MARIA AUXILIADORA BERNARDI

**Expressão de CD44 e CD24 em carcinomas mamários ductais
invasivos de acordo com a análise dos subtipos moleculares
e sua relação com fatores prognósticos**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de: Oncologia

Orientadora: Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Bernardi, Maria Auxiliadora

Expressão de CD44 e CD24 em carcinomas mamários ductais invasivos de acordo com a análise dos subtipos moleculares e sua relação com fatores prognósticos / Maria Auxiliadora Bernardi. -- São Paulo, 2011.

Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Programa de Oncologia.

Orientadora: Maria Mitzi Brentani.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Células-tronco neoplásicas 3.Subtipos moleculares 4.Marcadores biológicos 5.Fenótipos 6.CD44/CD24 7.Claudina 7 8.CK5 9.CK6 10.CK18 11.Antígeno Ki-67

USP/FM/DBD-222/11

DEDICATÓRIA

A Sra. Catarina Salvia, *in memoriam*, que ensinou a todos de seu convívio, que apesar de todas as dificuldades que possamos passar nesta vida, nunca podemos desanimar.

Aos meus pais, Américo Bernardi e Annita Salvia Bernardi, pelos seus ensinamentos e por conviverem comigo durante toda minha vida.

A minha irmã Maria Cecília, por toda força interior, coragem, determinação e sabedoria.

Ao meu cunhado Élio, pelo carinho e atenção.

A minha sobrinha Catarina, fonte de alegria e esperança, que faz com me sinta mais jovem.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Profa. Dra. Maria Mitzi Brentani, por todos seus ensinamentos, convívio e paciência nestes meses, por ensinar-me a nunca desistir.

À Profa. Dra. Ângela Flávia Logullo Waitzberg, do Departamento de Patologia da UNIFESP, pela elaboração do TMA, leitura, supervisão e interpretação das análises imunoistoquímicas e pela colaboração geral neste trabalho.

À Dra. Fátima Solange Passini, pesquisadora do Laboratório Lim24, do Departamento de Radiologia e Oncologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, pela elaboração das tabelas, análises estatísticas e interpretação dos dados.

À Sueli Nonogaki, pesquisadora científica do Instituto Adolfo Lutz e Hospital ACCamargo, pelo auxílio no estudo imunoistoquímico.

Ao Prof. Dr. Fernando Augusto Soares, chefe da Patologia do Hospital ACCamargo, pela ajuda na supervisão e fornecimento dos anticorpos para a execução das análises imunoistoquímicas.

Ao Sr. Carlos Eduardo Blumke, pela assistência técnica na organização e confecção dos blocos e lâminas do TMA.

À Profa. Dra. Edna Kimura do Departamento de Histologia do ICB, por ter permitido a utilização da aparelhagem necessária para a preparação do TMA.

Ao Dr. Rafael Malagoli, pesquisador do Hospital ACCamargo pelo auxílio e digitalização das imagens das lâminas dos marcadores imunoistoquímicos.

À Sra. Maria Cristina Piñeiro Grandal, pelo auxílio no serviço fotográfico.

À Sra. Maria José Gonçalves, por todo auxílio com o levantamento bibliográfico, procura de artigos científicos e organização desta tese.

À Dra. Maria do Socorro Maciel, diretora do Departamento de Mastologia do Hospital ACCamargo, pelas sugestões, revisões e auxílio para conclusão desta tese.

Ao Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, direção, funcionários do hospital, dos Ambulatórios e principalmente, a Sra. Gislene Barroso Vigilato - auxiliar de laboratório, e Sra. Jorgina Aparecida da Silva – registradora do RHC, todo carinho, paciência e auxílio para levantamento dos casos e localização dos blocos de parafina.

A FAPESP e ao CNPq pelo auxílio financeiro.

SUMÁRIO

Resumo

Summary

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Células tronco epiteliais mamárias.....	12
2.1	Objetivo Geral	21
2.2	Objetivos Específicos	21
3	MÉTODOS	23
3.1	Critérios de inclusão.....	25
3.2	Critérios de exclusão.....	25
3.3	Critérios de avaliação da amostra.....	26
3.4	Método anatomopatológico	27
3.5	Construção e análise dos microarranjos teciduais (tissue microarrays - TMA)	28
3.6	Método imunoistoquímico	29
3.7	Análises estatísticas.....	33
4	RESULTADOS.....	34
4.1	Variáveis clínico-patológicas.....	35
4.2	Variáveis imunoistoquímicas.....	39
5	DISCUSSÃO	62
6	CONCLUSÕES	71
6	ANEXOS	74
7	REFERÊNCIAS.....	77

RESUMO

Bernardi MA. *Expressão de CD44 e CD24 em carcinomas mamários ductais invasivos de acordo com a análise dos subtipos moleculares e sua relação com fatores prognósticos* [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2011. 92p.

Carcinomas de mama são heterogêneos e consistem de diversos tipos celulares. Perfis de expressão gênica usando DNA microarrays identificaram quatro subtipos moleculares fundamentais baseados na expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e de fator de crescimento epidérmico (HER2) (luminal tipo A, luminal tipo B, tumores expressando somente HER2 e triplos negativos) refletindo a heterogeneidade molecular dos carcinomas. Sugeriu-se que esta heterogeneidade advém da presença de células tronco tumorais com a capacidade de se diferenciar ao longo de vias divergentes e outros estudos sugeriram que a presença destas células tronco tumorais pode ser evidenciada pela análise fenotípica de CD44 e CD24. Nosso objetivo foi detectar a frequência de CD24 e CD44 isolados ou combinados, analisados por imunoistoquímica e sua associação com os subtipos moleculares e com diversos marcadores biológicos em 95 casos de carcinoma ductal infiltrativo organizados em um microarranjo tissular (TMA). Realizamos determinações imunoistoquímicas de CD44, CD24, citoqueratinas (CK5, CK6, CK18), claudina 7 e Ki67. Subgrupos moleculares foram definidos pela expressão imunoistoquímica de RE, RP e HER2. **Resultados:** Os tumores apresentaram uma maior frequência dos grupos luminais (49,5%) atribuído à alta expressão de RP ou RE (47,4%), e frequência menor de tumores triplo negativos (21,5%) e HER2 (9,5%). Os fenótipos CD44⁺CD24⁻ e CD44⁻/CD24⁺ estavam respectivamente presentes em 8,4% e 16,8% dos tumores e o fenótipo duplamente positivo foi predominante (45,3%). Ausência de ambas as proteínas foi evidente em 6,3% dos tumores. Tumores com fenótipo CD44⁺CD24⁻ (definido como um marcador de células tronco tumorais por estudos *in vitro*) foram mais comuns em tumores triplos negativos mas não demonstraram nenhum tipo de associação com características clínico-patológicas e demais marcadores. Este fenótipo não foi expresso nos tumores HER2 positivos. O fenótipo duplamente positivo CD44⁺CD24⁺ mostrou-se mais freqüente nos subtipos luminais ou com alta expressão de HER2. Os fenótipos (CD44⁻CD24⁺ e CD44⁻CD24⁻) não mostraram associação com os subgrupos. Tumores expressando CD24⁺ isolado, com grande frequência deste marcador (74,7%), mostraram significativa associação com positividade do RE, RP e Ki67 e uma significância marginal com marcadores de diferenciação luminal (CK18 e claudina 7, p = 0,14). Nenhuma associação foi observada com tumores CD44⁺ quando analisado isoladamente. A expressão de claudina 7 e Ki67 não mostrou associação com os subgrupos e a expressão de CK5 apresentou uma tendência a uma maior negatividade nos subtipos luminais e uma frequência maior de positividade nos tumores HER2 e triplo negativos. De outro lado, associação da frequência da expressão positiva de CK18 nos subgrupos luminais foi estatisticamente significativa (p = 0,003). Para se determinar se CD24⁺ e CD44⁺ e seus subtipos combinados

