeta a via Wnt (quebra das cateninas provoca liberação da β-catenina; 2) fosforilação dos componentes da caderina (enfraquece a ligação com a β-catenina), complexo de degradação da β-catenina (altera a ligação da β-catenina) e sistema TCF (altera sua ligação com a β-catenina); e 3) reciclagem das caderinas dependentes do p120 e sua depleção provocam reciclagem da ecad e enfraquecimento da adesão celular p120 causa repressão do sistema Wnt (Clevers, 2006).

Em nível nuclear, estudos mostram que a β-catenina, estabilizada por estímulo da via Wnt ou por perda da caderina, induz a expressão de alguns genes: Saiu, Slug, Twist, L1 (molécula de adesão, mas que interfere com adesão da ecad) e proteases. Todos esses genes estão envolvidos com o fenômeno da TEM (Nelson e Nusse, 2004; Heuberger e Birchmeier, 2009).

Ativação da via Wnt/β-catenina e mutações do componente, como β-catenina/APC ou axina, são encontradas em outras neoplasias malignas, mas no câncer de mama tem sido pouco frequente ou inexistente (Candidus et al., 1996; Polakis, 2000).

Estudos com camundongos mostram que a ativação aberrante de Wnt1 (classe da Wnt) produz neoplasia de mama, mas no ser humano não foi encontrado nenhum transcrito do Wnt1 (Brown, 2001). Assim, não há evidências de anormalidades da via Wnt/β-catenina no câncer de mama (Smalley e Dale, 2001). Evidências indiretas indicam que essa via deve estar ativada, com base no achado de elevado nível de β-

catenina no citoplasma, no núcleo e no achado de transcriptos da β-catenina, como ciclina (Howe e Brown, 2004; Lin et al., 2000).

Alguns estudos mostram relação entre expressão da β-catenina e intervalo livre de doença, sobrevida global ou sobrevida global específica (Nakopoulou et al., 2000; Lin et al., 2000; Gillett et al., 2001; Chung et al., 2004; Dolled-Filhart et al. 2006).

Nakopoulou et al. (2000) estudou 69 casos de carcinoma ductal invasivo e encontrou positividade para β-catenina e para ecad em 43,5% e 26%, respectivamente. Nesse estudo, β-catenina associada à expressão de c-met foi fator preditivo e de bom prognóstico. Expressão reduzida foi associada a comprometimento linfonodal e a estádio avançado. No estudo de Dolled-Filhart et al. (2006), que avaliou 600 casos, baixa expressão de β-catenina foi associada a pior prognóstico. Nesse estudo, comparando com tamanho do tumor, idade, comprometimento linfonodal, grau nuclear e expressão de receptor de estrógeno, progesterona, c-erbB2 e Ki-67 foram fatores altamente prognósticos.

Chung et al. (2004) estudaram 346 casos de carcinoma e estava expresso em 70%. Nesse estudo, quando se avalia separadamente p53 e MET, houve correlação significativa com a sobrevida, mas quando se analisa p53 com β-catenina a sobrevida global foi pior. Gillett et al. (2001) estudaram 470 casos de carcinoma e avaliaram ecad e α/β/γ-catenina β-catenina estava expressa em 78% dos casos e, de modo surpreendente, a expressão de todos os marcadores foi associada a pior prognóstico.

Contudo, outros estudos mostram resultados diversos. Em 121 casos de carcinoma ductal avaliados, Karayiannakis et al. (2001) encontraram β-catenina expressa em 32% dos casos, mas sem relação com a sobrevida. Bànkfalvi et al.

(1999) encontraram o mesmo resultado em 55 casos de carcinoma ductal, com positividade de 36% e sem relação com a sobrevida.

Em outro estudo que avaliou 90 casos de carcinoma ductal, a β-catenina estava expressa em 55,6% deles, mas também não foi encontrada nenhuma relação. No estudo que avaliou ecad, α/β-catenina mostrou resultado inesperado; ecad e α/β-catenina estavam mais expressas no linfonodo comprometido do que no tumor primário (Bukholm et al., 2000).

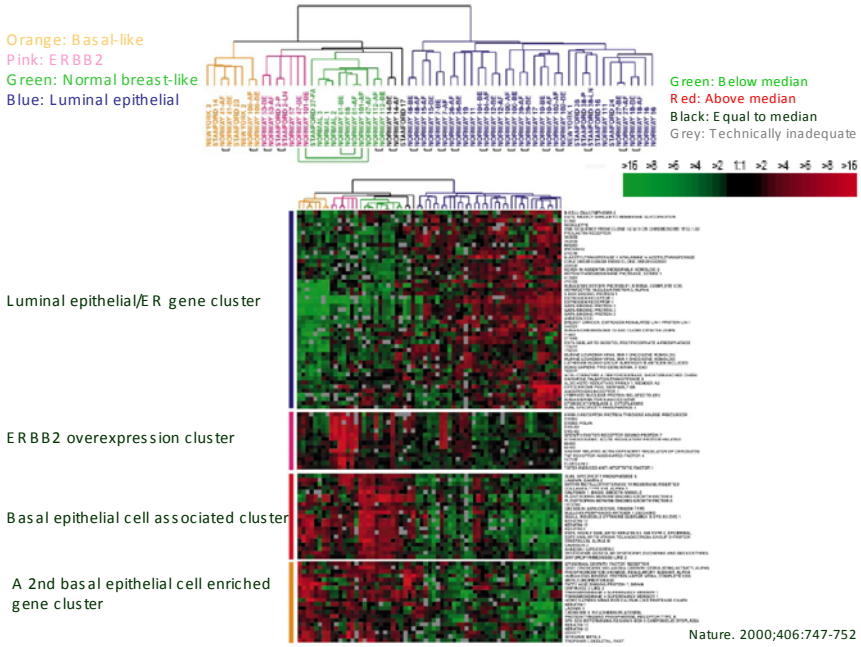
Alguns estudos mostram relação com comprometimento linfonodal (Hashizume et al., 1996) ou ausência de comprometimento (Zschiesche et al., 1997), ao contrário de outros que não encontraram essa mesma relação (Bànkfalvi et al., 1999; Gonzalez et al., 1999; Pedersen et al., 2002). Na literatura, encontramos resultados diversos.

Estudos recentes mostram que a via Wnt/β-catenina ativada é expressa na forma basal-like. Um deles avaliou cultura de tecido e tumor (41 casos de carcinoma). Na cultura de tecido a estabilização da β-catenina estava associada ao fenótipo compatível com células mesenquimatosa e em 7 de 18 casos classificados como basal-like a β-catenina foi encontrada no núcleo (Khramtsov et al., 2010).

4.4.4 Classificação Molecular do Câncer ductal de mama sem outras especificações

Recentemente, com a descrição do perfil genômico do câncer de mama, as neoplasias foram classificadas em cinco categorias: luminal A, luminal B, hiperexpressão de Her-2, triplo negativo e basal-like. Segundo essa classificação, tumores basal-like e hiperexpressão de Her-2 apresentam pior sobrevida em relação

aos subtipos luminal A e B. Outro perfil genômico que avalia 70 genes classifica os tumores como de bom prognóstico (baixa probabilidade de desenvolver metástase) e de mau prognóstico (alta probabilidade de desenvolver metástase). No futuro, talvez esses perfis genômicos identifiquem com mais precisão as pacientes com risco de desenvolver metástases do que os fatores prognósticos convencionais utilizados no momento (Figura 10).



Fonte: Perou et al. (2000)

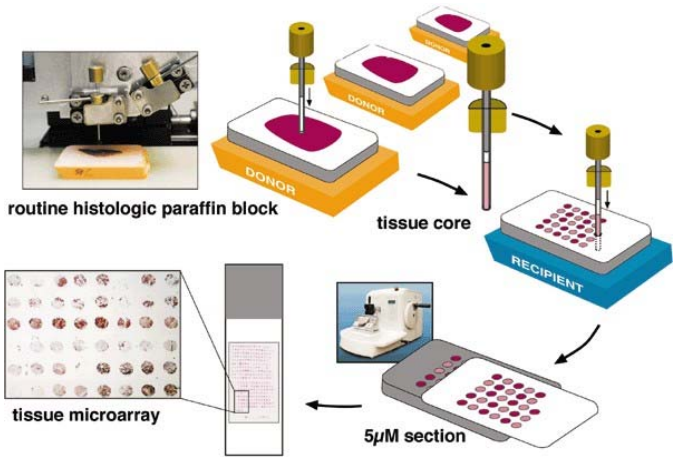
Figura 10 - Perfil fenotípico baseado em expressão gênica.

Recentemente, alguns autores sugeriram um novo subtipo, além do proposto pelo estudo do perfil genético (luminal A, luminal B, hiperexpressão do Her-2, triplo negativo e normal), denominado *claudin-low* (Prat et al., 2010). Esse grupo caracterizaria-se pela baixa expressão das CLD-3, CLD-4 e CLD-7, de ocludina e de ecad, pela expressão de marcadores endotelial e linfocítico e pelas características

mesenquimais (Herschkowitz et al., 2007; Visvader, 2009). Estudo sobre câncer de mama metaplásico mostra que, assim como o grupo de *claudin–low*, expressa pouco GATA-3 e moléculas de adesão célula-célula e hiperexpressa marcadores relacionados com células-tronco e TEM (Hennessy et al., 2009; Siegel e Muller, 2010). Esse grupo caracterizaria-se por receptor de estrógeno e de progesterona e her2 negativo, CK5/6 positivo ou negativo, ecad e baixa expressão de claudina (Prat et al., 2010).

4.5 TMA (Tissue Microarray)

A primeira técnica de TMA foi descrita em 1987, mas foi a partir de 1998, quando Kononen et al. desenvolveram o aparelho que permitiu sua reprodução rápida que ela popularizou-se (Camp et al., 2000; Nocito et al., 2001). Sua grande vantagem é permitir avaliação de milhares de casos dispostos numa lâmina de microscopia (Figura 11e 12).



Fonte: Kononen et al. (1998)

Figura 11 - Técnica de confecção de TMA.

As punções podem ser de 0,6 mm a 2 mm de diâmetro. Outros autores adaptaram a técnica para tumores congelados, cultura de células e punção de biopsias. A maioria dos estudos com TMA é utilizada para avaliar marcadores por IHQ, mas têm sido usados para técnicas de hibridização *in situ* (FISH) também. Em 2008, 10% das publicações com IHQ incluíam TMA (Camp et al., 2008).

Suas vantagens são inúmeras: economiza tempo, o bloco doador pode ser usado centenas de vezes, economiza reagentes e técnicos, aumenta muito a quantidade de casos que podem analisados em comparação ao método tradicional de corte de lâmina, permite avaliação simultânea dos casos e em condições semelhantes e pode ser facilmente compartilhado (Camp et al., 2008).

Suas desvantagens são: representa 0,3% do tumor e perda antigenicidade. Vários estudos avaliaram a questão da representatividade e mostraram que existe grande correlação entre TMA e método tradicional de exame na lâmina (Camp et al., 2000). Aparentemente, antigenicidade também não se altera com a técnica, porém há estudos que mostram o contrário (Shergill et al., 2004; Fergenbaum et al., 2004).

Figura 12 - Exemplo de TMA (receptor estrógeno).

MÉTODOS

5 MÉTODOS

5.1 CASUÍSTICA

Nos arquivos médicos (SAME) do Hospital A.C. Camargo procuramos pacientes portadoras de câncer de mama bilateral tratadas no Departamento de Mastologia. Encontramos 163 pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama bilateral no período de 1970 a 2004. Após as exclusões, restaram 45 casos para o presente estudo. As causas para exclusão foram falta de bloco de parafina, desenvolvimento de outro tumor em sítio primário diferente, carcinoma lobular invasivo, carcinoma intraductal de mama, tratamento realizado em outra instituição, tipo histológico diferente e diagnóstico de metástase na apresentação.

Após a seleção dos casos, aplicamos um questionário com 61 questões para obtenção dos elementos para formação do banco de dados. Retrospectivamente, obtivemos, autor e uma colega do departamento (Dra. Solange T. M. Carvalho), as informações do questionário dos prontuários, registrando o número do anatomopatológico correspondente ao do bloco tumoral, conservado em parafina, da mama inicial e contralateral para posterior solicitação.

5.1.1 Critérios para Seleção

- Portadora de carcinoma ductal invasivo de mama sem outras especificações nas duas mamas, independentemente de serem sincrônicos (intervalo abaixo de 12 meses) ou metacrônicos (intervalo acima de 12 meses);

- Sem indícios clínicos ou de imagem de metástases ao diagnóstico da neoplasia inicial;
- Ausência de tratamento oncológico prévio.

Os seguintes critérios foram utilizados para exclusão:

- Carcinoma lobular invasivo ou *in situ*;
- Carcinoma intraductal em qualquer um dos lados;
- Desenvolvimento de outra neoplasia maligna durante o acompanhamento;
- Material insuficiente para análise IHQ.

5.1.2 Dados Demográficos e Clínicos

Foram avaliados os seguintes dados demográficos: idade ao início do tratamento, perfil menopausal (utilizando arbitrariamente a idade de 50 anos como divisão entre pré e pós–menopausa), raça (branca e não branca), tempo de queixa em meses, idade da menarca e da menopausa, paridade, idade da primeira gravidez, história familiar e tipo de histórico familiar (mãe, irmã, filha ou outro parentesco), uso de anticoncepcional e anos de uso e data do início do tratamento. Registramos o intervalo em meses entre os tumores para caracterizá-los como sincrônico ou metacrônico.

5.1.3 Estadiamento Clínico

Consideramos tamanho (T) do tumor e perfil linfonodal (N) da axila com base na avaliação ao exame clínico inicial que constava no prontuário. Nos casos em que não era possível avaliar o tamanho tumoral (biopsia prévia e lesão não palpável), consideramos o laudo anatomopatológico (pT), mas foram poucos. O estadiamento

clínico dos casos foi atualizado conforme a Classificação de Tumores Malignos da União Internacional Contra o Câncer (UICC) (Sobin e Wittekind, 2004)

Como esse estudo analisa câncer de mama bilateral na mesma paciente, os casos serão doravante denominados mama 1 e os tumores da mama contralateral (sincrônico ou metacrônico) de mama 2.

5.1.4 Evolução da Doença

Nos primeiros cinco anos o seguimento era feito semestralmente e constava de consulta clínica, avaliação de queixas, exame físico e mamografia anualmente. Exames diagnósticos de imagem eram feitos somente se a paciente apresentasse alguma queixa relevante. Após o quinto ano, passava para seguimento anual indefinidamente.

Nesse estudo, avaliamos recidiva locorregional e metástase e suas respectivas datas e tratamentos. Recidiva locorregional foi definida como reaparecimento de tumor na cicatriz operatória homo ou contralateral e linfonodo axilar contralateral ou acometimento cutâneo da região axilar, além da fossa infra e supraclavicular homo ou contralateral.

Metástase foi definida como aparecimento de tumor em osso, no pulmão, no fígado, no cérebro ou em outras vísceras.

Em relação ao evento final, foi feita a seguinte classificação: vivo sem doença, vivo com doença, morte por câncer, morte assintomática e perdido de seguimento (definido como cinco anos sem retorno ao hospital).

5.2 MÉTODOS

- 30 agosto 2007: estudo aprovado pela Comissão de Ética (Cappesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo sob número 0749/7;
- 10 julho de 2007: estudo aprovado pela Comissão de Ética da Comissão de Ensino da (Instuto de Radiologia - INRAD sob número 0749/7;
- Julho 2007: estudo aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Hospital A. C. Camargo sob número 950/07.

5.2.1 Dinâmica do Atendimento

As pacientes analisadas foram tratadas somente no Departamento de Mastologia do Hospital A. C. Camargo no período de 1970 a 2004.

Segundo a rotina da época, todas as pacientes admitidas no serviço eram inicialmente examinadas clinicamente e depois se fazia o estadiamento clínico. Após a avaliação, pedia-se a todas as biopsiadas em outro serviço que trouxessem lâminas e blocos de parafina para confirmação diagnóstica. Após estadiamento baseado na classificação TNM da época, solicitavam-se exames para completar o estadiamento (RX de tórax, cintilografia óssea, marcadores tumorais e mamografia). Após essa avaliação, agendavam-se as pacientes cirúrgicas para a cirurgia; as sem indicação cirúrgica eram encaminhadas para tratamento sistêmico ou radioterápico. Pacientes biopsiadas em outros serviços eram submetidas a radioterapia pré-operatória e posteriormente a cirurgia.

Para diagnóstico, algumas pacientes eram submetidas a biopsia incisional em ambulatório, enquanto outras eram biopsiadas durante a cirurgia, com exame de congelação para confirmação do diagnóstico de carcinoma e subsequente cirurgia. Nessa época, a técnica mais utilizada era mastectomia radical de Halsted. Casos que recebiam radioterapia pré-operatória eram sempre submetidos a mastectomia radical. Tratamento conservador tornou-se mais comum após 1993, assim como a mastectomia radical modificada de Pattey e a utilização da técnica do linfonodo sentinela após 2000.

Após a cirurgia, o exame anatomopatológico era avaliado para continuidade do tratamento. Segundo o protocolo da época, casos sem comprometimento linfonodal não recebiam radioterapia ou tratamento sistêmico adjuvante, assim, essas pacientes iniciavam programa de seguimento ambulatorial.

Pacientes com indicação de radioterapia adjuvante eram encaminhadas ao departamento correspondente para avaliação e aquelas com indicação de tratamento sistêmico o iniciavam no próprio departamento. Geralmente, o esquema utilizado era a associação de ciclofosfamida, methotrexate e 5-fluorouracil. Bloqueador de receptor de estrógeno (tamoxifen) não era usado rotineiramente até 1992. Mesmo porque, não se realizava avaliação de rotina de receptor de estrógeno ou de progesterona até por volta de 1997.

5.2.2 Métodos Cirúrgicos, Radioterápicos e Sistêmicos

Todos esses itens foram avaliados para mama 1 e para mama 2.