poderiam afetar a sobrevida global e o intervalo livre da doença preparamos curvas de sobrevida de acordo com Kaplan-Meier que foram analisadas estatisticamente (log rank test). A mediana do período de seguimento das pacientes do nosso estudo foi de 4,8 anos (0,36 – 10,9 anos). Estas análises não demonstraram influência dos fenótipos CD44⁺CD24⁻ ou CD44⁺ sobre a sobrevida global ou intervalo livre de doença, mas observamos uma tendência a um prognóstico mais favorável. Interessantemente tumores HER2 positivos não expressaram este fenótipo, sugerindo que outros marcadores de células tronco caracterizam estes tumores. O fenótipo CD44⁻CD24⁺ mostrou-se mais freqüente nos tumores luminais, mas não apresentou correlação com marcadores clínico-patológicos ou biológicos analisados. Não houve diferenças significativas com respeito a sobrevida global ou intervalo livre de doença . A expressão de CD24⁺ isolado associou-se a expressão dos marcadores de diferenciação celular e a uma diminuição do intervalo livre de doença. A sobrevida livre de doença (10 anos) indicou uma percentagem de 94,1% para CD24⁻ e 72,1% para os pacientes CD24⁺ enquanto a sobrevida global foi de 84,2% para os pacientes CD24⁻ e 72,1% para os pacientes CD24⁺. Citoqueratinas (CK5, CK18) e Ki67 não influenciaram a sobrevida e o intervalo livre de doença. No entanto a expressão positiva de claudina 7, embora não associada à sobrevida global, foi estatisticamente associada ao decréscimo do intervalo livre da doença (p = 0,05). **Conclusão:** As características dos tumores CD44⁺CD24⁻ e sua tendência a associação um prognóstico mais favorável parecem não estar de acordo com as propriedades descritas na literatura para células tronco e enfatizam a necessidade de outros marcadores. A determinação da freqüência de CD44⁺ e claudina 7 positiva pode contribuir para a análise do prognóstico em carcinoma de mama.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Células-tronco neoplásicas 3.Subtipos moleculares 4.Marcadores biológicos 5.Fenótipos 6.CD44/CD24 7.Claudina 7 8.CK5 9.CK6 10.CK18 11.Antígeno Ki-67

SUMMARY

Bernardi MA. *CD44 and CD24 expression in ductal invasive breast carcinomas, classified by molecular subtypes and its association with prognostic factors* [dissertation]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo", 2011. 92p.

Background: Breast carcinomas consist phenotypically of diverse cells and exhibit intra tumoral heterogeneity being stratified in several subgroups based in gene expression profiles or histochemical biomarkers. It was suggested that this heterogeneity is derived in part from the transformation of different subsets of cancer stem cells (CSC) in each intrinsic subgroup. The presence of CSC can be evidenced by phenotypic analysis of CD44 e CD24. This study aimed to identify the CD24 and CD44 immunophenotype within invasive ductal breast carcinoma (IDC) subtypes and determine its influence on prognosis as well as its association with the expression of Ki67, citokeratins (CK5, CK6 and CK18) and claudin-7. **Methods:** Immuno expression of CD44 and CD24 alone or in combination was investigated in 95 IDC cases arranged in a tissue microarray (TMA). The association with intrinsic subgroups defined as luminal A (ER⁺, PR⁺, HER2⁻), luminal B (ER and or PR⁺, HER2⁺), HER2 subtype (ER⁻, PR⁻, HER2⁺) and triple negative (ER⁻, PR⁻, HER2⁻), and the other markers and prognosis was analyzed. **Results:** CD44⁺CD24⁻ and CD44⁻CD24⁺ were respectively presents in 8.4% and 16.8% of the tumors, a lack of both proteins was detected in 6.3%, while CD44⁺CD24⁺ was determined in 45.3% of the tumors. Although there was no significant correlation between subgroups and different phenotypes, the CD44⁺CD24⁻ phenotype was more common in the basal subgroups but the frequency of this subtype has not been associated with clinical characteristic or biological markers. The phenotype was absent in HER2 tumors whereas luminal tumors are enriched in CD44⁻CD24⁺ and CD44⁺CD24⁺ cells which did not show associations with clinical/biological markers features. There was also no significant association of the subtypes with the event free (DFS) and overall survival (OS) but the CD44⁺CD24⁻ phenotype showed a more favorable prognostic as compared to CD44⁻CD44⁺ phenotype that showed a worse prognosis (p = 0.26) (median follow up, 4.8 years) CD44⁺ alone was evident in 57.9%, while CD24⁺ was positive in 74.7% of the tumors, the latter showing a significant association with ER, PR and Ki67 and a marginal association with CK18 and claudin-7. Expression of claudin-7 and Ki67 did not associate with the cancer subgroups, while a positive association between CK18 and the luminal subgroups was found. CD44⁺ was not significantly associated with OS (p = 0.684) and DFS (p = 0.386) whereas CD24⁺ expression was also no significantly associated with OS (p = 0.32) but was associated with a decrease in DFS (p = 0.07). CK5, CK18 and Ki67 expression had no influence in OS or DFS, however claudin-7 positive although not statistically associated with OS, was associated with reduced DFS (p = 0.05). **Conclusions:** The heterogeneity of cells with several CD44CD24 expression may indicate the presence of different stem cell populations. Occurrence of CD44⁺CD24⁻ phenotype is more common in triple negative tumors and lower in tumors of luminal type and absent in HER2 tumors. Although not associated significantly with patho-biological markers or

OS and DFS, the CD44⁺CD24⁻ phenotype has a tendency to be a favorable prognostic marker in breast cancer raising the possibility that the putative tumorigenic ability may not be restricted to cells of this phenotype. The presence of CD44⁻CD24⁺ may indicate a worse prognosis. CD24⁺ was associated with ER, PR, Ki67 and showed a marginal association with CK18 and claudin-7. CD24 and Claudin-7 positivity were the only biological markers associated with reduced DFS. These two investigated markers can be used to improve the assessment of prognosis in breast cancer.

Descriptors: 1.Breast Neoplasms 2.Neoplastic Stem Cells 3.Molecular Subtype 4.Biologic Markers 5.Phenotypes 6.CD44/CD24 7.Claudin 7 8.CK5 9.CK6 10.CK18 11. Ki-67 Antigen

1 INTRODUÇÃO

A incidência do câncer de mama tem aumentado nas últimas décadas e parece estar intimamente relacionada ao processo de urbanização da sociedade, como mudanças nos hábitos alimentares e sociais que ocorrem nos grandes centros. (www.inca.gov.br/estimativa/2010).

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres (veja em ANEXOS - Anexo 1). A cada ano, cerca de 22% dos casos novos de câncer em mulheres são de mama. (www.inca.gov.br/estimativa/2010).

No Brasil, as estimativas para o ano de 2011 são de 489.270 casos novos de câncer. Em 2010 eram esperados 236.240 casos novos de câncer para o sexo masculino e 253.030 para o sexo feminino. O câncer de mama incide como o mais frequente no sexo feminino (49 mil casos novos) e acompanha o mesmo perfil de magnitude da América Latina (49.240 casos), com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres (veja em ANEXOS - Anexo 2). (www.inca.gov.br/estimativa/2010).

Esta neoplasia liga-se a fatores etiológicos múltiplos que ainda não são totalmente conhecidos. Entre os fatores de risco conhecidos desta entidade podemos citar as categorias: idade, história familiar de câncer de mama, fatores hormonais, doenças proliferativas da mama, irradiação da região mamária na infância, história pessoal de câncer e fatores relacionados aos hábitos de vida (Hunt et al., 2008).

A idade permanece como um dos mais importantes fatores de risco. Segundo a American Cancer Society (Surveillance Research, 2005), aos 30 anos a probabilidade de desenvolvimento de câncer de mama nos próximos 10 anos é de 0,44% e aos 70 anos é de 4,14%.

Existem fatores de risco relacionados à vida reprodutiva da mulher (menarca precoce, nuliparidade, idade da primeira gestação a termo acima dos 30 anos, anticoncepcionais orais, menopausa tardia e terapia de reposição hormonal) bem estabelecidos em relação ao desenvolvimento do câncer de mama (Hardy et al., 1993).

O diagnóstico precoce, rastreamento mamográfico, as políticas de saúde, a melhora da tecnologia e acurácia dos exames subsidiários e compreensão da biologia molecular e da carcinogênese dos tumores, assim como uso de novas terapias medicamentosas, estão relacionados a melhora na sobrevida e tempo livre de doença no câncer de mama. (www.inca.gov.br/estimativa/2010).

Carcinomas mamários são conhecidos há muitos anos pela sua heterogeneidade histopatológica que levou a uma classificação em inúmeros tipos histológicos. Entre os diferentes tipos de neoplasias malignas que surgem na glândula mamária, o carcinoma ductal invasivo compreende a grande maioria dos casos (92%), segundo Tavassoli et al., 2003.

Esta categoria de neoplasia maligna exibe grande heterogeneidade celular, que foi comprovada a partir da descoberta nos anos 60 – 70 da existência dos receptores hormonais nucleares, verificando-se que os receptores de estrógeno estavam presentes em até 70% dos casos (Fisher

et al., 1983, Nadji et al., 2005), e a presença destes receptores estava fortemente relacionada ao tamanho do tumor e grau histológico. Num estudo de quase 6.000 tumores, praticamente todos os tumores grau I histológicos, eram receptores de estrógeno positivos, como são os tubulares puros, colóides e carcinomas lobulares clássicos. (Nadji et al., 2005).

A expressão do receptor de progesterona (RP), uma proteína induzida por estrogênio, via receptor de estrógeno (RE), é geralmente relatada juntamente com a expressão de RE, e a determinação imunoistoquímica da expressão de RP foi validada, demonstrando que o status do RP está associado com a sobrevida livre de doença e a sobrevida global (Bardou et al., 2003).

Atualmente os receptores hormonais são considerados marcadores prognósticos e também preditivos de resposta aos moduladores seletivos dos receptores de estrógeno (SERMs) (Allred et al., 1998, Fitzgibbons et al., 1999).

Durante as últimas duas décadas, outra proteína com papel de receptor, alcançou papel de fator prognóstico. Em pesquisas subseqüentes, observou-se que 25 a 30% dos tumores mamários apresentavam amplificação do oncogene HER2/neu que codifica uma glicoproteína transmembrânica da família de receptores de fatores de crescimento epidérmico (EGFR) e é expressa em baixos níveis numa variedade de células normais, incluindo o epitélio ductal mamário. (Slamon et al., 1989). A determinação do status do HER2 no câncer de mama é importante, a superexpressão do HER2 e/ou a amplificação do gene é um marcador de fator prognóstico de resposta

clínica, em pacientes tanto com linfonodos positivos, quanto negativos. (Slamon et al., 1989, Tandon et al., 1989, Paik et al., 1990, Press et al., 1997).

Desta forma, foram desenvolvidos novos tratamentos com terapias específicas para pacientes que apresentavam expressão do HER2 incluindo uma terapia alvo para o receptor, como por exemplo, o trastuzumab, um anticorpo monoclonal humanizado. (Slamon et al., 1987, Slamon et al., 2001).

Os cânceres humanos são reconhecidos como uma população de células heterogêneas há mais de 100 anos. Esta heterogenidade não reside apenas nos níveis morfológicos e patológicos, mas também nos níveis moleculares e consequentemente na sua evolução clínica.

Além das características histopatológicas, da presença dos receptores hormonais e a expressão do HER2, o surgimento de técnicas de avaliação molecular dos tumores (microarray) identificou tumores com perfis distintos de expressão gênica fornecendo uma evidência direta de que carcinoma de mama é uma doença heterogênea ao nível molecular (Perou et al., 2000). Sorlie et al., (2001) descreveram 05 subtipos de câncer de mama, dividindo-os em receptores de estrógeno positivos: luminal A e luminal B, e em estrógeno negativos (basal-like, HER2⁺RE⁻, e não-classificados).