Com relação às técnicas cirúrgicas utilizadas

Foram várias as técnicas usadas nesse material, a saber:

a) Mastectomia radical (técnica de Halsted, WS);

b) Mastectomia radical modificada (técnica de Pattey, DH);

c) Mastectomia radical modificada (técnica de Madden, JL);

d) Mastectomia radical modificada (técnica de Auchincloss): retirada total da mama e preservação dos músculos peitorais e linfadenectomia nível I ou grupo inferior (conteúdo axilar lateral ao músculo peitoral menor) e níveis I e II se comprometido por metástase;

e) Mastectomia simples: retirada total da mama sem linfadenectomia;

f) Tratamento conservador (ressecção segmentar, tumorectomia e quadrantecomia): retirada do tumor com margem de segurança e preservação dos músculos peitorais associadas a linfadenectomia axilar completa (níveis I, II e III) ou pesquisa de linfonodo sentinela e linfadenectomia axilar (no mesmo ato cirúrgico ou posteriormente), se comprometida por metástase.

Com relação à radioterapia

A maioria foi tratada com radioterapia pós-operatória, seguindo as normas preestabelecidas do departamento na época. A dose por aplicação foi de - 180 a 200 cGy por dose no total de 5.000 cGy Algumas pacientes biopsiadas em outro serviço ou que apresentavam área muito extensa para ressecção cirúrgica oncológica de

início, receberam radioterapia no período pré-operatório e posteriormente foram reavaliadas para cirurgia, que geralmente correspondia a mastectomia radical.

Em relação ao tratamento radioterápico, avaliamos se foi pré ou pós-operatório, data de início da radioterapia, dose total em cGy e campos utilizados (. Campo 1 (esternal), campo 2 (fossas infra e supraclaviculares), campo 3 (mamária interna) e campo 4 (mamária externa).

Com relação ao tratamento sistêmico

Durante o período de estudo desse material houve muitas mudanças nas indicações, na associação de medicamentos e no número de ciclos, assim como no uso do bloqueador de receptor hormonal. Até por volta de 1992, a indicação era apenas para pacientes com comprometimento linfonodal, independentemente do estadiamento clínico ou do tamanho do tumor, e não se realizava avaliação dos receptores de estrógeno ou de progesterona. O esquema de quimioterapia mais utilizado era a associação de três medicamentos: ciclofosfamida, methotrexate e 5-fluorouracil (CMF) a cada 21 dias, sendo seis ciclos no total (havia outras associações), sem quimioterapia neoadjuvante (pré-operatória) nem tamoxifen. Assim, até por volta de 1997 todos os casos receberam quimioterapia adjuvante (pós-operatória). Por volta de 1997, iniciou-se o uso de quimioterapia neoadjuvante para casos localmente avançados (EC IIIA e IIIB) e introduziram-se outros medicamentos, como adriamicina. Nesse período, uso do bloqueador de receptor de estrógeno (tamoxifen) tornou-se mais rotineiro. Assim, no nosso material foi pequeno o número de pacientes tratadas com ele no primeiro câncer de mama.

Nesse item, estudamos se foi feita quimioterapia ou não, qual o esquema utilizado, o número de ciclos, o intervalo entre as seções e a dose total dos medicamentos e o intervalo entre cirurgia e quimioterapia.

5.2.3 Revisão de Lâmina e Preparo do TMA

Separamos os blocos de parafina e as lâminas dos tumores considerando a numeração que constava no laudo anatomopatológico arquivado no prontuário da paciente. Da década de 1980 até por volta de 1995, usava-se formol a 10% não tamponado para preservação das peças; a partir de 1995 começou a ser utilizado formol tamponado a 10% (informação do técnico do laboratório da época). Alguns casos tinham poucos blocos, enquanto outros tinham dezenas deles. Havia poucos sem blocos contendo a neoplasia, pois eram casos que foram biopsiados em outro serviço, com ressecção por completo do tumor e não foram encontrados na peça operatória. Eles casos foram avaliados nos blocos de parafina solicitados pelo serviço ao laboratório de origem para fins de revisão de lâmina quando do início do tratamento, prática de rotina no departamento. Após seleção do melhor bloco para análise pelo patologista (FAS, DMB), para alguns casos foram confeccionadas novas lâminas, coradas pela técnica de H&E, para revisão para certificação da neoplasia e do diagnóstico de carcinoma ductal invasivo e para escolher o melhor local para confecção do TMA. Outros casos foram avaliados com base nas lâminas em nossos arquivos. Nas lâminas selecionadas, o local para retirada do cilindro do bloco doador correspondente para confecção do TMA foi marcado com caneta.

Nos casos submetidos a tratamento radioterápico ou quimioterápico pré-operatório o bloco utilizado sempre foi aquele que não havia sido submetido a

tratamento prévio, que geralmente correspondia ao da biopsia diagnóstica para não afetar a IHQ e a leitura das lâminas.

Usando TMA (Beecher Instrument, Silver Springe, MD, USA), foram realizadas "punções" (cilindros de 0,6 mm de diâmetro) do local de interesse e transferidas ao bloco receptor (Figura 12), com apenas uma retirada por tumor.

A disposição desses cilindros no bloco foi reproduzida numa planilha Excel num sistema de coordenada, sempre em ordem crescente com relação ao número dos laudos anatomopatológicos, sendo 14 cilindros na vertical e 16 na horizontal (14x16), tendo como um fragmento de placenta como referência na marca (0x0) (Anexo 3).

A partir desse bloco receptor, foram seccionadas películas de 5 µm, contendo as neoplasias, que foram transferidas para uma lâmina de leitura. Foram confeccionadas duas lâminas nas extremidades do bloco, para melhor avaliação dos tumores, para cada marcador, para fins de IHQ.

As lâminas foram revisadas por patologistas (FAS e MDFSB) para confirmação do diagnóstico de carcinoma ductal invasivo, além da avaliação do grau nuclear, classificado como I, II e III com base no pleomorfismo GNI (pouca variação), GNII (moderada variação no tamanho e no volume) e GNIII (variação acentuada); infiltrado linfocitário; desmoplasia; necrose; índice mitótico; e grau histológico baseado na escala de Scarf, Bloom & Richardson (SBR) e modificado por Elston e Elis. A escala SBR consiste na avaliação da formação tubular (<10%, 10%-75% e >75%), pleomorfismo nuclear (pequena, média e acentuada) e índice mitótico (apenas figuras bem-definidas).

Informações coletadas do prontuário em relação ao anatomopatológico incluíam número dos exames, tipo histológico, receptores de estrógeno e de progesterona, linfonodos dissecados e comprometidos e nível de comprometimento (níveis I, II e III). Invasões vascular, linfática, perineural e muscular, componente intraductal e grau de diferenciação constavam dos laudos, mas essas informações eram muito escassas. Não havia descrição da medida tumoral neles. Assim, o tamanho tumoral (T) foi baseado no estadiamento clínico.

5.2.4 Imunoistoquímica

As reações de IHQ foram realizadas de acordo com os padrões do Departamento de Anatomia Patológica do Hospital A.C. Camargo, que podem ser vistos no Anexo 4.

Os anticorpos pesquisados; clones; diliuição utilizados podem ser vista na Quadro 5. Reações imunoistoquimicas foram realizadas em duas lâimna para garantir a avaliação de áreas distintas da neoplasia, utilizando-se o método de complexo stretavidian biotina peroxidase (SterptaABC-DAKO).

Quadro 5 - Anticorpos pesquisados, clones e diluição utilizada.

Anticorpos	Clones	Diluição	Fabricantes	Marcação (*score*)
C-erb-B2	Policlonal em coelho	1:2000	DakoCytomation, A485; Glostrup, Dinamarca	Membrana
Receptor de estrógeno	Monoclonal em coelho	1:50	Neomarkers, cat#RM9101, Fremont, CA, USA	Núcleo
Receptor de progesterona	PgR636	1:400	DAKOCytomation, Glostrup, Dinamarca	Núcleo
β–catenina	14	1:800	BD Transduction, cat# 610154, San Jose, CA, EUA	Membrana
p53	DO-7	1:200	DakoCytomation, cat#M7001, Glostrup, Dinamarca	Núcleo (+) >10% (--) <10%
Citoqueratina 5	XM26	1:300	Neomarkeres, cat# MS-1896, Fremont, CA, EUA	Citoplasma
Citoqueratina 14	LL002	1:400	Biogenex cat#146, San Ramon, CA EUA>	Citoplasma
Ki-67	MIB-1	1:200	DakoCytomation, cat#M7240, Glostrup, Dimarca	Núcleo (+) >20% (--) <20%
E–Caderina	36	1:600	BD Transduction, cat#610182, San Jose, CA, EUA	Membrana
Claudina 4	Policlonal coelho	1:400	Zymed.	Membrana
Claudina 7	Policlonal em coelho	1:100	Labvision cat#RB266, Fremont, CA, EUA	Membrana

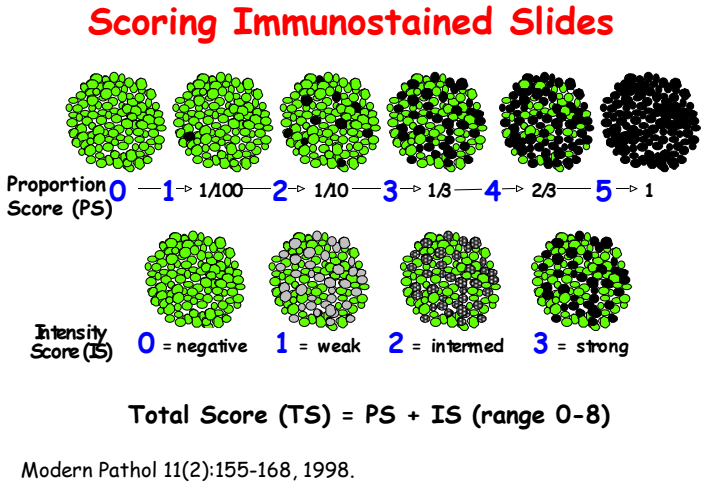
5.2.5 Avaliação das Expressões Imunoistoquímicas

As lâminas foram avaliadas por dois patologistas (FAS e MDFSB). A leitura foi feita em microscopia óptica com aumento de 400x (ocular 10x e objetiva de 40x).

Para interpretação da reatividade IHQ do antígeno p53, adotamos a seguinte padronização: considerado como positivo (+) com 10% ou mais de células tumorais com intensa coloração nuclear; caso contrário, se até 10% ou menos dos núcleos estivessem corados, consideramos negativo (Ogawa et al., 2008; Akkiprik et al., 2009).

Para receptor de estrógeno e de progesterona, utilizamos o índice de imunorreatividade publicada previamente (Allred et al., 1998). TS (*total score*) é a somatória de escores que varia de 0 a 8; PS (*proportion score*) varia de 0 a 5 e também de acordo com a proporção de células coradas; e IS (*intensity score*) é o escore de intensidade que varia de 0 a 3 de acordo com a intensidade de coloração das células marcadas (Figura 13).

Consideramos como positivos os casos cuja somatória de escores foi maior que 3.



Fonte: Allred et al. (1998)

Figura 13 - Ilustração esquemática do método de avaliação por IHQ.

Para marcação dos antígenos claudina-4 e 7, utilizamos o critério de escore semiquantitativo, considerando a intensidade da coloração e a quantidade de células marcadas (apenas células com membrana coradas) (Figuras 14 e 15, 17 e 18).

A intensidade da marcação foi avaliada utilizando-se a seguinte graduação: (0) ausente, (1+) fraco, (2+) moderado e (3+) forte. A porcentagem de células marcadas foi: (1) menos que 10%, (2+) positividade entre 10% a 50% e (3+) mais

que 50%. Os dois escores foram multiplicados, com resutado de 0–9 (Hsueh et al., 2010) (Figuras 14 a 19).

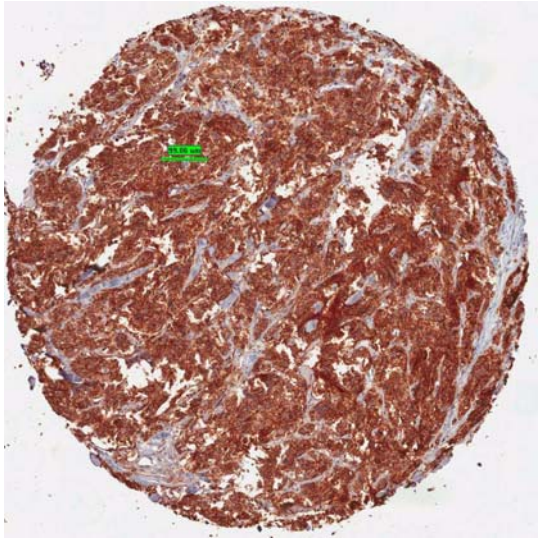


Figura 14 - Claudina-4 positiva.

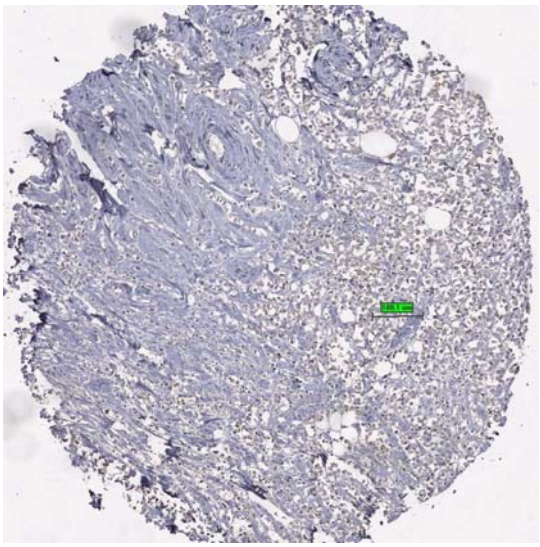


Figura 15 - Claudina-4 negativa.

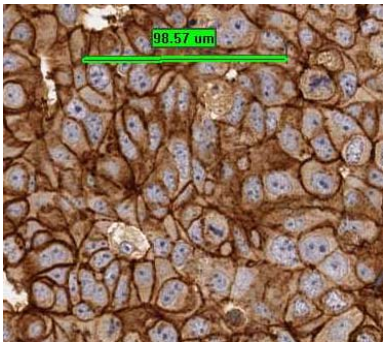


Figura 16 - Claudina-4 positiva em maior aumento.

Figura 17 - Claudina-7 positiva.

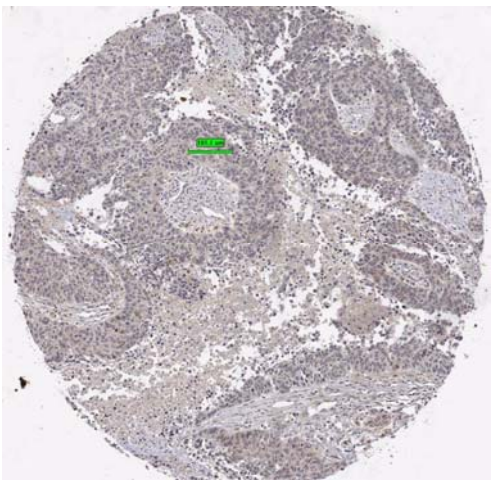


Figura 18 - Claudina-7 negativa.

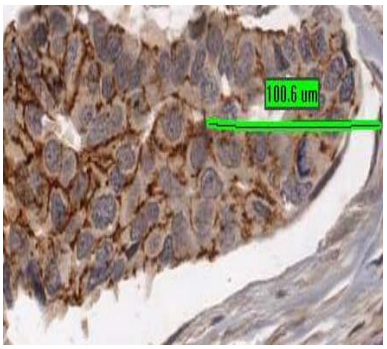


Figura 19 - Claudina-7 positiva em maior aumento.

Na avaliação da ecad, consideramos somente a marcação da membrana, sendo positiva sua marcação preservada (Figuras 20 e 22) e negativa sua marcação reduzida ou ausente (Figura 21) (Gould Rothberg e Bracken, 2006).

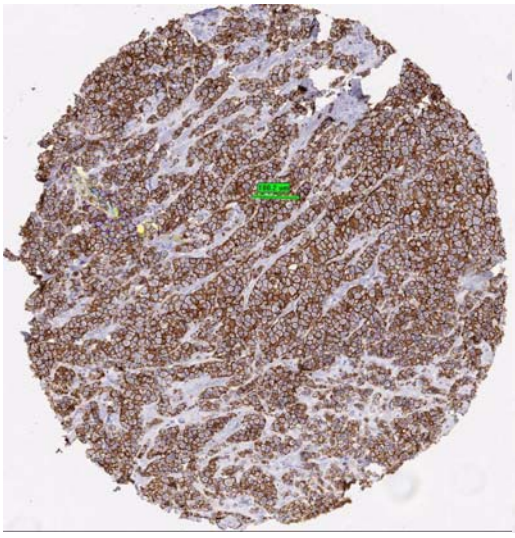


Figura 20 - ecad positiva.

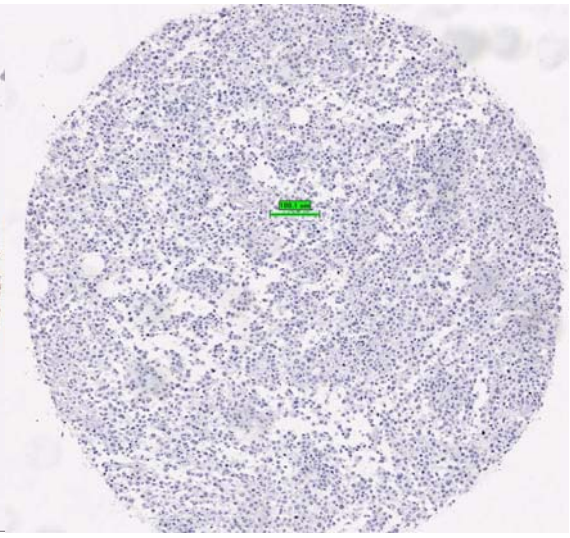


Figura 21 - ecad negativa.

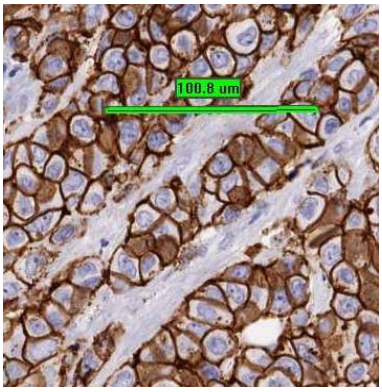


Figura 22 - ecad positiva da em maior aumento

Com base em suas características celulares, β-catenina foi avaliada em relação à membrana, ao citoplasma e ao núcleo, sendo positiva a marcação da membrana semelhante aos controles positivo e negativa ou alterada a marcação do núcleo ou do citoplasma (Figuras 23 a 26) (Gulmann et al., 2003).