A classificação gênica originou uma classificação imunoistoquímica de tumores em subtipos similares substituindo aqueles baseados em perfis gênicos na prática clínica (Nielsen et al., 2004, Carey et al., 2006). Verificou-se também que alguns tipos histológicos possuem perfis moleculares distintos (Weigelt et al., 2008, Weigelt et al., 2009).

A classificação dos subtipos moleculares ficou assim definida:

1. **Luminal A** (RE⁺ e/ou RP⁺, proliferação baixa e HER2⁻),
2. **Luminal B** (RE⁺ e/ou RP⁺, proliferação alta ou HER2⁺),
3. **Basal-like** (RE⁻, RP⁻, HER2⁻, citoqueratina 5/6 ⁺, e/ou HER1⁺),
4. **HER2⁺RE-** (RE⁻, RP⁻, HER2⁺), e
5. **Não classificados** (negativo para os 05 marcadores).

Portanto, avaliamos hoje, além dos receptores de estrógeno, progesterona, expressão do HER2 (cerbB2) da nossa rotina, outros fatores que permitem a subclassificação dos tumores de mama, os quais podem ser indicadores dos tipos de tratamento, prognóstico e sobrevida.

Os tumores classificados como Luminal A (RE⁺ e/ou RP⁺, proliferação baixa e HER2⁻) tem melhor resposta a endocrinoterapia e apresentam-se como tumores geralmente de baixo grau histológico, poucas mitoses, baixo índice de proliferação celular, e em contrapartida, os tumores classificados como Luminal B (RE⁺ e/ou RP⁺, proliferação alta ou HER2⁺), a alta proliferação celular é avaliada pela co-expressão do gene MKi67 (que codifica o Ki67), tem melhor resposta ao tratamento quimioterápico sistêmico (Tan et al., 2005, Cheang et al., 2009).

O Ki67 é um antígeno nuclear que está expresso em células em proliferação, e portanto não é expresso em células quiescentes (fase G0 do ciclo celular). Como indicador prognóstico, é considerado alto quando seus níveis são superiores a 14 - 20%, a sua superexpressão foi relacionada à atividade mitótica aumentada, indiferenciação celular e maior tendência a invasão. (Cheang et al., 2009).

Sendo assim, o subtipo Luminal A responde melhor ao tratamento hormonioterápico e o Luminal B melhor a quimioterapia associada a hormonioterapia. (Sorlie et al., 2003).

Os marcadores imunoistoquímicos para EGFR e CK 5/6 apresentam-se positivos nos carcinomas ductais do subtipo molecular basal-like o que os diferencia dos triplos negativos não-basalóides (Nielsen et al., 2004). Considerados inicialmente como sinônimos dos tumores triplo negativos (RE⁻, RP⁻ e HER2⁻) os tumores basais, compreendem 80% daquela categoria (Bertucci et al., 2008). Embora os tumores basalóides expressem proteínas características de células mioepiteliais, como o p63 e calponina, ainda não temos compreensão clara, de qual conduta tomar frente a um tumor que se apresenta com perfil imunoistoquímico triplo negativo (RE⁻, RP⁻, HER2⁻), pois uma terapia alvo específica ainda não foi definida (Nielsen et al., 2004).

Na classificação molecular dos carcinomas ductais invasivos, os *basal-like* (RE⁻, RP⁻, HER2⁻, CK5/6⁺) compreendem 15% do total dos casos e são o grupo de pior prognóstico (Cheang et al., 2008). Este subtipo é mais prevalente em mulheres na pré-menopausa, mulheres mais jovens e que estão relacionados a piores resultados terapêuticos (Livasy et al., 2006, Cheang et al., 2008, Rodriguez-Pinilla et al., 2006). Entre estas há uma tendência do acometimento mais precoce, assim como um pior prognóstico e menor sobrevida livre de doença (Rakha et al., 2007).

Além dos subtipos clássicos um novo subtipo, referido como apresentando baixa expressão de claudinas (claudin low) foi identificado

entre os grupamentos negativos (Herschkowitz et al., 2007) e caracterizado pela baixa expressão de claudinas 3, 4 e 7.

Tumores com baixa expressão de claudinas caracterizam-se pela ausência de expressão de marcadores de diferenciação luminal, enriquecimento de marcadores da transição epitélio-mesenquima e expressão de genes de resposta imune. A maioria dos tumores “claudin low” se caracteriza por ser triplo negativo, com grande freqüência de diferenciação metaplásica e medular (Prat et al., 2010, Lim et al., 2010, Perou et al., 2010).

As claudinas são uma família de proteínas transmembrânicas (24 membros das claudinas humanas) que tem a função de manutenção das junções epiteliais (tight junctions) e endoteliais, manutenção do citoesqueleto e da adesão célula-a-célula. Uma associação entre junções epiteliais e desenvolvimento do câncer foi estabelecida. As alterações na estrutura e função destas proteínas foi descrita em adenocarcinomas de vários órgãos incluindo carcinoma de mama (revisto por Myal et al., 2010). A maioria dos estudos recentes com as claudinas, está focada nas claudinas 1, 3, 4, 7 e 10. As claudinas podem estar aumentadas ou diminuídas, por exemplo, a expressão de claudina 7 está diminuída nos cânceres de mama e de cabeça e pescoço, mas aumentada no câncer gástrico. Já as claudinas 3 e 4 estão superexpressas nos cânceres primários e metastáticos da próstata, mama, pâncreas e ovário. Baseados no papel das claudinas na formação das moléculas juncionais, “tight junctions”, tem-se aventado a hipótese de que a perda da expressão das claudinas pode reduzir a adesão celular e

consequentemente, aumentar o potencial de invasão e motilidade das células tumorais, associando claudinas ao processo de transição epitélio mesenquima (EMT) (Hennessy et al., 2009).

As claudinas podem ser usadas como marcadores de diferenciação epitelial. A perda das claudinas deve contribuir para a progressão, e sua expressão deve ter relevância prognóstica. De acordo com recentes estudos, a perda ou diminuição da expressão da claudina 1, correlaciona-se com uma menor sobrevida livre de doença e aumento do potencial de malignidade no câncer de mama. A expressão da proteína claudina 2 está diminuída nos tumores assim como no tecido mamário normal, a perda da expressão de claudina 4 está presente nas áreas de metaplasia apócrina e na maioria dos carcinomas mamários invasivos há aumento da sua expressão. A claudina 7, já é expressa no epitélio mamário normal, e sua expressão reduzida correlaciona-se com mais alto grau de tumor, doença metastática, incluindo recorrências locorregionais. (revisto em Szasz et al., 2011).

A manutenção da heterogeneidade das células dentro do tumor não está completamente esclarecida. Pelo menos duas hipóteses foram propostas para explicar os caminhos evolutivos e extrema heterogeneidade destes cânceres:

- a) a hipótese de evolução clonal, e
- b) a hipótese de células tronco cancerígenas (CSC).

A hipótese de evolução clonal sugere que a maioria das células pode proliferar extensivamente e aquelas que apresentam alterações genéticas e epigenéticas com características mais favoráveis para a progressão tumoral são selecionadas (Nowel et al., 1976). A heterogeneidade tumoral viria da competição e da seleção de células com fenótipos diferentes sob várias condições encontradas pelas células durante o desenvolvimento do câncer. (Reya et al., 2001).

A hipótese de CSC sugere que uma pequena população de células tumorais, tem a capacidade de auto-regeneração e de diferenciação, podendo iniciar e manter o desenvolvimento do câncer e até mesmo a resistência ao tratamento quimioterápico e radioterápico. Estas células apresentam algumas características de células tronco do tecido adulto normal e são chamadas de células tronco tumorais. Células tronco normais são classicamente definidas pela sua capacidade de auto-regeneração de gerar células filhas que se diferenciam em diferentes linhagens formando todos os tipos de células encontradas no tecido. Elas possuem 02 grandes características: a auto-renovação, e a diferenciação em múltiplas linhagens celulares. A auto-renovação consiste na formação de uma célula idêntica a primeira. (Smalley e Ashworth, 2003) e ocorre de maneira simétrica ou assimétrica. Como o nome já diz, a auto-renovação simétrica produz 02 células filhas idênticas à célula progenitora, ou seja, 02 células-tronco. Já na auto-renovação assimétrica, 01 célula produzida é idêntica à progenitora e outra sofre diferenciação, para se tornar uma célula “progenitora comprometida” com um determinado perfil de diferenciação. A

célula idêntica à “stem cell” mantém o compartimento de células tronco, a célula diferente sofre uma série de divisões e passos de diferenciação gerando uma população diferenciada. As células intermediárias entre a célula tronco e as terminalmente diferenciadas são chamadas de progenitoras. Para manter a homeostase tissular, o número de células filhas que mantém a identidade de células tronco deve ser estritamente controlado. Evidências recentes sugerem que um microambiente especializado é um dos fatores que regulam a manutenção da célula tronco normal controlando a escolha entre auto-renovação e iniciação da diferenciação (Spradling et al., 2001).

O conceito de que cânceres apresentam uma sub-população de células semelhantes a células tronco normais foi proposta vários anos atrás. O crescimento expansivo de lesões malignas, assim como a resposta patológica inadequada ao tratamento quimioterápico, poderiam indicar a presença de células progenitoras ou “stem cells” do tumor, com propriedades de proliferação específica (Hamburger e Salmon, 1977). Sugeriu-se que as células tronco tumorais poderiam surgir de duas maneiras: 1. mutações oncogênicas das células tronco normais, alterando mecanismos que restringem a expansão destas células, 2. mutações oncogênicas permitindo que células progenitoras continuem proliferando sem entrar em um estado pós mitótico diferenciado (Marusyk e Polyak, 2010). A heterogeneidade do câncer é devido aos vários caminhos que as células progenitoras tem, levando a diferenciação aberrante. (Reya et al., 2001).

1.1 Células tronco epiteliais mamárias

A glândula mamária é derivada do ectoderma e é resultado da proliferação de células basais da epiderme pela estimulação dos fatores secretados pelas células mesenquimais presentes no broto mamário. O desenvolvimento da glândula mamária acontece após o nascimento e é completado somente na vida adulta após as suas fases de desenvolvimento (diferenciação celular como na gravidez, lactação e involução) em resposta a alterações hormonais (Cowin et al., 2010).

A glândula mamária madura é uma glândula que se ramifica em túbulos e alvéolos (parênquima) que estão entremeados a um tecido conectivo heterogêneo (mesenquima ou estroma). Nas mulheres adultas, mais de 90% do parênquima mamário é composto de 02 tipos de células epiteliais diferenciadas:

- a) células epiteliais secretoras luminais, que revestem os ductos e alvéolos, e
- b) células mioepiteliais contráteis, situadas entre as células luminais e a membrana basal a qual separa o parênquima mamária do estroma (Polyak et al., 2010).

Os ductos mamários normais apresentam pelo menos 02 tipos de células epiteliais: células luminais (tecido glandular) e células mioepiteliais basais. O estroma intralobular consiste de tecido conjuntivo com uma zona de fibroblastos cercando os componentes epiteliais (Figura 1) (Polyak et al., 2010).

The Microenvironment of the Breast

Fonte: Cold Spring Harb Perspect Biol, 2010, 2: a003244

Figura 1 - Visão esquemática de um ducto e lóbulo mamário normal

As células mioepiteliais e luminais podem ser distinguidas por seus padrões distintos de expressão de citoqueratinas. Células mioepiteliais expressam citoqueratina 5/6 (com alto peso molecular) e citoqueratina 17, enquanto células luminais expressam tipicamente citoqueratinas 8 e 18. (com baixo peso molecular) (Sorlie et al., 2003, Livasy et al., 2006)

Na glândula mamária normal, a maioria das células epiteliais luminais não está em contato direto com a membrana basal, mas dispoem-se sobre as células mioepiteliais, sendo estas as células que influenciam na diferenciação, polaridade, proliferação, invasão e migração das células epiteliais luminais. As células mioepiteliais também produzem a membrana basal que é uma barreira física separando os compartimentos epiteliais e estromais.

Ao contrário de outros tecidos que preservam a sua arquitetura através da vida adulta, a glândula mamária sofre mudanças em sua morfologia durante diferentes períodos de desenvolvimento. Na puberdade através da regulação hormonal sistêmica e pelos sinais estromais locais, as 02 populações de células epiteliais sofrem constante proliferação, diferenciação e apoptose. Ao atingir a diferenciação final, estas células perdem a capacidade de proliferação. Durante a gravidez hormônios induzem a expansão do epitélio mamário e o seu remodelamento após o desmame bem como ciclos repetitivos de gravidez são altamente sugestivos da existência de células de “reabastecimento” (stem cells) (Smalley e Ashworth, 2003). Recentemente verificou-se que o “pool” de células tronco aumenta 14 vezes durante a fase luteal enfatizando o papel da progesterona na ativação de células tronco durante o ciclo reprodutivo (Joshi et al., 2010).