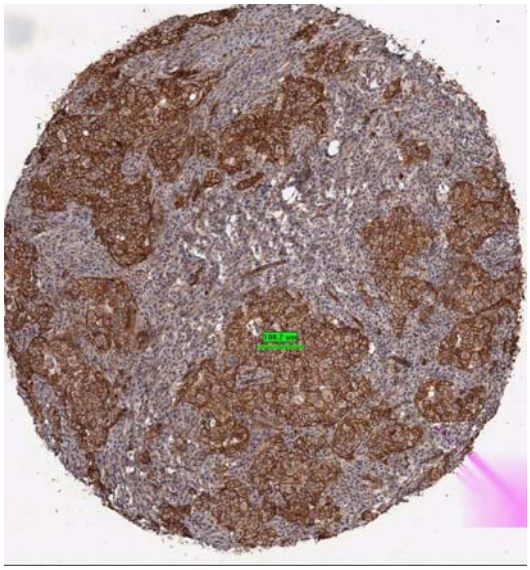


Figura 23 - β-catenina positiva.

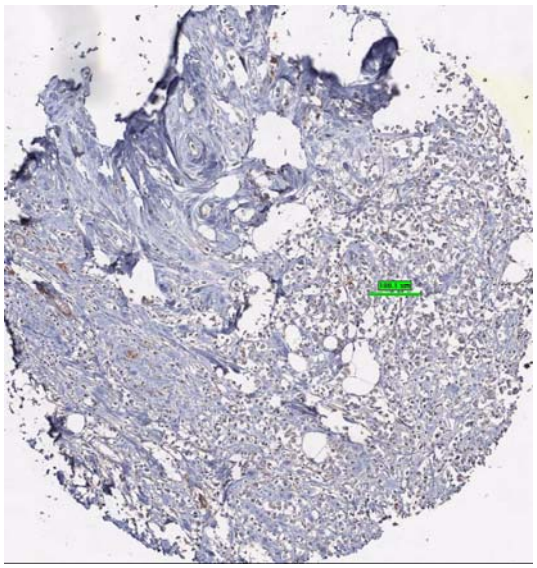


Figura 24 - β-catenina negativa.

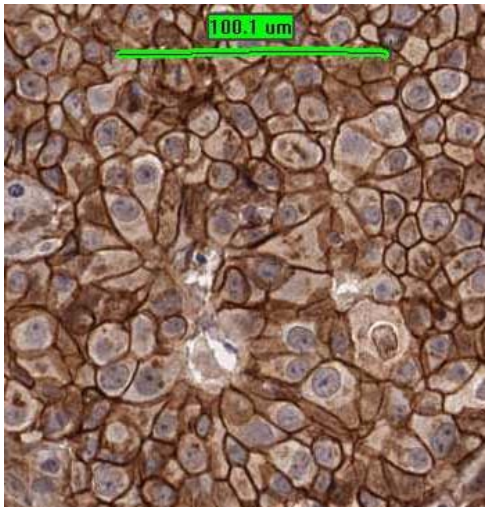


Figura 25 - β-catenina positiva em maior aumento.

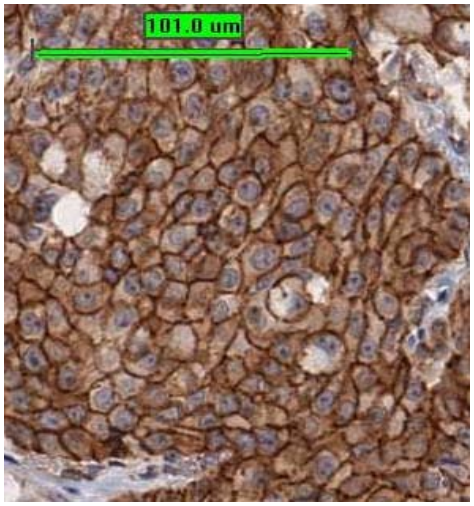


Figura 26 - β-catenina positiva em maior aumento.

Estudo para c-erb-B2 foi realizado com Hercep Test, disponível comercialmente e aprovado pela governo americano (FDA), determinando-se o escore de acordo com os critérios adotados pela fabricante (DAKO). Somente o componente invasivo foi considerado para fins de avaliação. O escore consistiu em: (0) não coloração; (1+) fraco, coloração de membrana esparsas; (2+) fraco a moderada coloração completa da membrana (mais que 10% das células apresentava reatividade fraca ou modera, mas não uniforme). Nesses casos, realizamos FISH para avaliar presença de mutação. Com esse teste, avaliamos a relação gem HER2/CEP (cromossomo 17) por núcleo e se estivesse entre 1,8 a 2,2 ou o número de cópias estivesse entre 4,0 a 6,0, consideramos como positivo (indicativo de amplificação gênica; e (3+) coloração forte e completa de toda a membrana (mais que 30% das células com reatividade intensa e uniforme) (Wolff et al., 2009).

Ki-67 foi avaliado segundo um sistema de escala de escore visual baseado na porcentagem de células coradas pelo anticorpo e subdividido em escala crescente de intervalo de porcentagens: 0% a 20%, 20% a 40% e acima de 40%. O valor acima de 20% das células coradas foi considerado como ponto de corte para fins de definição de positividade (alto índice) (>20%) e negativo (baixo índice) <20% (Penault-Llorca et al., 2009).

Citoceratinas 5 e 14 foram avaliadas nas células tumorais. Foram consideradas positivas quando da marcação positiva fraca ou forte (Nielsen et al., 2004; Collins et al., 2009).

5.2.6 Métodos Estatísticos

Na fase inicial foi feita análise das frequências e descrição das variáveis demográficas, terapêutica e histopatológicas e dos marcadores. Em seguida, foram feitos estudos de concordância de dados das variáveis. Finalmente, foi realizado teste estatístico de McNemar comparando o tumor da mama 1 com a mama 2. Esse é um teste não-paramétrico para duas variáveis aleatórias pareadas num mesmo espaço amostral (dentro do mesmo paciente). Os testes foram realizados no software livre R (versão 2.11.1). O nível de significância adotado foi de $p < 0,05\%$.

RESULTADOS

6 RESULTADOS

6.1 DADOS DEMOGRÁFICOS e CLÍNICOS

Analisamos 45 casos de carcinoma ductal invasivo de mama, sendo 17 sincrônicos (intervalo maior que 12 meses) e 28 metacrônicos (intervalo maior que 12 meses). A idade ao diagnóstico do primeiro tumor variou de 28 a 75 anos, com mediana de 52 anos, e da mama contralateral variou de 31 a 75 anos, com mediana de 55 anos. O intervalo entre os tumores foi de 0 a 308 meses, com mediana de 16 meses. Analisando somente os casos metacrônicos, a mediana do intervalo foi de 50,5 meses (12-308 meses).

No item antecedentes familiares de câncer de mama, 10 pacientes tinham históricos, sendo 5 (11,1%) com parentes de 1º grau (3 irmãs, 1 mãe, 1 mãe e 1 irmã), 3 com parentes não de 1º grau e 2 sem informe de parentesco. Em relação ao perfil menopausal, 21 pacientes (46,4%) foram classificadas como pré-menopausada e 24 (53,33%) como pós-menopausadas. A idade da menarca variou de 10 a 17 anos, com média de 13 anos, e a idade de menopausa variou de 37 a 58 anos, com média de 49 anos. A maioria das pacientes era multigesta, pois 15 (41%) apresentavam histórico de três gravidezes ou mais, sendo que a idade da primeira variou de 17 a 47 anos, com média de 25 anos. Somente 8 (20%) das pacientes relataram uso de anticoncepcional. O tempo de queixa variou de 13 a 120 meses, com média de 13 meses. A raça predominante foi branca, com 39 pacientes (86%).

6.2 RELATIVO AO TUMOR PRIMÁRIO E AO TUMOR DA MAMA CONTRALATERAL

A distribuição do tamanho tumoral da mama 1 assim foi: T1- 12 casos (26,66%), T2- 12 (26,66%), T3- 7 (15,55%) e T4- 14 (31,11%). Estadiamento clínico foi: EC I: 12 casos (26,66%), EC II: 11 (24,44%) e EC III: 22 (48,88%). Na mama 2 encontramos: T1- 17 (37,77%), T2- 22 (48,88%), T3- 1 (2,22%) e T4- 5 (4,06%), com estadiamento clínico: EC I: 13 (28,88%), ECII: 25 (55,55%) e ECIII: 7 (15,55%) (Tabela 1). Análise da distribuição dos tumores nos casos metacrônicos mostra que na mama 1 quase metade dos tumores é T1 e T2; na mama 2, T1 mais T2 somam 82% dos tumores. De modo geral, os tumores sincrônicos seguem o mesmo padrão (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição do tamanho (T) e do estadiamento clínico entre os tumores.

	MAMA 1 (%)	**MAMA 2 (%)**
TUMOR		
T1	12(26,66)	17(37,77)
T2	12(26,66)	22(48,88)
T3	7(15,55)	1(2,20)
T4	14(31,11)	5(11,11)
ESTADIO CLINICO		
EC I	12(26,66)	13(28,88)
EC II	11(24,44)	25(55,55)
EC III A/B	22(48,88)	7(15,55)

6.3 TRATAMENTO CIRÚRGICO

Em relação ao tratamento cirúrgico, tanto na mama 1 (37 casos - 82,22%) como na mama 2 (35 casos – 77,77%) a maioria foi submetida a alguma forma de mastectomia e 8 (17,70%) na mama 1 e 8 na mama 2, a tratamento conservador, respectivamente. Na mama 2, uma paciente foi submetida somente a ressecção do tumoral (Tabela 2).

Tabela 2 - Distribuição do tipo de tratamento cirúrgico entre os tumores.

	MAMA 1 (%)	**MAMA 2 (%)**
Mastectomia	37(82,2)	35(77,77)
Ressecção segmentar	8(17,77)	8(17,7)
Não operou		1(2,20)

6.4 LINFADENECTOMIA AXILAR

Em relação ao tratamento da axila, a maioria foi submetida a alguma forma de linfadenectomia axilar (nível I, II ou III) e poucos casos foram submetidos a estudo do linfonodo sentinela (1 caso na mama 2) ou não houve nenhuma exploração (4 casos na mama 2). Na mama 1, foram dissecados de 1 a 41 linfonodos (média 21,66) e na mama 2, de 0 a 38 linfonodos (média de 18,75) (Tabela 3).

Tabela 3 - Distribuição das variáveis relacionados à linfadenectomia axilar.

		MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
pN -- 0		24(53,33)	28(60,0)
pN +	1 – 3	8(17,77)	10(22,22)
	4 – 9	9(20,0)	3(6,66)
	> 10	5(11,11)	3(6,66)
Lnd Dissecados		Media : 21,66	Media: 18,75
	0 – 10	5(11,11)	14 (31,11)
	11 - 20	16(35,55)	8(17,45)
	> 21	24(53,33)	23(51,11)
Niveis Comprometimento			
	I	12(26,66)	12(26,66)
	II	7(15,55)	2(4,44)
	III	2(4,44)	2(4,44)

6.5 TRATAMENTO RADIOTERÁPICO

A maioria recebeu tratamento radioterápico tanto na mama 1 como na mama 2. Na mama 1, 29 casos (64,44%) e na mama 2, 27 casos (60,0%) no pós-operatório e algumas no pré-operatório. Na mama 2, 14 casos (11,38%) não receberam radioterapia. A dose de radioterapia na mama 1 variou de 5.000 cGy a 6.200 cGy (média de 4.886 cGy) e na mama 2 variou de 4.000 cGy a 6.000 cGy (média de 5.034 cGy). A maioria das pacientes nos dois grupos recebeu aplicação em mais de um campo (Tabela 4).

Tabela 4 - Distribuição das variáveis do tratamento radioterápico entre os tumores.

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Radioterapia		
Pre–Op	8(17,77)	2(4,44)
Pos-Op	29(64,44)	27(60,0)
Não	8(17,77)	14(31,11)
Dose radioterapia	Média: 4.840 cGy	Média: 5.034 cGy
Número campos irradiação		
1	11(29,72)	9(29,03)
2	9(24,32)	7(22,58)
3	11(29,72)	11(35,48)
4	5 (13,51)	2(6,45)

6.6 TRATAMENTO SISTÊMICO

Muitas pacientes em ambos os grupos não receberam tratamento sistêmico adjuvante. Na mama 1, 22 casos (48,88%); na mama 2, 29 (64,44%). No tratamento da mama 1, 2 casos receberam quimioterapia neoadjuvante e o esquema mais usado foi CMF. Outros esquemas incluíam epirubicina e adriamicina. Apenas 7 pacientes receberam tamoxifen (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição das variáveis relacionadas ao tratamento sistêmico entre os tumores.

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Quimioterapia		
sim	21 (46,66)	16(35,55)
não	22 (48,88)	29(64,44)
	2(NEO)	
Esquema quimiot.		
CMF	11(24,44)	11(24,44)
outros	10(22,22)	5(11,1)
Tamoxifen	7(15,55)	Não avaliável

Neo: qumioterapia neoadjuvante.

6.7 VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS DO TUMOR PRIMÁRIO E DO TUMOR DA MAMA CONTRALATERAL

Grau nuclear mostra padrão semelhante entre tumores da mama 1 e da mama 2, assim como grau histológico (SBR), infiltrado linfocitário, necrose e número de mitoses. Desmoplasia mostra pequena diferença, com padrão leve encontrado em 5 (11,36%) casos da mama 2 e apenas 2 (4,4%) casos na mama 1, ao passo que o padrão acentuado foi mais comum na mama 1 com 8 (17,8%) casos e 4 (9,09%) casos na mama 2 (Tabela 6).

Tabela 6 - Distribuição das variáveis histopatológicas entre os tumores.

		MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Grau nuclear			
	I	2(4,44)	2(4,44)
	II	14(31,11)	21(46,66)
	III	29(64,44)	22(48,88)
Grau histologica (SBR)			
	I	6(13,33)	6(13,33)
	II	32(71,11)	30(66,66)
	III	7(15,55)	7(15,55)
Infiltrado			
	ausente	1(2,2)	4(8,8)
	leve	35(77,77)	33(68,88)
	moderado	6(13,33)	9(20,0)
	acentuado	2(4,44)	1(2,2)
Necrose			
	presente	10(22,22)	15(33,33)
	ausente	35(77,77)	30(66.66)
Mitose			
	<10	33(73,33)	33(73,33)
	11–20	7(15,55)	5(11,11)
	>21	5(11,11)	7(15,55)
Desmoplasia			
	leve	2(4.44)	5(11,36)
	moderada	35(77.77)	35(79,54)
	acentuada	8(17.8)	4(8,88)

Vinte e seis tumores da mama 1 e da mama 2 apresentaram grau histológico de diferenciação grau II com concordância de 57,7%. No entanto, no grau nuclear houve concordância de 35,50% no grau III e 24,44% entre grau III da mama 1 e grau II da mama 2 (Tabela 7).

Tabela 7 - Estudo de concordância do grau histológico e nuclear entre os tumores.

		MAMA 1	
		GRAU HISTO	
MAMA 2	**SRB I (%)**	**SBR II (%)**	**SBR III (%)**
GRAU HISTO.			
SBR I	1(2,22)	3(6,66)	3(6,66)
SBR II	3(6,66)	26(57,77)	1(2,22)
SBR III	2(4,44)	3(6,66)	3(6,66)
		GRAU NUCL.	
GRAU NUCL.	**GN I (%)**	**GN II (%)**	**GN III (%)**
GN I	0	0	2(4,44)
GN II	2(4,44)	8(17,78)	11(24,44)
GN III	0	6(13,3)	16(35,5)

A maioria dos tumores mostrou padrão leve de infiltrado linfocitário na mama 1 e na mama 2, com nível de concordância de 60,0%; necrose tumoral apareceu nas duas mamas em 25 casos, com concordância de 55,55% (Tabela 8).

Tabela 8 - Estudo de concordância dos infiltrado e da necrose entre os tumores.

	MAMA 1		
MAMA 2	**INFILTRADO**		
INFILTRADO	**Leve (%)**	**Mod (%)**	**Acent (%)**
Lev	30(66,66)	4(6,66)	1(2,22)
Mod	6(13,33)	2(4,44)	1(2,22)
Acent	1(2,22)	0	0
		NECROSE	
NECROSE	**Pres (%)**	**Auset (%)**	
Pres	25(55,55)	5(11,11)	
Auset	10(22,22)	5(11,11)	

A maioria dos tumores apresentava índice mitótico baixo, com 25 casos com índice menor que 10, ou seja, 55,55% de concordância entre os tumores. Em relação à desmoplasia, o índice de concordância foi de 63,63% no padrão moderado, que corresponde a 28 casos (Tabela 9).

Tabela 9 - Estudo de concordância da desmoplasia e da mitose entre os tumores.

	MAMA 1		
MAMA 2	**DESMOPLASIA**		
DESMOPLASIA	**Lev (%)**	**Mod (%)**	**Acent (%)**
Lev	1(2,27)	4(8,88)	0
Mod	1(2,27)	28(62,22)	6(13,33)
Acent	0	2(4,44)	2(4,44)
		INDICE MITÓTICO	
INDICE MITÓTICO	I(<10)	II(11 –20)	III (>21)
I(<10)	25(55,55)	7(15,55)	1(2,27)
II(11-20)	5(11,11)	0	0
III(>21)	3(6,66)	0	4(8,88)

6.8 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS

6.8.1 Receptor de Estrógeno e de Progesterona

A maioria dos tumores nos dois grupos tinha receptor de estrógeno positivo. Na mama 1, 34 casos (75,5%) e na mama 2, 37 casos (82,2%). Em relação ao receptor de progesterona, na mama 1, 30 casos (66,66%) e na mama 2, 29 (64,44%) tinham receptor positivo. Quatro casos da mama 1 e 3 da mama 2 não foram avaliados por falta de tumor viável para análise (Tabela 10).

Tabela 10 - Distribuição dos receptores de estrógeno e de progesterona entre os tumores.