Os recentes avanços técnicos no isolamento e na caracterização de células-tronco normais e cancerosas mamárias aumentaram nosso entendimento de como estas células funcionam, sua fisiologia e suas condições patológicas.

A primeira evidência de que existiam células-tronco mamárias data de 1959, quando Deome et al., demonstraram através de transplantes de diferentes regiões da glândula mamária de um camundongo doador que estas eram capazes de gerar no coxim gorduroso (fat pad) de um camundongo receptor brotos mamários com diferenciação celular funcional, contendo ductos, alvéolos e células mioepiteliais. (Deome et al., 1959). Este modelo ainda hoje é o padrão ouro para testar a capacidade da célula-tronco/progenitora.

Várias técnicas com o passar do tempo tem sido utilizadas para isolar e identificar células tronco mamárias utilizando as propriedades biológicas destas células. Por exemplo, as células tronco são fundamentalmente quiescentes e retêm a bromodeoxiuridina e timidina por mais tempo (revisto por Cariatti e Purushotman, 2008)

Um sistema de análise de antígenos de superfície para identificar diferentes populações celulares tem sido empregado no campo de pesquisa de células tronco. Foram escolhidas combinações de marcadores (positivos e negativos), incluindo o CD24, uma molécula ligante de um receptor de adesão, a p-selectina expresso na superfície apical de células luminiais negativo e o CD49f (integrina $\alpha 6$) e CD29 (integrina $\beta 1$), os quais são marcadores de células epiteliais basais (Stingl et al., 2006).

Fonte: Nature Medicine, volume 15, número 8, Agosto 2009.

Figura 2 - Demonstração da diferenciação da célula tronco

Os estudos de Al-Hajj e colaboradores (2004) demonstraram algumas evidências de células “stem cells” dentro do carcinoma mamário humano que podem ser identificadas pela presença ou ausência de dois marcadores de superfície (membrana): CD24 e CD44 e presença do antígeno epitelial específico (ESA⁺), e ausência de marcadores específicos de linhagem (LIN⁻). O CD44 (receptor do ácido hialurônico) é codificado por um único gene localizado no cromossoma 11p13 e expresso de uma forma padrão-standard (CD44s) e várias variantes (CD44v) geradas por “splicing alternativo” do mRNA do CD44 (Afify et al., 2009). Outros marcadores comumente utilizados na caracterização de células-tronco incluem o antígeno do

músculo liso, antígeno comum da leucemia linfoblástica aguda, p63, vimentina, citoqueratinas CK14, CD133, MUC1 e ErbB2 (Stingl et al., 2005). Posteriormente, marcadores adicionais incluindo a desidrogenase aldeídica (ALDH) (Ginestier et al., 2007), o CD133 (Wright et al., 2008) e a integrina $\alpha 6$ (ITGA6), foram propostos como marcadores das células tronco mamárias.

Recentemente demonstrou-se que células tronco $CD44^+CD24^-$ exibem fenótipos similares a células que sofreram uma transição epitélio-mesenquima (EMT) e expressam os fatores de transcrição regulatórios de EMT (Mani et al., 2008). EMT é caracterizada pelo aumento da expressão de vimentina e dos fatores transcrpcionais (Snail e Twist-1) que diminuem a expressão da E-caderina e de outras moléculas de adesão. Twist transcrionalmente decresce a expressão de CD24 em células de câncer de mama aumentando a expressão do fenótipo $CD44^+/CD24^-$. A perda de CD24 e o aumento de CD44 podem promover metástase (Vesuna et al., 2009, Sheridan et al., 2006) Sugeriu-se que stem cells $CD44^+CD24^-$, tem uma baixa expressão de claudinas (3,4 e 7). (Tauber et al., 2010).

Células tumorigênicas de câncer de mama com perfil de células tronco e com marcadores específicos exibem perfis genéticos específicos, sugestivos de uma associação com prognóstico adverso. Shipitsin et al., em 2007, mostraram que células $CD24^+$ são mais diferenciadas e as $CD44^+$ têm características de células progenitoras. Subpopulações de $CD44^+CD24^-$ parecem estar associadas ao período mais curto de sobrevida livre de doença e sobrevida global (Shipitsin et al., 2007) ou ao maior índice de

metástases a distância (Abraham et al., 2005, Glinsky et al., 2005, Cariatti e Purushotham, 2008, Giatromanolaki et al., 2010) e expressão elevada de genes envolvidos com invasão (Sheridan et al., 2006).

Uma questão fundamental que precisa ser esclarecida é se os diferentes subtipos de câncer de mama são derivados de diferentes linhagens. Células tronco/progenitoras distintas em cada subtipo poderiam explicar porque há diferenças em relação à invasão, prognóstico, sobrevida e resposta ao tratamento.

Os estudos de Dontu e colaboradores (Dontu et al., 2003) baseando-se no conceito de células tronco propuseram um modelo no qual a transformação de diferentes subconjuntos de células tronco/progenitoras resultariam nos diferentes fenótipos de câncer da mama (RE positivos e negativos, RP positivos e negativos).

Honeth et al., em 2008 demonstraram uma associação entre a presença de CD44⁺/CD24⁻ e o subtipo basalóide. No entanto, uma considerável heterogeneidade na frequência de expressão de CD44 e CD24 foi observada entre os tumores (Abraham et al., 2005, Mylona et al., 2008). A análise de vários marcadores de stem cells em células em cultura e amostras de carcinoma de mama sugeriu que várias diferentes linhagens celulares podem diferir em seus perfis de marcadores de células tronco/progenitoras (Hwang-Verlues et al., 2009). Park et al., (2010) reportaram uma grande diversidade na expressão de vários marcadores incluindo claudina 7 nos diferentes subgrupos clássicos.

Um novo subtipo de carcinoma de mama receptor-negativo foi caracterizado pela perda de genes de adesão e denominado “claudin low”. Verificou-se que carcinomas metaplásicos (MBC) que são agressivos e quimioresistentes, têm um perfil genômico semelhante aos tumores “claudin low” sugerindo que tumores subgrupo “claudin low” devem advir de um precursor mais primitivo, sendo enriquecidos com EMT e apresentando características de células tronco. Pacientes com tumores com baixa expressão de claudinas tem pobre prognóstico similar aos pacientes com tumores basais ou expressão de HER2. (figura 2) ((Hennessy et al., 2009, Perou et al., 2010).

Considerando a importância das células tronco em câncer de mama, esforços são necessários para melhor identificação dos imunofenótipos das células tumorais importantes em progressão, recorrência e metástase.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo geral do presente projeto é avaliar em carcinomas ductais invasivos de um grupo de pacientes tratadas no Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho no período de 2001 a 2007 a expressão imunoistoquímica de CD24, CD44, CK5, CK6, CK18, Ki67 e claudina 7 e correlacioná-las com subgrupos moleculares definidos pela presença ou ausência de marcadores imunoistoquímicos: RE, RP e Her2.

A expressão destes marcadores foi relacionada aos parâmetros clássicos clínico-patológicos e prognósticos, incluindo recorrência e sobrevida das pacientes.

2.2 Objetivos Específicos

- 1) Definir subtipos moleculares através dos receptores de estrógeno, progesterona e HER2 através do método de imunoistoquímica.
- 2) Identificar a expressão de CD44 e CD24 isoladamente bem como os demais fenótipos da combinação de CD44 e CD24 e sua relação com os subtipos definidos no item 1.

-
- 3) Correlacionar estes fenótipos com as variáveis patológicas prognósticas (tamanho tumoral, grau histológico e nuclear, linfonodos acometidos) e com os demais marcadores biológicos.
 - 4) Associar a expressão de CD44 e CD 24 isoladamente com a frequência de positividade de CK5, CK6, CK18, Ki67 e claudina 7 e variáveis clínico-patológicas.
 - 5) Avaliar neste grupo de pacientes a relação da frequência dos fenótipos combinados de CD44 e CD24, ou isolados, e o prognóstico (metástase e sobrevida) e tempo livre de doença.

3 MÉTODOS

Este é um estudo retrospectivo que incluiu a avaliação dos prontuários de 109 casos de pacientes femininas portadoras de carcinoma ductal invasivo, diagnosticados e tratados exclusivamente no Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho no período de 2001 a 2007.

Todos os casos foram tratados e acompanhados nesta instituição com cirurgia, radioterapia, quimioterapia e hormonioterapia conforme exame imunoistoquímico e protocolo vigente para avaliação dos marcadores de estrógeno, progesterona e cerbB2.

Em consulta inicial, estas mulheres foram examinadas para a avaliação do estadiamento inicial e planejamento terapêutico.

A avaliação linfonodal axilar homo e contralateral, assim como avaliação de possíveis locais de metástases supra-claviculares ou à distância com exames subsidiários como raio-x de tórax para estadiamentos iniciais (I e II), tomografia computadorizada de tórax para estadiamentos mais avançados (III e IV) e ultrassonografia abdominal e exames para avaliação da função hepática, também foram realizados para melhor avaliação do estadiamento inicial. (TNM, UICC, 2002). (www.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf)

Após o estadiamento inicial da doença, as pacientes foram submetidas a tratamento cirúrgico (quadrantectomia e linfadenectomia axilar, ou mastectomia radical modificada segundo técnica de Patey) e, em alguns casos isolados apenas a biópsia diagnóstica onde o comprometimento tumoral (estadiamento III ou IV) ou clínico foi impeditivo para o tratamento cirúrgico em primeira

instância. Consequentemente, o tratamento adjuvante (quimioterápico, radioterápico e hormonioterápico) foi instalado e monitorizado.

Após o término da terapêutica primária, as pacientes foram seguidas trimestralmente até completarem um ano de acompanhamento, com exame físico minucioso para avaliação de recidivas locorregionais, e conseqüentemente, semestralmente até completarem 05 anos de seguimento com exames clínicos semestrais, laboratoriais, imagenológicos (raio-X de tórax e mamografias) e marcadores tumorais solicitados anualmente.

3.1 Critérios de inclusão

Os critérios de inclusão deste estudo foram pacientes do sexo feminino independente da raça, portadoras de tumores de mama diagnosticados como “Carcinoma Ductal Invasivo”, sem história prévia de outros tumores, ausência de qualquer tratamento relacionado a esta patologia, e com material emblocado adequado e disponível para análise imunoistoquímica.

3.2 Critérios de exclusão

Os critérios de exclusão foram a ausência de dados anatomo-clínicos, impossibilidade de obtenção de amostras da neoplasia emblocadas em parafina ou co-morbididades que interferissem na evolução da doença (hipertensão arterial sistêmica, diabetes).

Foram ainda excluídos da análise estatística, as pacientes que apresentaram novos tumores no decorrer de seu acompanhamento (12 pacientes) para cálculo da sobrevida livre de doença, somente calculado a sobrevida global (Total = 97 pacientes).

Para os casos onde houve perda do seguimento, considerou-se para cálculo de sobrevida global, a última consulta.

As pacientes que já apresentavam metástases no diagnóstico inicial e confirmado (02 pacientes) foram retiradas da análise estatística. (Total = 95 pacientes).

3.3 Critérios de avaliação da amostra

Os prontuários foram avaliados para obtenção de dados referentes as variáveis: idade, tamanho do tumor, estadiamento clínico (TNM – UICC, 2002), grau histológico do tumor (SBR, 1989), comprometimento linfonodal axilar, presença de metástases a distância, tratamentos realizados (quadrantectomia ou mastectomia, quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) e evolução clínica, obedecendo os protocolos vigentes. Avaliou-se também a sobrevida livre de doença e a sobrevida global.

Amostras do tumor previamente fixadas em formalina e incluídas em bloco de parafina foram revisados por 02 patologistas colaboradores deste trabalho para avaliação da concordância dos laudos e em casos de discordância, após avaliação, houve consenso entre eles.

O protocolo desta pesquisa foi apresentado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, tendo recebido parecer de APROVAÇÃO em 30/04/2008, com registro no CEP: 173/08. Todas as reações imunoistoquímicas foram desenvolvidas no Departamento de Patologia do Hospital A.C.Camargo.

3.4 Método anatomopatológico

O tumor e a peça cirúrgica (mama e/ou axila, e/ou músculo) foram encaminhados ao Serviço de Anatomia Patológica (prestadores de serviço), do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho, onde foi fixado em formol a 10% por 8 a 12 horas, submetido, inteiramente, a processamento histológico a frio habitual, com desidratação em álcool etílico e clareamento pelo xilol seguidos de impregnação e inclusão em parafina. Os fragmentos com calcificação e os demais receberam numeração independentes, seqüenciais. Cortes histológicos de 5µ foram corados pela hematoxilina-eosina para diagnóstico histológico das lesões.

Áreas representativas contendo fragmentos do tumor foram identificadas para a montagem do TMA (tissue microarray).

3.5 Construção e análise dos microarranjos teciduais (tissue microarrays - TMAS)

Foi construído um TMA com amostras provenientes dos 95 casos eleitos para o estudo.