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
RECEPTOR ESTRÓGENO		
POS	34(77,77)	37(82,2)
NEG	8(17,77)	7(15,5)
NÃO AVALIADO	3(6,66)	1(2,22)
RECEPTOR PROGESTERONA		
POS	30(66,66)	29(64,44)
NEG	11(24,44)	13(28,88)
NÃO AVALIADO	4(8,88)	3(6,66)

Trinta casos da mama 1 e da mama 2 tinham receptor de estrógeno positivo, com concordância de 66,6%, ao contrário do receptor negativo, com apenas 1 (2,2%) caso com concordância. Em relação ao receptor de progesterona positivo, a concordância foi menor, em torno de 55,5%, que representa 25 casos (Tabela 11).

Tabela 11 - Estudo de concordância dos receptores entre os tumores.

		MAMA 1	
	MAMA 2	**RE**	
RE		POS (%)	NEG (%)
	POS	30(66,6)	6(13,3)
	NEG	4(8,8)	1(2,2)
		RPg	
RPg		POS (%)	NEG (%)
	POS	25(55,5)	1(2,2)
	NEG	5(11,1)	0

6.8.2 Expressão de c-erbB2 (Her-2), de p53, de Ki-67, de CK- 4 e de CK-14

Expressão de Her-2 foi negativa em 32 (71,1%) casos na mama 1 e em 37 (82,2%) da mama 2, mostrando que a minoria apresentava Her-2 mutado. Em relação ao índice de proliferação tumoral medido pelo Ki-67, 41 (91,1%) casos em ambas as mamas 1 e 2 apresentavam baixo índice. Não foram avaliados 3 casos na mama 1 e 1 na mama 2 por falta de tumor viável. p53 foi positivo em 35 (77,77%) casos da mama 1 e 36 (80,0%) da mama 2 (Tabela 12).

Tabela 12 - Distribuição do Her-2, de Ki-67 e de p53 entre os tumores.

		MAMA 1 (%)	**MAMA2 (%)**
Her2			
	0/+/++	32(78,04)	37(90,00)
	+++	8(19,51)	8(19,51)
	não avaliado	4(8,8)	0
Ki67			
	Baixo	41(91,11)	41(91,1)
	Alto	1(2,2)	3(6,0)
	não avaliado	3(6,66)	1(2,22)
p 53			
	POS	36(80,0)	35(77,77)
	NEG	10(22,22)	9(20,0)

Não havia Her-2 mutado nos dois grupos em 27 casos, com concordância de 60%, e em 11 (24,4%) casos não houve concordância entre os tumores. Ki-67 mostrou concordância de 84,4% entre os tumores. Em 38 casos, ele apresentou baixo índice proliferativo na mama 1 e na mama 2 (Tabela 13).

Tabela 13 - Estudo de concordância do Her-2 e do Ki-67 entre os tumores.

		MAMA 1	
MAMA 2		**Her** 2	
Her2		O/+/++	+++
	0/+/++	27(60,0)	6(13,3)
	+++	5(11,1)	2(4,4)
		Ki-67	
Ki67		Baixo	Alto
	Baixo	38(82,60)	2(4,4)
	Alto	2(4,4)	1(2,2)

Em relação aos marcadores das células basais, que são os principais marcadores para tumores basal-like, a expressão foi baixa em ambos os grupos (Tabela 14).

Tabela 14 - Distribuição das citoceratinas 4 e 14 e do p53 entre os tumores.

		MAMA 1 (%)	**MAMA 2 (%)**
Ck4	NEG	43(95,55)	45(100)
	POS	2(4,0)	0
Ck 14	NEG	41(93,33)	42(95,55)
	POS	3(6,0)	3(6,0)
p53	POS	23(82.14)	23(82,14)
	NEG	5(17,85)	5(17,85)

Em relação ao CK-14, 40 casos mostraram ausência de expressão na mama 1 e na mama 2, com concordância de 88,8%. p53 apresentou positividade em 30 casos na mama 1 e na mama 2, com concordância de 66,6% (Tabela 15).

Tabela 15 - Estudo de concordância do CK-14 e do p53 entre os tumores.

		MAMA 1	
	MAMA 2	**Ck14**	
Ck14		POS (%)	NEG (%)
	POS	1(2,2)	2(4,4)
	NEG	2(4,4)	40(88,8)
		p53	
		POS (%)	NEG (%)
p53			
	POS	30(66,6)	5(11,1)
	NEG	1(2,2)	4(8,8)

6.8.3 Expressão das Moléculas de Adesão e da β–Catenina

A grande maioria dos tumores na mama 1 e mama 2 expressou ecad e β-catenina ecad foi positiva em 38 (84,4%) casos da mama 1 e em 40 (88,8%) da mama 2. Igualmente, β-catenina mostrou expressão (membrana) em 40 (88,8%) casos em ambos os grupos.

Claudinas apresentaram expressões diversas. Claudina-4 apresentou expressão positiva forte na mama 1 em 35 (77,77%) casos e na mama 2 em 40 (88,88%). A expressão da claudina-7 foi menos intensa, com positividade fraca na mama 1 em 39 (86,66%) casos e 40 (88,88%) na mama 2 (Tabela 16).

Tabela 16 - Distribuição das moléculas de adesão entre os tumores.

		MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Claudina 4			
	POS forte	35(77,77)	40(88,88)
	NEG	5(8,8)	3(6,0)
	não avaliado	5(11,11)	2(4,44)
Claudina 7			
	POS fraco	39(86,66)	43(95,55)
	NEG	6(13,33)	2(4,0)
ecad			
	POS	38(84,44)	40(88,8)
	NEG	0	2(4,0)
	não avaliado	9(2,0)	3(6,6)
β-catenina			
	Membrana	40(88,88)	40(88,88)
	NEG	2(4,0)	1(4,0)
	não avaliado	2(4,44)	3(6,6)

Apesar de a positividade da claudina-7 ser fraca, em 37 casos ela estava expressa na mama 1 e na mama 2, com concordância de 82,22%; claudina-4 mostrou concordância de 83,78% (Tabela 17).

Tabela 17 - Estudo de concordância das claudinas 4 e 7 entre os tumores

		MAMA 1	
MAMA 2		Cld 4	
Cld 4		POS (%)	NEG (%)
	POS	31(83.78)	3(8.10)
	NEG	3(8.10)	0 (00.0)
		Cld 7	
Cld 7		POS (%)	NEG (%)
	POS	37(82.22)	6(13.33)
	NEG	2(4.44)	0(00.0)

Em relação à ecad, 34 (80,90%) casos mostraram positividade na mama 1 e na mama 2, assim como a β-catenina mostrou correlação importante entre a mama 1 e a mama 2 de 89,74% (Tabela 18).

Tabela 18 - Estudo de concordância da ecad e da ß-catenina entre os tumores.

		MAMA 1	
MAMA 2		**ecad**	
ecad		POS (%)	NEG (%)
	POS	34(80,90)	6(14,28)
	NEG	1(2,38)	1(2,38)
		β-CATENINA	
β-CATENINA		POS (%)	NEG (%)
	POS	35(89,74)	2(5,12)
	NEG	2(5,12)	0

6.8.4 Perfil Fenotípico do Tumor Primário e do Tumor da Mama Contralateral

O perfil molecular reflete em parte a expressão do receptor de estrógeno. Na mama 1, encontramos 26 casos luminal A e 8 casos luminal B e na mama 2 28 casos luminal A e 8 casos luminal B. O perfil fenotípico, que não está relacionado com a expressão de estrógeno na mama 1 e na mama 2, encontramos 8 casos e 5 casos, respectivamente. A distribuição do perfil é bastante semelhante entre os tumores (Tabela 19).

Tabela 19 - Distribuição do perfil fenotípico entre os tumores.

PERFIL FENOTIPICO	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
LUMINAL A	26(61,90)	28(62,22)
LUMINAL B	8(19,04)	9(20,45)
HER –2	3(7,14)	1(2,2)
TRIPLO NEGATIVO	3(7,14)	3(7,14)
BASAL-LIKE	2(4,76)	3(7,14)
Não AVALIADO	3(6,66)	1(2,22)

Na mama 1 e na mama 2, 20 casos expressaram perfil luminal A com concordância de 44,4%. Em relação aos outros perfis, a distribuição foi bastante heterogênea (Tabela 20).

Tabela 20 - Estudo de concordância do perfil molecular entre os tumores.

	MAMA1				
MAMA 2	**Luminal A (%)**	**Luminal B (%)**	**Her2 (%)**	**Triplo Negativo (%)**	**Basal-like (%)**
Luminal A	20(44,4)	3(6,6)	2(4,4)	2(4,4)	1(2,2)
Luminal B	3(6,6)	4(8,8)	1(2,2)	0	0
Her2	1(2,2)	0	0	0	0
TriploNegativo	1(2,2)	1 (2,2)	0	1 (2,2)	0
Basal-like	1(2,2)	0	0	0	0

6.8.5 Distribuição das Moléculas de Adesão em Relação ao Perfil Fenotípico do Tumor Primário e da Mama Contralateral

A maioria das moléculas de adesão estava expressa nos tumores luminal A e B nos dois grupos. Os tumores que não expressavam as moléculas de adesão também estavam expressos no perfil luminal A e B nos dois grupos (Tabelas 21 e 22).

Tabela 21 - Estudo de concordância das moléculas de adesão e perfil molecular da mama 1.

	PERFIL FENOTIPICO DA MAMA 1				
MOLECULAS ADESÃO	**Luminal A (%)**	**Luminal B (%)**	**Her2 (%)**	**Triplo negat (%)**	**Basal-like (%)**
E-CADHERINA					
POS	25(55,5)	8(17,7)	0	3(6,6)	2(4,4)
NEG	0	0	0	0	0
β-CATENINA					
membrana	24(53,3)	8(17,7)	3(6,6)	3(6,6)	2(4,4)
NEG	2(4,4)	0	0	0	0
CLAUDINA 4#					
POS forte	22(48,8)	8(17,7)	0	3(6,6)	2(4,4)
NEG	4(8,8)	0	0	0	0
CLAUDINA 7					
POS fraco	26(57,7)	7(15,5)	3(6,6)	1(2,2)	2(4,4)
NEG	0	1(2.2)	0	2(4,4)	0

não corresponde ao total.

Tabela 22 - Estudo de concordância entre as moléculas de adesão e perfil molecular da mama 2.

	PERFIL FENOTIPICO MAMA 2				
MOLECULAS ADESÃO	**Luminal A (%)**	**Luminal B (%)**	**Her2 (%)**	**Triplo negativo (%)**	**Basal-like (%)**
E-CADERINA					
POS	25(57,14)	9(21,42)	0	3(7,11)	3(6,90)
NEG	2(4,71)	0	0	0	0
β-CATENINA					
Membrana	24(57,14)	9(21,44)	1(2,23)	3(7,11)	3(6,90)
NEG	2(4,71)	0	0	0	0
CLAUDINA 4#					
POS forte	25(58,13)	9(20,92)	0	3(6,90)	3(6,90)
NEG	3(6,90)	0	0	0	0
CLAUDINA 7					
POS fraco	27(61,36)	9(20,45)	1(2,23)	3(6,90)	3(6,90)
NEG	1(2,23)	0	0	0	0

não corresponde ao total.

6.8.6 Variáveis Histopatológicas e dos Marcadores nos Tumores Sincrônicos e Metacrônicos

De modo geral, aspectos histopatológicos e expressão dos marcadores seguem uma distribuição semelhante nos tumores sincrônicos (Tabela 23) e metacrônicos (Tabela 24), sem diferenças importantes quando comparados com a totalidade dos casos.

Tabela 23 - Distribuição das características histopatológicas e dos marcadores nos tumores metacrônicos (28 casos).

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Grau nuclear		
I	1(3.5)	2(7.14)
II	9(32.14)	11(39.28)
III	18(64.28)	15(53.57)
Grau histologico (SBR)		
I	3(10.71)	4(14.28)
II	21(75.0)	18(64.28)
III	4(14.28)	6(21.42)
Desmoplasia#		
Leve	2(7.14)	4(14.81)
Moderada	22(78.57)	20(71,42)
Acentuada	4(14.28)	3(11.11)
Infiltrado		
Leve	22(78.57)	18(64.28)
Moderado	3(10.71)	6(21.42)
Acentuado	2(7.14)	1(3.5)
Necrose		
Presente	8(28.57)	10(35.71)
Ausente	20(71.42)	18(64.28)
Mitose		
<10	20(71.42)	18(64.28)
11 – 20	4(14.28)	5(17.85)
>21	4(14.28)	5(17.85)
RE		
NEG	4(14.28)	4(14.28)
POS	24(85.71)	24(85.71)
RPg #		
NEG	7(25.0)	8(28.83)
POS		

Cont/ Tabela 23

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Her2 #		
0/+/++	21(75.0)	22(78.57)
+++	5(17.85)	6(21.42)
Ki67 #		
Baixo (<10)	28(100.0)	27(96.42)
Alto (>10)	0	0
Ck 4		
NEG	26(92.85)	28(100.0)
POS	2(7.14)	0
Ck 14		
NEG	26(92.1)	27(96.42)
POS	2(7.14)	1(3.5)
Claudina 4		
NEG	6(21.48)	3(10.71)
POS Forte	22(78.57)	24(85.71)
Claudina 7		
NEG	4(14.28)	1(3.5)
POS Fraco	24(85.71)	27(96.48)
ecad		
NEG	1(3.57)	2(7.4)
POS	24(85.71)	24(88.88)
β-catenina		
NEG	3(10.71)	2(7.14)
Membrana	25(89.28)	25(89.28)
p53		
NEG	5(17.85)	5(17.85)
POS	23(82.14)	23(82.14)

a soma nem sempre corresponde ao total, pois há casos não avaliados por falta de tumor.

Tabela 24 - Distribuição das características histopatológicas e dos marcadores nos tumores sincrônicos (17 casos).

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Grau nuclear		
I	1(5.80)	0
II	5(29.41)	10(58.82)
III	1164.70)	7(41.17)
Grau histologico (SBR)		
I	3(17.64)	3(17.64)
II	11(64.70)	12(70.58)
III	3(17.64)	2(11.76)
Desmoplasia#		
Leve	0	1(5.88)
Moderada	13(76.47)	14(82.35)
Acentuada	4(23.52\0	2(11.76)
Infiltrado #		
Leve	14(82.35)	14(82.35)
Moderado	3(17.64)	2(11.76)
Acentuado	0	0
Necrose		
Presente	2(11.76)	4(23.52)
Ausente	15(88.23)	13(76.47)
Mitose		
<10	11(78.57)	13(92.85)
11–20	2(11.76)	0
>21	1(5.80)	1(5,80)
Re		
NEG	4(23.52)	4(23.52)
POS	12(70.58)	13(76.47)
RPg		
NEG	4(23.52)	6(35.29)
POS	11(64.70)	10(58.82)
Her2 #		
0/+/++	12(70.58)	14(82.35)
+++	3(17.64)	2(11.76)
Ki67		
Baixo (<10)	14(82.35)	13(67.47)
Alto (>10)	0	3(17.64)
Ck 4		
NEG	17(100)	17(100)
POS	0	0
Ck 15		
NEG	16(94.11)	15(88.23)
POS	1(5.88)	2(11.76)

Cont/ Tabela 24

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
Claudina 4		
NEG	2(11.76)	0
POS Forte	15(88.23)	16(94,11)
Claudina 7		
NEG	2(11,76)	1(5,88)
POS Fraco	15(88,23)	16(94,11)
ecad		
NEG	0	1(5.88)
POS	14(82,35)	16(94.11)
β-catenina		
NEG	0	1(5.88)
Membrana	15(88,23)	15(88.23)
p53		
NEG	5(29.41)	5(29.41)
POS	12(70.58)	12(70.58)

a soma nem sempre corresponde ao total, pois há casos não avaliados por falta de tumor.

6.9 ESTUDO ESTATÍSTICO DAS VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS, DOS FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS E DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO

Testes estatísticos realizados não mostraram diferenças estatísticas significativas entre os tumores para nenhuma das variáveis estudadas. Especificamente as moléculas de adesão não apresentaram nenhuma diferença entre os tumores (Quadro 6).

Quadro 6 - Teste McNemar das variáveis estudadas.

Variáveis	***p***
Grau nuclear	0.31
Grau histológico	0.75
Infiltração	0.45
Desmoplasia	0.28
Necrose	0.42
Índice mitótico	0.73
Linfonodo	0.46
Receptor estrógeno	0.75
Receptor progesterona	0.99
KI6	0.52
Her2	0.59
P53	0.26
CK 4	0.48
Perfil molecular	0.34
Claudina 4	0.61
Claudina 7	0.29
ecad	0.48
β-catenina	0.48

Teste McNemar. Nível significância $p <. 0.05$

DISCUSSÃO

7 DISCUSSÃO

7.1 VARIÁVEIS CLÍNICAS

A média de idade ao diagnóstico foi de 52,4 anos e o intervalo entre os tumores, considerando apenas os metacrônicos (66 meses), são bastante compatíveis com a literatura. Fischer refere que a maioria dos tumores na mama oposta desenvolve no período de cinco anos após o primeiro tumor (Fisher et al., 1984).

Tamanho do tumor mostra predominância de tumores grandes e avançados na mama 1 e estadiamento clínico mostra que a metade é de casos localmente avançados. Quase metade das pacientes era portadora de linfonodos comprometidos, o que é bastante compatível, considerando a população e a época em que foram tratadas. No Brasil, a maioria dos tumores ainda é diagnosticada em fases mais avançadas. Tamanho do tumor (T1/T2 85%) e estadiamento clínico (ECI/II 83%) na mama 2 mostram que foram diagnosticados em fase mais precoce, que se reflete na quantidade de pacientes com linfonodos livre de metástases, provavelmente por causa do acompanhamento mais intensivo no seguimento dessas pacientes. Para a maioria, a conduta cirúrgica na mama 1 foi mastectomia, que era padrão na época, compatível com estadiamento clínico e conceitos Halstedianos que predominavam entre os cirurgiões. Na mama 1, a maioria foi submetida a radioterapia, ao passo que na mama 2, 14 (11,38%) das pacientes não foram submetidas, provavelmente pelo fato de ter sido realizada mastectomia em tumores <5 cm e com linfonodos não comprometidos em 28 (62,22%) casos. A maioria recebeu dose de radioterapia necessária ao tratamento. De alguma maneira, quimioterapia reflete as indicações para seu uso na época. De modo geral, na mama 1 o número de indicação para

quimioterapia acompanha os casos com linfonodos comprometidos, ao passo que na mama 2 apenas 16 (13,67%) pacientes receberam quimioterapia.