A partir do corte original corado por H&E, as áreas de tumor viável foram selecionadas e marcadas com caneta. Estas áreas têm equivalência no bloco de parafina original, identificado como bloco doador. A partir deste ponto, as áreas selecionadas foram transferidas para o bloco receptor através do uso do Tissue Microarrayer (Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, MD, USA). Foram confeccionados os blocos de TMA com cilindros 1,0mm (Figura 3).

Figura 3 - Demonstração de um exemplo de microsséries de tecido e sua construção. As matrizes são montadas tendo suas amostras retiradas com agulha, na parte do tumor mais significativa e re-colocados em um bloco receptor. Desta forma, o tecido de vários exemplares pode ser representado em um único bloco de parafina. Fonte: Yale University - School of Medicine

A partir deste bloco foram preparados cortes histológicos seriados em lâminas de vidro cortadas através de microtômia mecânica na espessura de 4µm, previamente tratadas com película aderente especial (Instrumedics Inc, Hackensack, NJ USA). As lâminas contendo os cortes histológicos foram banhadas em parafina para evitar a oxidação. Para controle da representatividade do material, foram confeccionadas lâminas coradas por H&E nos níveis 1, 25, 50, 75 e 100.

Em seguida as lâminas obtidas foram submetidas à técnica imunoistoquímica para cada marcador. A técnica utilizada seguiu os passos tradicionais e rotineiros do laboratório. Para cada marcador, foi utilizada a melhor técnica de diluição, recuperação antigênica, revelação e cromógeno, determinada para cada anticorpo. Todas as reações foram acompanhadas de um controle positivo, em tecido sabidamente positivo para cada anticorpo testado, e um controle negativo da reação (retirada do anticorpo primário e retirada do complexo secundário).

3.6 Método imunoistoquímico

Dos blocos de TMA foram feitos 20 cortes de 4µ de espessura, em lâmina de vidro preparada com silano (3-aminopropyltriethoxysilane (SIGMA)) para realização de exame imuno-histoquímico. Foram pesquisados os seguintes antígenos (Tabela 1):

TABELA 1 - Anticorpos das reações utilizadas

Anticorpos primários	Clone	Diluição	Fabricante, País
Receptor de estrógeno	SP1	1:400	Neomarkers, Fremont, CA, USA
Receptor de progesterona	PgR636	1:500	Dako, Dinamarca.
HER2	Policlonal	1:2000	Dako, Dinamarca.
Ki67	clone MIB1	1:400	DAKO, Dinamarca
Citoqueratina 5	XM26	1:300	DAKO, Dinamarca
Citoqueratina 6	LHK6B	1:100	DAKO, Dinamarca
Citoqueratina 18	DC 10	1:800	DAKO, Dinamarca
CD 44	DF1485	1:200	Leica, Newcastle
CD 24	SN3	1:50	Neomarkers, Fremont, CA, USA
Claudina 7	Policlonal	1:400	Invitrogen , San Francisco, CA, USA

O material foi desparafinado em xilol quente a 65° por 20 a 30 minutos e em xilol à temperatura ambiente (3 banhos – por 05 minutos), hidratado em 4 banhos, com álcool absoluto, 95% (02 banhos – 03 minutos) e 70% (02 banhos – 03 minutos), depois lavados em água (corrente e destilada). A recuperação antigênica foi feita em alta temperatura (panela a vapor), a 95° por 40 minutos em tampão citrato, com pH 6 por 20 minutos à temperatura ambiente. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com água oxigenada a 3% (7 banhos de 5 minutos), seguida por banho em leite em pó desnatado a 2% por 20 minutos. A lâmina está pronta para receber o anticorpo primário.

Para a incubação dos anticorpos, o anticorpo primário previamente titulado foi diluído em solução de PBS. Pipetou-se o anticorpo diluído sobre os cortes e colocaram-se as lâminas em câmara úmida, incubando-as em

geladeira, 0 – 4°C, por 18-20 horas. As lâminas foram lavadas 3 vezes com PBS (Phosphate buffered saline), por 3 minutos e incubou-se com o anticorpo secundário biotinilado, em câmara úmida a 25°C, por 30 minutos e posteriormente, lavou-se novamente por 3 vezes com PBS, por 3 minutos. Finalmente, incubou-se com complexo avidina conjugada (anticorpo terciário - avidina-biotina - LSAB plus, DAKO, USA, cód K0690) com peroxidase, em câmara úmida a 23°C, por 20 minutos e depois de nova lavagem com PBS (3 banhos de 3 minutos cada), o material é ainda incubado com DAB (3,3 diaminobenzidine, SIGMA, USA cód D-8001), para a revelação. As lâminas foram contracoradas com hematoxilina de Harris, lavadas em água corrente e desidratadas em 3 banhos de álcool (70%, 95% e absoluto) e xilol. Os casos foram posicionados em 03 blocos de TMA, em filas e colunas e identificados pela inserção de amostras de tireóide ou fígado na primeira posição.

As reações imunoistoquímicas realizadas seguiram as orientações dos fabricantes, assim como suas diluições. Com o cuidado em evitar interpretações ambíguas, a leitura das lâminas foi realizada num único dia, e avaliou-se cada caso e em determinados casos onde não haviam materiais viáveis para o estudo, ou por ausência de material (descolamento do tecido durante o preparo do TMA), ou sem célula viável, o caso foi reavaliado com a construção de novo TMA com novas colorações e nova leitura.

O score de Allred et al., (1998) foi utilizado para definir a positividade de RE e RP. Pelo método de Allred, a graduação da expressão de receptores hormonais, avalia 02 parâmetros:

1) **intensidade** da coloração (graduada de 0 a 3), e

2) **percentual** de células positivas:

0= nenhuma célula,

1= $<1/100$,

2= $1/100$ a $1/10$,

3= $1/10$ a $1/3$,

4= $1/3$ a $2/3$ e

5= $>2/3$.

Os escores de cada categoria são somados obtendo-se o escore final, variando de 0 a 8. Dados da literatura demonstraram que valores mais elevados deste escore estão associados a maior taxa de resposta ao tratamento com tamoxifeno.

Consideramos positivos os scores maiores ou iguais a 3 para os receptores ER e PR.

Quanto aos marcadores de membrana como HER2, foi avaliado um score semi-quantitativo e definimos como negativos a marcação de 0 - 1⁺, e como positivas as marcações moderada 2⁺ e marcação intensa 3⁺. (Herceptest).

Para as variáveis CD44, CD24, CK5/6, CK18 e claudina 7, a marcação de 10% ou mais das células neoplásicas foi considerada como positiva. Marcações $\geq 20\%$ foram consideradas positivas para o Ki67.

3.7 Análises estatísticas

Os valores das variáveis categóricas clínico patológicas ou