7.2 VARIÁVEIS HISTOPATOLÓGICAS

Observamos prodominio de grau histológico II e III e nuclear II na mama 1 e na mama 2 provavelmente como reflexo do nível de evolução dos tumores quando do diagnóstico. A maioria era representada por tumores maiores que 5 cm (Tabela 1).

Na maioria dos tumores o infiltrado apresentava aspecto leve bilateralemte. Quase a metade dos tumores tinha linfonodos negativos nas duas mamas, apesar de a maioria ser representado por tumores T2, 3 e 4. A necrose na grande maioria estava ausente bilateralmente, o que é compatível com o índice mitótico menor que 10 nas duas mamas (Tabela 6). A desmoplasia apresentou em grau moderado na maioria dos tumores bilateralmente (Tabela 6).

Quando se avalia os tumores em relação à sincrônicos e metacronicos, não se observa muitas diferenças entre os tumores (Tabelas 23 e 24).

7.3 RECEPTORES DE ESTRÓGENO E DE PROGESTERONA, HER-2, Ki-67 E CITOCERATINAS-4 e 14

Expressão de receptores de estrógeno e de progesterona mostra que esses tumores têm perfil menos agressivo, compatível com grau histológico (SBR II) que predomina bilateralmente, assim como índice mitótico e necrose. A porcentagem de mutação de *HER2* é compatível com a literatura, que mostra mutações em torno de 20% (Slamon et al., 1989). Ki-67 foi compatível com receptor de estrógeno positivo e provavelmente reflete o índice mitótico.

Expressão de receptor de estrógeno e de progesterona e Her-2 mutado mostram boa correlação sem diferença significativa: (*p*: 0,75*) (p*: 0,99) (*p*: 0,59), respectivamente.

7.4 PERFIL MOLECULAR

O perfil molecular mostra que a maioria dos tumores apresentam características de tumores que expressão receptor de estrógeno, ou seja são tumores do tipo luminal A e B nas duas mamas e aqueles que não expressão receptor estrógeno com menor frequência (Tabela 19). No nosso material a frequencia do tipo luminal A foi em torno de 62% e o tipo basal foi de 7% nas duas mamas. A literatura registra que o tipo luminal A e o tipo mais freqüente que representa em torno de 45%. Estes tumores são geralmente são de baixo grau, tumores diferenciados e expressam receptor de estrógeno. Ao passo que o tipo basal representa em torno de 15% e são alto de grau, não expressam receptor de estrógeno e estão associados com um prognóstico pior (Bertucci et al., 2009). A distribuição do perfil fenotipico assim como as outras variáveis, mostrou grande semelhança nas duas mamas. A distribuição fenotipica mostra que a maioria dos tumores expressa perfil luminal A e B que são tumores de bom prognóstico. Neste estudo não foi feito analise de sobrevida pela falta seguimento necessário para a sua avaliação.

Apesar da alta frequência de expressão do receptor de estrógeno bilateralmente, o fenótipo luminal A e B apresenta pequena concordância entre as mamas. Com exceção do luminal A que mostra uma correspondência de 44,4% entre os tumores, o restante não mostra uma correspondência importante.

7.5 EXPRESSÃO DAS MOLÉCULAS DE ADESÃO

A expressão das moléculas adesão e da β-catenina foi mais freqüente no tipo luminal A e B nas duas mamas. Estes subtipos são os que expressam receptor de estrógeno e apresentam melhor prognóstico quando comparada com os outros três tipos que são considerados receptores negativos. Esses achados são compatíveis, pois se considerarmos que as moléculas de adesão estão relacionadas com o processo de invasibilidade e metástase a sua expressão nos tipos de melhor prognóstico indicam que estes tumores apresentem uma melhor evolução.

A expressao do cld7 (positivo fraco) foi compatível com estudos anteriores, assim como a expressão da cld4, que mostrou expressão em 80% (Soini, 2005). A expressão nos tumores sincrônicos e metacrônicos não apresentam diferenças importantes, apesar do intervalo temporal nos casos metacrônicos (Tabela 23). Não foi encontrado artigos na literatura relatando expressão de claudinas em câncer de mama bilateral.

Positividade da ecad foi bastante expressiva no nosso material. Na literatura ela registra diminuição ou ausência em 45%-63%, porém alguns registram positividade em até 70% (Mahler-Araujo et al., 2008). Um dos poucos artigos encontrado na literatura registra 80% de expressão da ecad e 87% de β-catenina no câncer de mama bilateral (Bassarova et al., 2005b).

Do mesmo modo foi a expressão da β–catenina, que mostrou compatibilidade com a literatura (Gillett et al., 2001; Chung et al., 2004).

A expressão das moléculas de adesão e da β-catenia não mostrou diferenças importantes apesar do intervalo entre os tumores (Tabela 24). Segundo alguns autores os tumores sincrônicos apresentariam semelhanças maiores em relação aos metacronicos (Kollias et al., 2004).

A analise estatística mostrou que não há diferença entre os tumores baseados nas variáveis histopatologicas; marcadores e moléculas de adesão estudadas.

7.6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Câncer de mama bilateral oferece a oportunidade de discussão de temas relacionados à carcinogênese, à clonalidade, à hereditariedade e à terapêutica. Desses temas, a discussão a respeito da clonalidade tem grande importância e aparece na literatura frequentemente. Alguns autores sustentam que o tumor na mama contralateral seria metastático, mas a maioria alega que são primários, com base em estudos histopatológicos, marcadores e análise de biologia molecular. Contudo, não existe método que diagnostique com certeza se o tumor na mama contralateral é primário ou secundário. Não existe fator de risco que identifique com certeza qual a paciente desenvolverá câncer na mama contralateral, apesar dos fatores de risco conhecidos.

No nosso material, o receptor de estrógeno e de progesterona do tumor da mama 1 apresentou grande concordância com o tumor da mama 2, sem diferença significativa entre os tumores, de modo que a expressão do receptor de estrógeno e de progesterona da mama 1 e preditivo da mama 2. A literatura registra que essa semelhança seria pelo fato de os tumores terem se desenvolvido no meio ambiente e hormonal semelhante. Alguns referem que os tumores denominados metacrônicos são biologicamente sincrônicos, pois se considerarmos que a maioria dos tumores é diagnosticada num intervalo de cinco anos e se tomarmos o tempo de duplicação tumoral como 60 dias, esses tumores já estavam presente no momento do diagnóstico do tumor inicial. Esses dados sugerem que se originaram do mesmo clone celular. As moléculas de adesão estavam expressas predominantemente no perfil fenotípico

luminal A e B, que sabidamente apresenta melhor prognóstico em relação aos outros três perfis. Essa expressão das moléculas é compatível com esse perfil, pois sua ausência está relacionada à perda de adesividade celular, à maior capacidade de migração e à metástase. Perda da adesividade celular é uma característica importante dentre as alterações que a célula sofre quando da transformação neoplásica maligna e a ecad tem papel importante dentro da adesão celular. Perda de expressão da ecad está relacionada à transformação carcinomatosa e ao desenvolvimento de metástases. Estudos mostram que a perda de expressão das ecad e das claudinas está relacionada à maior probabilidade de comprometimento linfonodal, à metástase hepática e ao risco de morte.

Nosso estudo não mostra evidências de que as moléculas de adesão e a β-catenina tenham algum papel no desenvolvimento do câncer de mama bilateral, pois sua expressão estava preservada bilateralmente e em nível semelhante. Essa semelhança é valida para tumores sincrônicos e metacrônicos. Assim, não e possível afirmar se o tumor contralateral é primário ou secundário baseado no estudo dessas moléculas.

Na ausência de diferença significativa entre os tumores com base nos aspectos histopatológicos, na expressão de receptores e nos marcadores, a probabilidade de que os tumores são semelhantes não pode ser afastada.

CONCLUSÕES

8 CONCLUSÕES

Os presentes resultados permitem concluir que em relação aos carcinomas de mama bilaterais não houve diferenças significativas nos parâmetros estudados, a saber:

Grau Histológico	Receptor de Estrógeno	E-cadherina
Grau Nuclear	Receptor de Progesterona	claudina 4
Infiltrado	Ki – 67	claudina 7
Necrose	p53	β-catenina
Demoplasia	Her2	
Índice Mitótico	CK-4 e 14	

ANEXOS

9 ANEXOS

Anexo 1 - Quadro geral de pacientes.

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
IDADE	Mediana: 52,0a	Mediana: 55,0a
ANTECEDENTE FAMILIAR (1Grau)	3(6,6)	
TUMOR		
T1	11(24,4)	16(35,55)
T2	11(24,4)	23(51,11)
T3	7(15,55)	1(2,0)
T4	14(31,11)	5(4,06)
	1(não avaliavel)	
ESTADIAMENTO CLINICO		
EC I	12(26,66)	13(10,56)
EC II	11(24,44)	25(42,2)
EC III A/B	22(48,88)	7(15,55)
	1(não avaliável)	
CIRURGIA		
MASTECTOMIA	36(82,20)	35(77,77)
RESSECCAO SEGMENTAR	8(17,77)	8(17,77)
NÃO OPEROU		1
RADIOTERAPIA		
PRE-OP	8(17,77)	2(1,62)
POS-OP	29(64,44)	27(60,0)
NÃO	8(6,5)	14(11,38)
QUIMIOTERAPIA		
SIM	8(6,5)	8(17,77)
NÃO	35(77,7)	37(82,22)
	2(NEO)	
GRAU NUCLEAR		
I	2(1,6)	3(6,66)
II	14(31,11)	18(40,0)
III	29(64,44)	25(55,55)
GRAU HISTOLOGICO (SBR)		
I	7(15,55)	8(17,77)
II	32(71,11)	30(66,66)
III	7(15,55)	7(15,55)
STATUS LINFONODAL		
pN - 0	24(53.33)	27(60,0)
pN + 1 –3	8(17,77)	8(17,77)
4 – 9	8(17,77)	5(11,11)
> 10	5(11,11)	3(6,62)
TAMOXIFEN (SIM)	7(15,55)	SEM INFORME

Cont/ Anexo 1

	MAMA 1 (%)	MAMA 2 (%)
RECEPTOR ESTROGENO		
POSIT	34(75,55)	37(82,21)
NEG	8(17,77)	7(15,53)
NÃO AVALIADO	3(6,66)	1(2,20)
RECEPTOR PROGESTERONA		
POSIT	30(66,66)	29(64.44)
NEG	11(24,44)	13(28,88)
NÃO AVALIADO	4(8,88)	3(6,66)
HER –2		
0/+/++	32(71,11)	37(82,20)
+++	8(17,77)	8(17,77)
NÃO AVALIADO	5(11,11)	
Ki67		
ALTO	41(91,11)	43(97,72)
BAIXO	3(6,66)	3(6,66)
NÃO AVALIADO	3(6,66)	1
PERFIL MOLECULAR		
LUMINAL A	26(57,77)	28(62,22)
LUMINAL B	8(17,77)	9(20,0)
HER	3(6,66)	1(2,2)
TRIPLO NEGATIVO	3(6,66)	2(4,44)
BASAl-LIKE	2(4,44)	3(6,66)
NAO AVALIADO	3(6,66)	1(2,2)
CK4		
NEG	43(95,55)	45(100)
POSIT	2(4,0)	0
CK 14		
NEG	42(93,33)	41(95,55)
POSIT	3(6,66)	3(6,66)
CLAUDINA 4		
POSIT FORTE	35(77,77)	40(88,88)
NEG	5(8,80)	3(6,66)
NÃO AVALIADO	5(11,11)	2(2,20)
CLAUDINA 7		
POSIT FRACO	39(86,66)	43(95,55)
NEG	6(13,33)	2(4,0)
E-CADERINA		
POSIT	38(84.44)	40(88,88)
NÃO AVALIADO	9(17,7)	3(6,66)
ß-CATENINA		
MEMBRANA	40(88,88)	40(88,88)
NEG	2(4,0)	2(4,0)
NÃO AVALIADO	3(6,66)	4(8,88)
P 53		
POSIT	36(80,00)	35(77,77)
NEG	10(22,22)	9(20,0)

Anexo 2 - Questionário.

TESE DE DOUTORADO. DISCIPLINA DE ONCOLOGIA DO DEPTO. DE IMAGENOLOGIA DA FMUSP.
ORIENTADOR: PROF. DR. FERNANDO A. SOARES.

ORIENTADO: HIROFUMI IYEYASU

1. RG: _____

2. IDADE:_____

3. STATUS MENOPAUSADA:_____

4. RAÇA: (1) BRANCO (2) Ñ BRANCO

5. TEMPO QUEIXA:_____ MESES

6. MENARCA (IDADE):_____

7. MENOPAUSA (IDADE):_____

8. PARIDADE: (0) Ñ (1) 1G (2) 2G (3) MULTI. ____

9. IDADE 1ª GRAVIDEZ:_____

10. HISTÓRIA FAMILIAR DE CA MAMA: (1) Ñ (2) S

11. TIPO HISTÓRIA: (1) MÃE (2) IRMÃ (3) FILHA (4) OUTROS.__

12. ANTICONCEP. _____(0) Ñ (1) S

13. ANOS USO (MESES):_____

14. INÍCIO TRAT (abertura prontuário):_____

EC TUMOR INICIAL

15. T1 MAMA INICIAL: (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (5) ____

16. QUADRANTE 1: (1) QSE. (2) QS (3) QIE (4) QII (5) QC (6) _

17. N1: (0) 0 (1) N1 (2) N2 (3)_____

18. EC 1: (1) I (2) IIA (3) IIB (4) IIIA (5) IIIB (6) _____

EC TUMOR CONTRALATERAL

19. T2 MAMA OPOSTA: (1) T1 (2) T2 (3) T3 (4) T4 (5) ____

20. QUADRANTE 2: (1) QSE. (2) QSE (3) QIE (4) QII (5) QC (6)

21. N2: (0) 0 (1) N1 (2) N2 (3)_____

22. EC 2: (1) I (2) IIA (3) IIB (4) IIIA (5) IIIB (6) _____

23. MAMA OPOSTA: (1) SINCRÔNICO (<12M) (2) METACRÔNICO

24. INTERVALO ENTRE T1 e T2 (MESES):_____

TRATAMENTO DO TUMOR INICIAL

24. RADIOTERAPIA: ___(1) PRÉ (2) PÓS OP_____

25. DATA RXT (início):_____

26. CAMPOS (1) PLASTRÃO (2) AXILA (3) FSC (4) MI (5) _____

27. DOSE RXT: _____cGy

28. MASTECTOMIA:__(1) RADICAL (2) MODIFICADO(3) MS+GI (4)___

29. DATA CIRURG._____

30. INTERVALO CIRÚRG – QTX (meses):_____

31. QTX:_____(1) Não (2) Sim

32. ESQUEMA QTX: (1) CMF (2) OUTROS_____

33. N° CICLOS:_____

34. INTERVALO QTX: (1) SEMANAL (2) MENSAL (3) OUTROS

35. DOSE TOTAL QTX :_____

TAMOXIFEN: (1) SIM (2) NÃO

TRATAMENTO DO TUMOR CONTRALATERAL.

36. RADIOTERAPIA: ___(1) PRÉ (2) PÓS OP_____

37. DATA RXT (início):_____

38. DOSE CAMPOS (1) PLASTRÃO (2) AXILA (3) FSC (4) MI (5) _____

39. RXT:_____

40. CAMPOS (1) PLASTRÃO (2) AXILA (3)FSC (4) MI (5) _____

41. MASTECTOMIA:__(1) RADICAL (2) MODIFICADO (3) MS+GI (4)___

42. DATA CIRURG._____

43. INTERVALO CIRÚRG – QTX (meses):_____

44. QTX:_____(1) Ñ (2) S

45. ESQUEMA QTX: (1) CMF (2) OUTROS_____

46. N0 CICLOS:_____

47. INTERVALO QTX:_____(1) SEMANAL (2) MENSAL (3) OUTRS

48. DOSE TOTAL QTX:_____

TAMOXIFEN:

ANATOMOPATOLÓGICO DO TUMOR INICIAL

49. NAP_____

50. TIPO HISTOLÓGICO:_(1) DUCTAL NOS (2) LOBULAR NOS (3) PAGET (4) OUTROS

51. RECEPTORES:___ RPg RE

52. LNODOS COMPROM. _____

53. NÍVEL COMPROM.___(1) I (2) II (3) III

54. INVASÃO: (1) LINF (2) VASC. (3) NEURAL (4) OUTROS (5) MUSC.

55. COMPONENTE INTRADUC:_____(0) Ñ (1) S

56. GRAU DE #:_____(1) I (2) II (3) III

ANATOMOPATOLÓGICO DO TUMOR CONTRALATERAL

57. N AP:_____

58. TIPO HISTOLÓGICO: (1) DUCTAL NOS (2) LOBULAR NOS (3) PAGET (4) OUTROS

59. RECEPTORES:___ RPg RE.

60. LNODOS COMPROM. _____

61. NÍVEL COMPROM.___(1) I (2) II (3) III

62. INVASÃO: (1) LINF (2) VASC. (3) NEURAL (4) OUTROS (5) MUSC

63. COMPONENTE INTRADUC:_____(0) Ñ (1) S

64. GRAU DE #:_____(1) I (2) II (3) III

EVOLUÇÃO

65. RECIDIVA LOCAL:____(1) PLTRÃO (2) PLTR CLT (3) AXLA1 (4) AXILA CLT (5) FSCI (6) FSCCLT (7) _____

66. DATA RECD. LOCAL:_____

67. TRAT. RECD. LOCAL: (1) CIRURG. (2) RXT (3) QTX (4) HORM (5) OUTROS__

68. METÁSTASES: __(1) OSSO (2) PULMÃO (3) FÍGADO (4) _____

69. DATA 1 META:_____

70. TRAT. META:__(1) QTX. (2) HORM. (3) RXT (4) _____

STATUS FINAL:___ (1) VIVO S/DÇA (2) VIVO C/DÇA (3) MOCA (4) MORTE ASSINTOMÁTICA (5) PERDIDO

Anexo 3 - Distribuição dos tumores no TMA

	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
	0	1.2	2.4	3.6	4.8	6.0	7.2	8.4	9.6	10.8	12.0	13.2	14.4	15.6
0	**Placenta**	88895	88902-A	94409	99415-A	100413	100832-A	101931 2/6	101932 3/6	101944	102294 A 2/3	103318 A 2/3	104323 A	105665
1.2	108412 D	108940	109278 E	109412	109428 A	116557 D 1/8	118051 A	120491	124918 2/3	125310	127088	127090 A 2/3	129402 1/3	129402 3/3
2.4	132304	133413	134838	134879 A	136450	140499 D	140499 E	141296	141423	143157 A	143157 F	144491 1/10	144491 5/10	144641 2/4
3.6	144840 3/10	145107 C	145107 D	146215 E	146215 F	147506 A	147523 E	150106 B	150252 C	153712 1/3	153712 3/3	154423 2/4	154423 4/4	155297 B
4.8	156160 C	156160 E	158533 D	164423 2/3	164891 A	165306	165331 C	166330 B	166475 1/3	167622 A	169592 A	171276	171531 C	174716
6.0	179872	180851	180885 J	183088	183090 J	189435 J	190689	193264	193264	193948 A 1/3	193948 B 2/3	194125 C	197170	197346 2
7.2	199938 C	199938 E	200997	200998 1/3	201173 C	201469 1/3	201470 2/3	201925 E	203478	204233 A	204233 D-1	204233 D-2	204340 C	205499 D
8.4	206126	206408 1/4	207460 F	208584 1/3	210407	213314 A	217833 J 3/3	218928	219847	219938 C	220795 A	224759	225531	227965
9.6	228799 A	228799 F	229378 D	234445	234490 A	243466 D	243466 E	243476 D	244473 A	244703	246714 2/4	246714 J 3/4	246719 A	250947 A
10.8	255045 A	255045 C	258402 C	258598	258644 D	261540	262931	263590	27012	277878	278371	280820 A	280972	282311
12.0	287541 D	288953	295209	297289 A	299204 A	300323 F1	300323 K1	300579	300715	301818 C	301931 1/7	301931 5/7	302277	303091
13.2	306579 C	306744	307021 C	309936 C	309936 E	311055 F	311055 L	313370	313791 K 4/4	318112 A1	318112 D1	323635 A	327650 B	329394 A 2/10
14.4	330802	331973	333086 A	333086 B	333683	334344 B	334357 B	334844 A	B97-5915 B	B97-7284 A	B98-314 A	B98-7382 H	B99-5039 A	BA1-442 A
15.6	BA1-7060 B	BA1-8066 A	BA2-3951 K	BA2-3951 L	BA4-6027 5/5	BA4-7128 A1 1/3	BA4-10846	BA4-12149 A1	BA5-7211 A1	A-722975 D4				

Título – Mama 13

TMA Dr. Hirofumi

Anexo 4 - Tecnica de Imunoistoquimica.

Segue a descrição do protocolo utilizado:

1 Desparafinização das lâminas do material incluído na parafina e colocadas em lâaminas e deixadas em estufa por 24 horas;

2 Xilol a 60^0C por 20 minutos e na temperatura ambiente por 20 minutos;

3 Três passagens em etanol (100%, 95% e 70%);

4 Lavagem da lâmina em água corrente e e em água destilada;

5 Recuperação antigênica por calor (panela de pressão – Eterna®) em tampão citrato por cinco minutos para obter maior expressão antigênica;

6 Bloqueio da peroxidase endógena com H_2O_2 a 3% (água oxigenada 10 volumes) para inibir a enzima natural tecidual para não alterar a reação antígeno-anticorpo;

7 Lavagem das lâminas em água corrente e em água destilada;

8 Incubação com anticorpo primário, diluído em título preestabelecido, conforme Quadro 5 em tampão PBS a 1% (SIGMA) e azida sódica 1% (NaN_3) 0,1% a 4^0C em câmara úmida por 18 horas;

9 Lavagem em tampão PBS;

10 Sistema de amplificação: incubação por 30 minutos com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer – Reino Unido);

11 Lavagem com tampão PBS;

12 Incubação com NovoLink Max Polymer por 30 minutos a 37^0C;

13 Revelação com cromógeno: incubação das lâminas em solução substrato 3,3 diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) 100 mg% (SIGMA)

dimetilsulfóxido (DMSO) 1 ml, H_2O_2 a 6% (água oxigenada 20 volumes) 1 ml e PBS 100 ml (cinco minutos ao abrigo da luz);

14 Lavagem em água corrente e em água destilada;

15 Contracoloração com hematoxilina de Harris;

16 Imersão em água amoniacal (solução de hidróxido de amônio a 0,5%), lavando-se em seguida com água corrente e com água destilada;

17 Desidratação das lâminas em etanol (passando a 80%, 95% e 100%) e em xilol quatro vezes;

18 Montagem das lâminas em Entellan neu.

REFERÊNCIAS

10 REFERÊNCIAS

Abdalla I, Thisted RA, Heimann R. The impact of the contralateral breast on the outcome of breast cancer patients treated by mastectomy. *Cancer J.* 2000; 6:266-72.

Abrams HL, Spiro R, Goldstein N. Metastases in carcinoma; analysis of 1000 autopsied cases. *Cancer*. 1950; 3:74-85.

Ackerman J, Baunoch DA, Gimotty P, George J, Lane MA, Dawson PJ. The role of p53 mutations in bilateral breast carcinoma. *Mod Pathol.* 1995; 8:244-8.

Adami HO, Bergström R, Hansen J. Age at first primary as a determinant of the incidence of bilateral breast cancer. Cumulative and relative risks in a population-based case-control study. *Cancer*. 1985; 55:643-7.

Agelopoulos K, Tidow N, Korsching E, Voss R, Hinrichs B, Brandt B, Boecker W, Buerger H. Molecular cytogenetic investigations of synchronous bilateral breast cancer. *J Clin Pathol.* 2003; 56:660-5.

Akkiprik M, Sonmez O, Gulluoglu BM, Caglar HB, Kaya H, Demirkalem P, Abacioglu U, Sengoz M, Sav A, Ozer A. Analysis of p53 gene polymorphisms and protein over-expression in patients with breast cancer. *Pathol Oncol Res*. 2009; 15:359-68.

Akçay MN. Metastatic disease in the breast. *Breast.* 2002; 11:526-8.

Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson DJ. *Molecular biology of the cell.* 2 ed. New York: Garland Pu; 1998. Cell junctions, cell adhesion, and the extra cellular matrix ; p.963-70.

Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol.* 1998; 11:155-68.

Arpino G, Weiss HL, Clark GM, Hilsenbeck SG, Osborne CK. Hormone receptor status of a contralateral breast cancer is independent of the receptor status of the first primary in patients not receiving adjuvant tamoxifen. *J Clin Oncol*. 2005; 23:4687-94.

Asgeirsson KS, Jónasson JG, Tryggvadóttir L, Olafsdóttir K, Sigurgeirsdóttir JR, Ingvarsson S, Ogmundsdóttir HM. Altered expression of E-cadherin in breast cancer. Patterns, mechanisms and clinical significance. *Eur J Cancer*. 2000; 36:1098-106.

Bachleitner-Hofmann T, Pichler-Gebhard B, Rudas M, Gnant M, Taucher S,Kandioler D, Janschek E, Dubsky P, Roka S, Sporn E, Jakesz R. Pattern of hormone receptor status of secondary contralateral breast cancers in patients receivingadjuvant tamoxifen. *Clin Cancer Res.* 2002; 8:3427-32.

Banelli B, Casciano I, Di Vinci A, Gatteschi B, Levaggi A, Carli F, Bighin C, Salvi S, Allemanni G, Ghiorzo P, Pronzato P, Venturini M, Romani M, Del Mastro L. Pathological and molecular characteristics distinguishing contralateral metastatic from new primary breast cancer. *Ann Oncol*. 2010; 21:1237-42.

Barth AI, Näthke IS, Nelson WJ. Cadherins, catenins and APC protein: interplay between cytoskeletal complexes and signaling pathways. *Curr Opin Cell Biol.* 1997; 9:683-90.

Bassarova AV, Nesland JM, Sedloev T, Lilleby W, Hristova SL, Trifonov DY, Torlakovic E. Simultaneous bilateral breast carcinomas: a category with frequent coexpression of HER-2 and ER-alpha, high Ki-67 and bcl-2, and low p53. *Int J SurgPathol*. 2005a; 13:239-46.

Bassarova AV, Torlakovic E, Sedloev T, Hristova SL, Trifonov DV, Nesland JM.Simultaneous bilateral breast carcinoma: histopathological characteristics and CD44/catenin-cadherin profile. *Histol Histopathol*. 2005b; 20:791-9.

Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature*. 1996; 382:638-42.

Bertucci F, Fineti P, Cervera N, Charafe-Jauffret E, Buttarelli M, Jacquemier J, Chaffanet M, Maraninchi D, Viens P, Birnbaum D. how are different are luminla A and basal breast caner? *Int J Cancer*. 2009; 124:1338-48.

Berx G, Cleton-Jansen AM, Strumane K, de Leeuw WJ, Nollet F, van Roy F, Cornelisse C. E-cadherin is inactivated in a majority of invasive human lobular breast cancers by truncation mutations throughout its extracellular domain. *Oncogene*. 1996; 13:1919-25.

Berx G, Becker KF, Höfler H, van Roy F. Mutations of the human E-cadherin (CDH1) gene. *Hum Mutat*. 1998; 12:226-37.

Birchmeier W, Behrens J. Cadherin expression in carcinomas: role in the formation of cell junctions and the prevention of invasiveness. *Biochim Biophys Acta*. 1994; 1198:11-26.

Birchmeier W, Hülsken J, Behrens J. Adherens junction proteins in tumour progression. *Cancer Surv*. 1995; 24:129-40.

Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, Young TL, Leygue E, Myal Y. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch*. 2009; 454:647-56.

Boice JD Jr, Harvey EB, Blettner M, Stovall M, Flannery JT. Cancer in the contralateral breast after radiotherapy for breast cancer. *N Engl J Med*. 1992; 326:781-5.

Bouchardy C, Benhamou S, Fioretta G, Verkooijen HM, Chappuis PO, Neyroud-Caspar I, Castiglione M, Vinh-Hung V, Vlastos G, Rapiti E. Risk of second breast cancer according to estrogen receptor status and family history. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Sep 29. [Epub ahead of print]

Branković-Magić M, Nikolić-Vukosavljević D, Nesković-Konstantinović Z, Kanjer K, Spuzić I. Estrogen and progesterone receptor content in bilateral breast cancer. *Pathol Res Pract*. 1995; 191:16-24.

Brembeck FH, Rosário M, Birchmeier W. Balancing cell adhesion and Wnt signaling, the key role of beta-catenin. *Curr Opin Genet Dev*. 2006; 16:51-9.

Brenner H, Engelsmann B, Stegmaier C, Ziegler H. Clinical epidemiology of bilateral breast cancer. *Cancer*. 1993; 72:3629-35.

Brown AM. Wnt signaling in breast cancer: have we come full circle? *Breast Cancer Res*. 2001; 3:351-5.

Broët P, de la Rochefordière A, Scholl SM, Fourquet A, Mosseri V, Durand JC, Pouillart P, Asselain B. Contralateral breast cancer: annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol*. 1995; 13:1578-83.

Bukholm IK, Nesland JM, Kåresen R, Jacobsen U, Børresen-Dale AL. E-cadherin and alpha-, beta-, and gamma-catenin protein expression in relation to metastasis in human breast carcinoma. *J Pathol*. 1998; 185:262-6.

Bukholm IK, Nesland JM, Børresen-Dale AL. Re-expression of E-cadherin, alpha-catenin and beta-catenin, but not of gamma-catenin, in metastatic tissue from breast cancer patients [see comments]. *J Pathol*. 2000; 19:15-9.

Bukholm IR, Nesland JM, Bukholm G. Expression of adhesion proteins E-cadherin, alpha-catenin, beta-catenin and gamma-catenin is different in T1 and T2 breast tumours. *Pathology*. 2006; 38:403-7.

Bànkfalvi A, Terpe HJ, Breukelmann D, Bier B, Rempe D, Pschadka G, Krech R, Lellè RJ, Boecker W. Immunophenotypic and prognostic analysis of E-cadherin and beta-catenin expression during breast carcinogenesis and tumour progression: a comparative study with CD44. *Histopathology*. 1999; 34:25-34.

Camp RL, Charette LA, Rimm DL. Validation of tissue microarray technology in breast carcinoma. *Lab Invest*. 2000; 80:1943-9.

Camp RL, Neumeister V, Rimm DL. A decade of tissue microarrays: progress inthe discovery and validation of cancer biomarkers. *J Clin Oncol*. 2008; 26:5630-7.

Candidus S, Bischoff P, Becker KF, Höfler H. No evidence for mutations in the alpha- and beta-catenin genes in human gastric and breast carcinomas. *Cancer Res*. 1996; 56:49-52.

Cano A, Pérez-Moreno MA, Rodrigo I, Locascio A, Blanco MJ, del Barrio MG, Portillo F, Nieto MA. The transcription factor snail controls epithelial-mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. *Nat Cell Biol*. 2000; 2:76-83.

Carmichael AR, Bendall S, Lockerbie L, Prescott R, Bates T. The long-term outcome of synchronous bilateral breast cancer is worse than metachronous or unilateral tumours. *Eur J Surg Oncol*. 2002; 28:388-91.

Cavaliere A, Bellezza G, Scheibel M, Vitali R, Sidoni A. Biopathological profile of multiple synchronous homolateral and bilateral breast cancers. *Pathol Res Pract*. 2004; 200:9-12.

Cavallaro U, Christofori G. Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:118-32.

Chaudary MA, Millis RR, Hoskins EO, Halder M, Bulbrook RD, Cuzick J, Hayward JL. Bilateral primary breast cancer: a prospective study of disease incidence. *Br J Surg*. 1984; 71:711-4.

Chen Y, Thompson W, Semenciw R, Mao Y. Epidemiology of contralateral breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1999; 8:855-61.

Chiang AC, Massagué J. Molecular basis of metastasis. *N Engl J Med*. 2008; 359:2814-23.

Chiba H, Osanai M, Murata M, Kojima T, Sawada N. Transmembrane proteins of tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778:588-600.

Chung GG, Zerkowski MP, Ocal IT, Dolled-Filhart M, Kang JY, Psyrri A, Camp RL, Rimm DL. Beta-catenin and p53 analyses of a breast carcinoma tissue microarray. *Cancer*. 2004; 100:2084-92.

Clevers H. Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. *Cell.* 2006; 127:469-80.

Collins LC, Martyniak A, Kandel MJ, Stadler ZK, Masciari S, Miron A, Richardson AL, Schnitt SJ, Garber JE. Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. *Am J Surg Pathol*. 2009; 33:1093-7.

Coradini D, Oriana S, Mariani L, Miceli R, Bresciani G, Marubini E, Di Fronzo G. Is steroid receptor profile in contralateral breast cancer a marker of independence of the corresponding primary tumour? *Eur J Cancer*. 1998; 34:825-30.

Cowin P, Rowlands TM, Hatsell SJ. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol*. 2005; 17:499-508.

Dawson LA, Chow E, Goss PE. Evolving perspectives in contralateral breast cancer. *Eur J Cancer*. 1998; 34:2000-9.

Dawson PJ, Maloney T, Gimotty P, Juneau P, Ownby H, Wolman SR. Bilateral breast cancer: one disease or two? *Breast Cancer Res Treat*. 1991; 19:233-44.

Ding L, Ellis MJ, Li S, Larson DE, Chen K, Wallis JW, Harris CC, McLellan MD, Fulton RS, Fulton LL, Abbott RM, Hoog J, Dooling DJ, Koboldt DC, Schmidt H, Kalicki J, Zhang Q, Chen L, Lin L, Wendl MC, McMichael JF, Magrini VJ, Cook L, McGrath SD, Vickery TL, Appelbaum E, Deschryver K, Davies S, Guintoli T, Lin L, Crowder R, Tao Y, Snider JE, Smith SM, Dukes AF, Sanderson GE, Pohl CS, Delehaunty KD, Fronick CC, Pape KA, Reed S, Robinson JS, Hodges JS, Schierding W, Dees ND, Shen D, Locke DP, Wiechert ME, Eldred JM, Peck JB, Oberkfell BJ, Lolofie JT, Du F, Hawkins AE, O'Laughlin MD, Bernard KE, Cunningham M, Elliott G, Mason MD, Thompson DM Jr, Ivanovich JL, Goodfellow PJ, Perou CM, Weinstock GM, Aft R, Watson M, Ley TJ, Wilson RK, Mardis ER. Genome remodelling in a basal-like breast cancer metastasis and xenograft. *Nature*. 2010; 464:999-1005.

Dolled-Filhart M, McCabe A, Giltnane J, Cregger M, Camp RL, Rimm DL. Quantitative in situ analysis of beta-catenin expression in breast cancer shows decreased expression is associated with poor outcome. *Cancer Re*s. 2006; 66:5487-94.

Egan RL. Bilateral breast carcinomas: Role of mammography. *Cancer*. 1976; 38:931-8.

Erin N, Wang N, Xin P, Bui V, Weisz J, Barkan GA, Zhao W, Shearer D, Clawson GA. Altered gene expression in breast cancer liver metastases. *Int J Cancer*. 2009; 124:1503-16.

Fergenbaum JH, Garcia-Closas M, Hewitt SM, Lissowska J, Sakoda LC, Sherman EL. Loss of antigenicity in stored sections of breast câncer tissue microarrays. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2004; 13:667-72.

Findley MK, Koval M. Regulation and roles for claudin-family tight junction proteins. *IUBMB Life* 2009; 61:431-7.

Fisher ER, Fisher B, Sass R, Wickerham L. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast Project (Protocol No. 4). XI. Bilateral breast cancer. *Cancer*. 1984; 54:3002-11.

Foote FW, Stewart FW. Comparative studies of cancerous versus noncancerous breasts. *Ann Surg*. 1945; 121:197-222.

Frixen UH, Behrens J, Sachs M, Eberle G, Voss B, Warda A, Löchner D, Birchmeier W. E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells. *J Cell Biol*. 1991; 113:173-85.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 1998; 141:1539-50.

Gajalakshmi CK, Shanta V, Hakama M. Survival from contralateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1999; 58:115-22.

Gamallo C, Palacios J, Suarez A, Pizarro A, Navarro P, Quintanilla M, Cano A. Correlation of E-cadherin expression with differentiation grade and histological type in breast carcinoma. *Am J Pathol.* 1993; 142:987-93.

Gan XQ, Wang JY, Xi Y, Wu ZL, Li YP, Li L. Nuclear Dvl, c-Jun, beta-catenin, and TCF form a complex leading to stabilization of beta-catenin-TCF interaction. *J Cell Biol*. 2008; 180:1087-100.

Garcia SB, Novelli M, Wright NA. The clonal origin and clonal evolution of epithelial tumours. *Int J Exp Pathol*. 2000; 81:89-116.

Ghazani AA, Arneson N, Warren K, Pintilie M, Bayani J, Squire JA, Done SJ. Genomic alterations in sporadic synchronous primary breast cancer using array and metaphase comparative genomic hybridization. *Neoplasia*. 2007; 9:511-20.

Gillett CE, Miles DW, Ryder K, Skilton D, Liebman RD, Springall RJ, Barnes DM, Hanby AM. Retention of the expression of E-cadherin and catenins is associated with shorter survival in grade III ductal carcinoma of the breast. *J Pathol*. 2001; 193:433-41.

Gong SJ, Rha SY, Jeung HC, Roh JK, Yang WI, Chung HC. Bilateral breast cancer: differential diagnosis using histological and biological parameters. *Jpn J Clin Oncol.* 2007; 37:487-92.

Gonzalez MA, Pinder SE, Wencyk PM, Bell JA, Elston CW, Nicholson RI, Robertson JF, Blamey RW, Ellis IO. An immunohistochemical examination of the expression of E-cadherin, alpha- and beta/gamma-catenins, and alpha2- and beta1-integrins in invasive breast cancer. *J Pathol*. 1999; 187:523-9.

Gould Rothberg BE, Bracken MB. E-cadherin immunohistochemical expression as a prognostic factor in infiltrating ductal carcinoma of the breast: a systematic review and meta-analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2006; 100:139-48.

Grigoryan T, Wend P, Klaus A, Birchmeier W. Deciphering the function of canonical Wnt signals in development and disease: conditional loss- and gain-of-function mutations of beta-catenin in mice. *Genes Dev*. 2008; 22:2308-41.

Gulmann C, Grace A, Leader M, Butler D, Patchett S, Kay E. Adenomatous polyposis coli gene, beta-catenin, and E-cadherin expression in proximal and distal gastric cancers and precursor lesions: an immunohistochemical study using tissue microarrays. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2003; 11:230-7.

Gumbiner BM. Carcinogenesis: a balance between beta-catenin and APC. *Curr Biol*. 1997; 7:R443-6.

Hall JM, Lee MK, Newman B, Morrow JE, Anderson LA, Huey B, King MC. Linkage of early-onset familial breast cancer to chromosome 17q21. *Science*. 1990; 250:1684-9.

Hall NJ, Evans AJ, Kollias J, Denley H, Pinder SE, Ellis IO, Blamey RW, Wilson AR. Bilateral breast carcinomas: do they have similar mammographic features? *Clin Radiol*. 1999; 54:434-7.

Harigopal M, Berger AJ, Camp RL, Rimm DL, Kluger HM. Automated quantitative analysis of E-cadherin expression in lymph node metastases is predictive of survival in invasive ductal breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005; 11:4083-9.

Hartman M, Czene K, Reilly M, Bergh J, Lagiou P, Trichopoulos D, Adami HO, Hall P. Genetic implications of bilateral breast cancer: a population based cohort study. *Lancet Oncol*. 2005; 6:377-82.

Hartman M, Czene K, Reilly M, Adolfsson J, Bergh J, Adami HO, Dickman PW, Hall P. Incidence and prognosis of synchronous and metachronous bilateral breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25:4210-6.

Hartsock A, Nelson WJ. Adherens and tight junctions: structure, function and connections to the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778:660-9.

Harvey EB, Brinton LA. Second cancer following cancer of the breast in Connecticut, 1935-82. *Natl Cancer Inst Monogr*. 1985; 68:99-112.

Hashizume R, Koizumi H, Ihara A, Ohta T, Uchikoshi T. Expression of beta-catenin in normal breast tissue and breast carcinoma: a comparative study with epithelial cadherin and alpha-catenin. *Histopathology*. 1996; 29:139-46.

Hatsell S, Rowlands T, Hiremath M, Cowin P. Beta-catenin and Tcfs in mammary development and cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2003; 8:145-58.

Healey EA, Cook EF, Orav EJ. Schnitt SJ, Connolly JL, Harris JR. Contralateral breast cancer: clinical characteristics and impact on prognosis. *J Clin Oncol*. 1993; 11:1545-52.

Heron DE, Komarnicky LT, Hyslop T, Schwartz GF, Mansfield CM. Bilateral breast cancer carcinoma: risk factors and outcome for patients with synchronous and metachronous diseases. *Cancer*. 2000; 88:2739-50.

Heimann R, Lan F, McBride R, Hellman S. Separating favorable from unfavorable prognostic markers in breast cancer: the role of E-cadherin. *Cancer Res*. 2000; 60:298-304.

Hellman S, Harris JR. *Diseases of the breast*. 2nd. Philadelphia: W B Saunders; 2000; Natural history os breast cancer; p.407-23.

Hemminki K, Ji J, Försti A. Risks for familial and contralateral breast cancer interact multiplicatively and cause a high risk. *Cancer Res*. 2007; 67:868-70.

Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, Fridlyand J, Sahin A, Agarwal R, Joy C, Liu W, Stivers D, Baggerly K, Carey M, Lluch A, Monteagudo C, He X, Weigman V, Fan C, Palazzo J, Hortobagyi GN, Nolden LK, Wang NJ, Valero V, Gray JW, Perou CM, Mills GB. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*. 2009; 69:4116-24.

Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, Rasmussen KE, Jones LP, Assefnia S, Chandrasekharan S, Backlund MG, Yin Y, Khramtsov AI, Bastein R, Quackenbush J, Glazer RI, Brown PH, Green JE, Kopelovich L, Furth PA, Palazzo JP, Olopade OI, Bernard PS, Churchill GA, Van Dyke T, Perou CM. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007; 8:R76.

Hewitt KJ, Agarwal R, Morin PJ. The claudin gene family: expression in normal and neoplastic tissues. *BMC Cancer*. 2006; 6:186.

Hirohashi S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. *Am J Pathol.* 1998; 153:333-9.

Hislop TG, Elwood JM, Coldman AJ, Spinelli JJ, Worth AJ, Ellison LG. Second primary cancers of the breast: incidence and risk factors. *Br J Cancer*. 1984; 49:79-85.

Holdaway IM, Mason BH, Bennett RC, Alexander AI, Hahnel R, Kiang DT. Estrogen receptors in bilateral breast cancer. *Cancer*. 1988; 62:109-13.

Holmberg L, Adami HO, Ekbom A, Bergström R, Sandström A, Lindgren A. Prognosis in bilateral breast cancer. Effects of time interval between first and second primary tumors. *Br J Cancer.* 1988; 58:191-4.

Horn PL, Thompson WD, Schwartz SM. Factors associated with the risk of second primary breast cancer: an analysis of data from the Connecticut Tumor Registry. *J Chronic Dis*. 1987; 40:1003-11.

Howe LR, Brown AM. Wnt signaling and breast cancer. *Cancer Biol Ther*. 2004; 3:36-41.

Hsueh C, Chang YS, Tseng NM, Liao CT, Hsueh S, Chang JH, Wu IC, Chang KP. Expression pattern and prognostic significance of claudins 1, 4, and 7 in nasopharyngeal carcinoma. *Hum Pathol*. 2010; 41:944-50.

Hunt NC, Douglas-Jones AG, Jasani B, Morgan JM, Pignatelli M. Loss of E-cadherin expression associated with lymph node metastases in small breast carcinomas. *Virchows Arch*. 1997; 430:285-9.

Heuberger J, Birchmeier W. Interplay of cadherin-mediated cell adhesion andcanonical Wnt signaling. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2010; 2(2):a002915.

Imyanitov EN, Togo AV, Suspitsin EN, Grigoriev MY, Pozharisski KM, Turkevich EA, Hanson KP, Hayward NK, Chenevix-Trench G, Theillet C, Lavin MF. Evidence for microsatellite instability in bilateral breast carcinomas. *Cancer Lett*. 2000; 154:9-17.

Imyanitov EN, Suspitsin EN, Grigoriev MY, Togo AV, Kuligina ESh, Belogubova EV, Pozharisski KM, Turkevich EA, Rodriquez C, Cornelisse CJ, Hanson KP, Theillet C. Concordance of allelic imbalance profiles in synchronous and metachronous bilateral breast carcinomas. *Int J Cancer*. 2002; 100:557-64.

Imyanitov EN, Hanson KP. Molecular pathogenesis of bilateral breast cancer. *Cancer Lett*. 2003; 191:1-7.

Intra M, Rotmensz N, Viale G, Mariani L, Bonanni B, Mastropasqua MG, Galimberti V, Gennari R, Veronesi P, Colleoni M, Tousimis E, Galli A, Goldhirsch A, Veronesi U. Clinicopathologic characteristics of 143 patients with synchronous bilateral invasive breast carcinomas treated in a single institution. *Cancer*. 2004; 101:905-12.

Janschek E, Kandioler-Eckersberger D, Ludwig C, Kappel S, Wolf B, Taucher S, Rudas M, Gnant M, Jakesz R. Contralateral breast cancer: molecular differentiation between metastasis and second primary cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2001; 67:1-8.

Jemal A, Siegel R, Xu J, Ward E. Cancer statistics, 2010. *CA Cancer J Clin*. 2010; 60:277-300.

Ji J, Hemminki K. Risk for contralateral breast cancers in a population covered by mammography: effects of family history, age at diagnosis and histology. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 105:229-36.

Jiang WG, Mansel RE. E-cadherin complex and its abnormalities in human breast cancer. *Surg Oncol*. 2000; 9:151-71.

Kaas R, Peterse JL, Hart AA, Voogd AC, Rutgers EJ, van Leeuwen FE. The influence of tamoxifen treatment on the oestrogen receptor in metachronouscontralateral breast cancer. *Br J Cancer*. 2003; 88:707-10.

Karayiannakis AJ, Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Davaris PS, Pignatelli M. Expression patterns of beta-catenin in in situ and invasive breast cancer. *Eur J Surg Oncol*. 2001; 27:31-6.

Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, Nomura S, Noda S, Kawajiri H, Ishikawa T, Wakasa K, Hirakawa K. Significance of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2010; 103:249-55.

Kemler R. From cadherins to catenins: cytoplasmic protein interactions and regulation of cell adhesion. *Trends Genet*. 1993; 9:317-21.

Khramtsov AI, Khramtsova GF, Tretiakova M, Huo D, Olopade OI, Goss KH. Wnt/beta-catenin pathway activation is enriched in basal-like breast cancers and predicts poor outcome. *Am J Pathol*. 2010; 176:2911-20.

Kilgore AR, Bell HG, Ahlquist RE Jr. Cancer in the second breast. *Am J Surg*. 1956; 92:156-61.

Kim TH, Huh JH, Lee S, Kang H, Kim GI, An HJ. Down-regulation of claudin-2 in breast carcinomas is associated with advanced disease. *Histopathology*. 2008; 53:48-55.

Kinoshita T, Ueda M, Enomoto K, Ikeda T, Kikuchi K, Ishii S, Kitajima M. Comparison of p53 gene abnormalities in bilateral and unilateral breast cancer. *Cancer*. 1995; 76:2504-9.

Klaus A, Birchmeier W. Wnt signalling and its impact on development and cancer. *Nat Rev Cancer*. 2008; 8:387-98.

Knudsen KA, Wheelock MJ. Cadherins and the mammary gland. *J Cell Biochem*. 2005; 95:488-96.

Kollias J, Man S, Marafie M, Carpenter K, Pinder S, Ellis IO, Blamey RW, Cross G, Brook JD. Loss of heterozygosity in bilateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2000; 64:241-51.

Kollias J, Ellis IO, Elston CW, Blamey RW. Prognostic significance of synchronous and metachronous bilateral breast cancer. *World J Surg*. 2001; 25:1117-24.

Kollias J, Pinder SE, Denley HE, Ellis IO, Wencyk P, Bell JA, Elston CW, Blamey RW. Phenotypic similarities in bilateral breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2004; 85:255-61.

Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, Rein A, Sauter G, Kallioniemi OP, Sukumar S. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 2003; 22:2021-33.

Kominsky SL. Claudins: emerging targets for cancer therapy. *Expert Rev Mol Med*. 2006; 8:1-11.

Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Bärlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP. Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med*. 1998; 4:844-7.

Kowalski PJ, Rubin MA, Kleer CG. E-cadherin expression in primary carcinomas of the breast and its distant metastases. *Breast Cancer Res*. 2003; 5:R217-22.

Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778:631-45.

Kulka J, Szász AM, Németh Z, Madaras L, Schaff Z, Molnár IA, Tokés AM. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2009; 15:59-64.

Kurian AW, McClure LA, John EM, Horn-Ross PL, Ford JM, Clarke CA. Second primary breast cancer occurrence according to hormone receptor status. *J Natl Cancer Inst*. 2009; 101:1058-65.

Kurtz JM, Amalric R, Brandone H, Ayme Y, Spitalier JM. Contralateral breast cancer and other second malignancies in patients treated by breast-conserving therapy with radiation. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1988; 15:277-84.

Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, Jirstrom K, Landberg G, Martin F, Duffy MJ, Gallagher WM. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer*. 2009; 124:2088-97.

Lee SK, Kim WW, Kim SH, Hur SM, Kim S, Choi JH, Cho EY, Han SY, Hahn BK, ChoeJH, Kim JH, Kim JS, Lee JE, Nam SJ, Yang JH. Characteristics of metastasis in the breast from extramammary malignancies. *J Surg Oncol.* 2010; 101:137-40.

Leis HP Jr. Managing the remainig breast. *Cancer.* 1980; 46(4 Suppl):1026-30.

Li J, Wang CY. TBL1-TBLR1 and beta-catenin recruit each other to Wnt target-gene promoter for transcription activation and oncogenesis. *Nat Cell Biol*. 2008; 10:160-9.

Lidereau R, Soussi T. Absence of p53 germ-line mutations in bilateral breast cancer patients. *Hum Genet*. 1992; 89:250-2.

Lin SY, Xia W, Wang JC, Kwong KY, Spohn B, Wen Y, Pestell RG, Hung MC. Beta-catenin, a novel prognostic marker for breast cancer: its roles in cyclin D1 expression and cancer progression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2000; 97:4262-6.

Lipponen P, Saarelainen E, Ji H, Aaltomaa S, Syrjänen K. Expression of E-cadherin (E-CD) as related to other prognostic factors and survival in breast cancer. *J Pathol*. 1994; 174:101-9.

Lundy J, Mishriki Y, Varma AO, Kufe D, Schuss A. Tumor-associated antigens in bilateral breast cancer. *J Surg Oncol.* 1987; 35:24-9.

MacDonald BT, Tamai K, He X. Wnt/beta-catenin signaling: components, mechanisms, and diseases. *Dev Cell*. 2009; 17:9-26.

Madhavan M, Srinivas P, Abraham E, Ahmed I, Mathew A, Vijayalekshmi NR, Balaram P. Cadherins as predictive markers of nodal metastasis in breast cancer. *Mod Pathol*. 2001; 14:423-7.

Maguire TM, Shering SG, McDermott EW, O'Higgins N, Fennelly JJ, Crown J, Duffy MJ. Assay of E-cadherin by ELISA in human breast cancers. *Eur J Cancer*. 1997; 33:404-8.

Mahler-Araujo B, Savage K, Parry S, Reis-Filho JS. Reduction of E-cadherin expression is associated with non-lobular breast carcinomas of basal-like and triple negative phenotype. *J Clin Pathol*. 2008; 61:615-20.

Malone KE, Begg CB, Haile RW, Borg A, Concannon P, Tellhed L, Xue S, Teraoka S, Bernstein L, Capanu M, Reiner AS, Riedel ER, Thomas DC, Mellemkjaer L, Lynch CF, Boice JD Jr, Anton-Culver H, Bernstein JL. Population-based study of the risk of second primary contralateral breast cancer associated with carrying a mutation in BRCA1 or BRCA2. *J Clin Oncol*. 2010; 28:2404-10.

Martin TA, Harrison GM, Watkins G, Jiang WG. Claudin-16 reduces the aggressive behavior of human breast cancer cells. *J Cell Biochem*. 2008; 105:41-52.

Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. *Biochim Biophys Acta*. 2009; 1788:872-91.

Matsuo K, Fukutomi T, Tsuda H, Akashi-Tanaka S, Shimizu C, Hasegawa T. Differences in estrogen receptor status, HER2, and p53 comparing metachronous bilateral breast carcinoma. *J Surg Oncol*. 2001; 77:31-4.

McCrea PD, Gumbiner BM. Purification of a 92-kDa cytoplasmic protein tightly associated with the cell-cell adhesion molecule E-cadherin (uvomorulin). Characterization and extractability of the protein complex from the cell cytostructure. *J Biol Chem*. 1991; 266:4514-20.

Mertens WC, Hilbert V, Makari-Judson G. Contralateral breast cancer: factors associated with stage and size at presentation. *Breast J*. 2004; 10:304-12.

Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa/2010 incidência de câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA, 2009

Mitic LL, Van Itallie CM, Anderson JM. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions I. Tight junction structure and function: lessons from mutant animals and proteins. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2000; 279:G250-4.

Mittal MK, Myers JN, Bailey CK, Misra S, Chaudhuri G. Mode of action of the retrogene product SNAI1P, a SNAIL homolog, in human breast cancer cells. *Mol Biol Rep*. 2010; 37:1221-7.

Moll R, Mitze M, Frixen UH, Birchmeier W. Differential loss of E-cadherin expression in infiltrating ductal and lobular breast carcinomas. *Am J Pathol*. 1993; 143:1731-42.

Montoro AF, Montoro FF, Monteiro DCM, Rivera JS. *Rev Bras Ginec Obstet.* 1995; 17:613-16.

Morin PJ. Claudin proteins in human cancer: promising new targets for diagnosis and therapy. *Cancer Res*. 2005; 65:9603-6.

Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, Hakamada K, Sasaki M, Kijima H. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med*. 2007; 20:139-43.

Mose S, Adamietz IA, Thilman C, Saran F, Bernhard M, Pahnke R, Böttcher H. Bilateral breast carcinoma versus unilateral diseases. Review of 498 patients. *Am J Clin Oncol*. 1997; 20:541-5.

Nacht M, Ferguson AT, Zhang W, Petroziello JM, Cook BP, Gao YH, Maguire S, Riley D, Coppola G, Landes GM, Madden SL, Sukumar S. Combining serial analysis of gene expression and array technologies to identify genes differentially expressed in breast cancer. *Cancer Res*. 1999; 59:5464-70.

Nagai MA, Da Rós N, Neto MM, de Faria Junior SR, Brentani MM, Hirata R Jr, Neves EJ. Gene expression profiles in breast tumors regarding the presence or absence of estrogen and progesterone receptors. *Int J Cancer*. 2004; 111:892-9.

Nakopoulou L, Gakiopoulou H, Keramopoulos A, Giannopoulou I, Athanassiadou P, Mavrommatis J, Davaris PS. c-met tyrosine kinase receptor expression is associated with abnormal beta-catenin expression and favourable prognostic factors in invasive breast carcinoma. *Histopathology*. 2000; 36:313-25.

Narod SA, Foulkes WD. BRCA1 and BRCA2: 1994 and beyond. *Nat Rev Cancer*. 2004; 4:665-76.

Nelson WJ, Nusse R. Convergence of Wnt, beta-catenin, and cadherin pathways. *Science*. 2004; 303:1483-7.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, Hernandez-Boussard T, Livasy C, Cowan D, Dressler L, Akslen LA, Ragaz J, Gown AM, Gilks CB, van de Rijn M, Perou CM. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004; 10:5367-74.

Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778:562-71.

Newman LA, Sabin AA, Cunningham JE, Bondy ML, Mirza NQ, Vlastos GS, Whitman GJ, Brown H, Buchholz TA, Lee MH, Singletary SE. A case-control study of unilateral and bilateral breast carcinoma patients. *Cancer*. 2001; 91:1845-53.

Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G. Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. *Int J Cancer*. 2001; 94:1-5.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976; 194:23-8.

Ogawa Y, Hai E, Matsumoto K, Ikeda K, Tokunaga S, Nagahara H, Sakurai K, Inoue T, Nishiguchi Y. Androgen receptor expression in breast cancer: relationship with clinicopathological factors and biomarkers. *Int J Clin Oncol.* 2008; 13:431-5.

Oka H, Shiozaki H, Kobayashi K, Inoue M, Tahara H, Kobayashi T, Takatsuka Y, Matsuyoshi N, Hirano S, Takeichi M, et al., Expression of E-cadherin cell adhesion molecules in human breast cancer tissues and its relationship to metastasis. *Cancer Res*. 1993; 53:1696-701.

Oliveira SS, Morgado-Díaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. *Cell Mol Life Sci*. 2007; 64:17-28.

Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 2008; 68:3645-54.

Osanai M, Murata M, Chiba H, Kojima T, Sawada N. Epigenetic silencing of claudin-6 promotes anchorage-independent growth of breast carcinoma cells. *Cancer Sci*. 2007; 98:1557-62.

Oyama T, Kanai Y, Ochiai A, Akimoto S, Oda T, Yanagihara K, Nagafuchi A, Tsukita S, Shibamoto S, Ito F. A truncated beta-catenin disrupts the interaction between E-cadherin and alpha-catenin: a cause of loss of intercellular adhesiveness in human cancer cell lines. *Cancer Res*. 1994; 54:6282-7.

Ozawa M, Baribault H, Kemler R. The cytoplasmic domain of the cell adhesion molecule uvomorulin associates with three independent proteins structurally related in different species. *EMBO J*. 1989; 8:1711-7.

Ozer E, Canda T, Kuyucuodlu F. p53 mutations in bilateral breast carcinoma. Correlation with Ki-67 expression and the mean nuclear volume. *Cancer Lett*. 1998; 122:101-6.

Pandis N, Teixeira MR, Gerdes AM, Limon J, Bardi G, Andersen JA, Idvall I, Mandahl N, Mitelman F, Heim S. Chromosome abnormalities in bilateral breast carcinomas. Cytogenetic evaluation of the clonal origin of multiple primary tumors. *Cancer*. 1995; 76:250-8.

Paredes J, Correia AL, Ribeiro AS, Milanezi F, Cameselle-Teijeiro J, Schmitt FC. Breast carcinomas that co-express E- and P-cadherin are associated with p120-catenin cytoplasmic localisation and poor patient survival. *J Clin Pathol*. 2008; 61:856-62.

Paris L, Tonutti L, Vannini C, Bazzoni G. Structural organization of the tight junctions. *Biochim Biophys Acta*. 2008; 1778:646-59.

Park D, Kåresen R, Axcrona U, Noren T, Sauer T. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. *APMIS*. 2007a; 115:52-65.

Park SC, Hwang UK, Ahn SH, Gong GY, Yoon HS. Genetic changes in bilateral breast cancer by comparative genomic hybridisation. *Clin Exp Med*. 2007b; 7:1-5.

Parker C, Rampaul RS, Pinder SE, Bell JA, Wencyk PM, Blamey RW, Nicholson RI, Robertson JF. E-cadherin as a prognostic indicator in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 2001; 85:1958-63.

Pedersen KB, Nesland JM, Fodstad Ø, Maelandsmo GM. Expression of S100A4, E-cadherin, alpha- and beta-catenin in breast cancer biopsies. *Br J Cancer*. 2002; 87:1281-6.

Penault-Llorca F, André F, Sagan C, Lacroix-Triki M, Denoux Y, Verriele V, Jacquemier J, Baranzelli MC, Bibeau F, Antoine M, Lagarde N, Martin AL, Asselain B, Roché H. Ki67 expression and docetaxel efficacy in patients with estrogen receptor-positive breast cancer. *J Clin Oncol.* 2009; 27:2809-15.

Perl AK, Wilgenbus P, Dahl U, Semb H, Christofori G. A causal role for E-cadherin in the transition from adenoma to carcinoma. *Nature*. 1998; 392:190-3.

Perou CM, Sørlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, Fluge O, Pergamenschikov A, Williams C, Zhu SX, Lønning PE, Børresen-Dale AL, Brown PO, Botstein D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000; 406:747-52.

Piekarski JH, Biernat W. Clinical significance of CK5/6 and PTEN protein expression in patients with bilateral breast carcinoma. *Histopathology*. 2006; 49:248-55.

Polakis P. Wnt signaling and cancer. *Genes Dev*. 2000; 14:1837-51.

Polyak K. Breast cancer: origins and evolution. *J Clin Invest*. 2007; 117:3155-63.

Polyak K, Weinberg RA. Transitions between epithelial and mesenchymal states: acquisition of malignant and stem cell traits. *Nat Rev Cancer*. 2009; 9:265-73.

Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, He X, Perou CM. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010; 12:R68.

Quan G, Pommier SJ, Pommier RF. Incidence and outcomes of contralateral breast cancers. *Am J Surg*. 2008; 195:645-50; discussion 650.

Ramaswamy S, Ross KN, Lander ES, Golub TR. A molecular signature of metastasis in primary solid tumors. *Nat Genet*. 2003; 33:49-54.

Renz DM, Böttcher J, Baltzer PA, Dietzel M, Vag T, Gajda M, Camara O, Runnebaum IB, Kaiser WA. The contralateral synchronous breast carcinoma: a comparison of histology, localization, and magnetic resonance imaging characteristics with the primary index cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010; 120:449-59.

Robbins GF, Berg JW. Bilateral primary breast cancer; a prospective clinicopathological study. *Cancer*. 1964; 17:1501-27.

Rowlands TM, Pechenkina IV, Hatsell S, Cowin P. Beta-catenin and cyclin D1: connecting development to breast cancer. *Cell Cycle*. 2004; 3:145-8.

Saad RS, Denning KL, Finkelstein SD, Liu Y, Pereira TC, Lin X, Silverman JF. Diagnostic and prognostic utility of molecular markers in synchronous bilateral breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2008; 21:1200-7.

Safal M, Lower EE, Hasselgren PO, Hungness ES, Gazder P, Aron B, ShaughnessyEA, Yassin R. Bilateral synchronous breast cancer and HER-2/neu overexpression. *Breast Cancer Res Treat*. 2002; 72:195-201.

Samant RS, Olivotto IA, Jackson JS, Mates D. Diagnosis of metachronous contralateral breast cancer. *Breast J.* 2001; 7:405-10.

Sarrió 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; 68:989-97.

Schlechter BL, Yang Q, Larson PS, Golubeva A, Blanchard RA, de las Morenas A, Rosenberg CL. Quantitative DNA fingerprinting may distinguish new primary breast cancer from disease recurrence. *J Clin Oncol*. 2004; 22:1830-8.

Shergill IS, Shergill NK, Arya M, Patel HRH. Tissue microarrays: a current medical research tool. *Curr Med Res Opin*. 2004; 20:707-12.

Shibata A, Tsai YC, Press MF, Henderson BE, Jones PA, Ross RK. Clonal analysis of bilateral breast cancer. *Clin Cancer Res*. 1996; 2:743-8.

Siegel PM, Muller WJ. Transcription factor regulatory networks in mammary epithelial development and tumorigenesis. *Oncogene*. 2010; 29:2753-9.

Siitonen SM, Kononen JT, Helin HJ, Rantala IS, Holli KA, Isola JJ. Reduced E-cadherin expression is associated with invasiveness and unfavorable prognosis in breast cancer. *Am J Clin Pathol.* 1996; 105:394-402.

Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, Levin WJ, Stuart SG, Udove J, Ullrich A, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989; 244:707-12.

Smalley MJ, Dale TC. Wnt signaling and mammary tumorigenesis. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2001; 6:37-52.

Sobin LH, Wittekind Ch. *TNM: classificação de tumors malignos*. Trad. de A L A Eisenberg. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004. Tumores de mama; p.137-48.

Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. *Histopathology*. 2005; 46:551-60.

Sormunen RT, Leong AS, Vääräniemi JP, Fernando SS, Eskelinen SM. Immunolocalization of the fodrin, E-cadherin, and beta-catenin adhesion complex in infiltrating ductal carcinoma of the breast-comparison with an in vitro model. *J Pathol*. 1999; 187:416-23.

Stark A, Lu M, Mackowiak P, Linden M. Concordance of the hormone receptors and correlation of HER-2/neu overexpression of the metachronous cancers of contralateral breasts. *Breast J*. 2005; 11:183-7.

Stenmark-Askmalm M, Gentile M, Wingren S, Ståhl O. Protein accumulation and gene mutation of p53 in bilateral breast cancer. South-East Sweden Breast Cancer Group. *Acta Oncol*. 2001; 40:56-62.

Sterns EE, Fletcher WA. Bilateral cancer of the breast: a review of clinical, histologic, and immunohistologic characteristics. *Surgery.* 1991; 110:617-22.

Su LK, Vogelstein B, Kinzler KW. Association of the APC tumor suppressor protein with catenins. *Science*. 1993; 262:1734-7.

Suspitsin EN, Sokolenko AP, Togo AV, Lazareva YR, Turkevich EA, Matsko DE, Henrich KO, Borresen-Dale AL, Schwab M, Cornelisse CJ, Imyanitov EN. Non random distribution of oncogene amplifications in bilateral breast carcinomas: Possible role of host factors and survival bias. *Int J Cancer.* 2007; 120:297-302.

Swain SM, Wilson JW, Mamounas EP, Bryant J, Wickerham DL, Fisher B, Paik S, Wolmark N. Estrogen receptor status of primary breast cancer is predictive of estrogen receptor status of contralateral breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2004; 96:516-23.

Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. *Adv Drug Deliv Rev*. 2005; 57:919-28.

Takeichi M. The cadherins: cell-cell adhesion molecules controlling animal morphogenesis. *Development*. 1988; 102:639-55.

Takeichi M. Cadherin cell adhesion receptors as a morphogenetic regulator. *Science*. 1991; 251:1451-5.

Tan DS, Potts HW, Leong AC, Gillett CE, Skilton D, Harris WH, Liebmann RD, Hanby AM. The biological and prognostic significance of cell polarity and E-cadherin in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Pathol*. 1999; 189:20-7.

Teixeira MR, Ribeiro FR, Torres L, Pandis N, Andersen JA, Lothe RA, Heim S. Assessment of clonal relationships in ipsilateral and bilateral multiple breast carcinomas by comparative genomic hybridisation and hierarchical clustering analysis. *Br J Cancer*. 2004; 91:775-82.

Thiery JP. Epithelial-mesenchymal transitions in tumour progression. *Nat Rev Cancer*. 2002; 2:442-54.

Thiery JP, Sleeman JP. Complex networks orchestrate epithelial-mesenchymal transitions. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2006; 7:131-42.

Tokés AM, Kulka J, Paku S, Máthé M, Páska C, Lódi C, Kiss A, Schaff Z. The expression of five different claudins in invasive breast carcinomas: comparison of pT1pN1 and pT1pN0 tumors. *Pathol Res Pract*. 2005a; 201:537-44.

Tokés AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Páska C, Novák PK, Szilák L, Kiss A, Bögi K, Schaff Z. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*. 2005b; 7:R296-305.

Tse GM, Kung FY, Chan AB, Law BK, Chang AR, Lo KW. Clonal analysis of bilateral mammary carcinomas by clinical evaluation and partial allelo typing. *Am J Clin Pathol*. 2003; 120:168-74.

Tsukita S, Furuse M. Occludin and claudins in tight-junction strands: leading or supporting players? *Trends Cell Biol.* 1999; 9:268-73.

Tsukita S, Furuse M. Pores in the wall: claudins constitute tight junction strands containing aqueous pores. *J Cell Biol*. 2000; 149:13-6.

Tsukita S, Furuse M, Itoh M. Multifunctional strands in tight junctions. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2001; 2:285-93.

van de Wetering M, Barker N, Harkes IC, van der Heyden M, Dijk NJ, Hollestelle A, Klijn JG, Clevers H, Schutte M. Mutant E-cadherin breast cancer cells do not display constitutive Wnt signaling. *Cancer Res*. 2001; 61:278-84.

van Roy F, Berx G. The cell-cell adhesion molecule E-cadherin. *Cell Mol Life Sci*. 2008; 65:3756-88.

Verkooijen HM, Chatelain V, Fioretta G, Vlastos G, Rapiti E, Sappino AP, Bouchardy C, Chappuis PO. Survival after bilateral breast cancer: results from a population-based study. *Breast Cancer Res Treat*. 2007; 105:347-57.

Visvader JE. Keeping a breast of the mammary epithelial hierarchy and breast tumorigenesis. *Genes Dev*. 2009; 23:2563-77.

Wanebo HJ, Senofsky GM, Fechner RE, Kaiser D, Lynn S, Paradies J. Bilateral reast cancer. Risk reduction by contralateral biopsy. *Ann Surg*. 1985; 201:667-77.

Weigelt B, Glas AM, Wessels LF, Witteveen AT, Peterse JL, van't Veer LJ. Gene expression profiles of primary breast tumors maintained in distant metastases. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003; 100:15901-5.

Weigelt B, Hu Z, He X, Livasy C, Carey LA, Ewend MG, Glas AM, Perou CM, Van't Veer LJ. Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res*. 2005a; 65:9155-8.

Weigelt B, Peterse JL, van't Veer LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nat Rev Cancer*. 2005b; 5:591-602.

Wijnhoven BP, Dinjens WN, Pignatelli M. E-cadherin-catenin cell-cell adhesion complex and human cancer. *Br J Surg*. 2000; 87:992-1005.

Wirtz-Peitz F, Zallen JA. Junctional trafficking and epithelial morphogenesis. *Curr Opin Genet Dev*. 2009; 19:350-6

Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M,Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA,Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007; 25:118-45.

Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J, Quirk Y, Ford D, Collins N, Nguyen K, Seal S, Tran T, Averill D, et al Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science*. 1994; 265:2088-90.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. *Globocan 2008: Cancer Incidence and Mortality Worldwide in 2008*. Avaliable from: <http://globocan.iarc.fr/ 2008> [Acessado em 30/10/2010]

Zschiesche W, Schönborn I, Behrens J, Herrenknecht K, Hartveit F, Lilleng P, Birchmeier W. Expression of E-cadherin and catenins in invasive mammary carcinomas. *Anticancer Res*. 1997; 17:561-7.

APÊNDICE

Apêndice 1 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital A.C. Camargo

Hospital A.C.Camargo

Comitê de Ética em Pesquisa - CEP

São Paulo, 31 de Julho de 2007.

Ao
Dr. Fernando Augusto Soares

Ref.: Projeto de Pesquisa nº 950/07
"Estudo de moléculas de adesão em Câncer de Mama Bilateral".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Fundação Antonio Prudente - Hospital A.C. Camargo, em sua última reunião de 10/07/2007, **aprovaram** a realização do estudo e tomaram conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para pesquisa envolvendo seres humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com Resoluções CNS;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Justificativa da não apresentação do orçamento financeiro;
- Declaração de Ciência do Departamento de Mastologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Gilles Landman
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Rua Prof. Antônio Prudente, 211 – Liberdade – São Paulo – SP CEP 01509-900 - CNPJ 60.961.968/0001-06
Tel/Fax (0XX11)2189.5020 – cep_hcancer@hcancer.org.br

Apêndice 2 - Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e Instituto de Radiologia do Hospital das Clínicas

PROTOCOLO
Local: Pós-Graduação FMUSP
Recebido por: Anal
Data: 05/09/07.

HC

Ao
Departamento de Radiologia

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em 30.08.07, tomou ciência da execução do Protocolo de Pesquisa nº **0749/07**, intitulado: "**ESTUDO DE MOLÉCULAS DE ADESÃO NO CÂNCER DE MAMA BILATERAL**".

No que tange à sua parte empírica será desenvolvido no **Hospital do Câncer A. C. Camargo,** tendo seu Comitê de Ética aprovado o estudo em 10.07.07.

Pesquisador (a) Responsável: **Prof. Dr. Fernando Augusto Soares**
Pesquisador (a) Executante: **Dr. Hirofumi Iyeyasu**

CAPPesq, 30 de agosto de 2007.

PROF. DR. EDUARDO MASSAD
Presidente
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa

Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador da Pós-Graduação
Área de Oncologia
FMUSP

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP
Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Rua Ovídio Pires de Campos, 225, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP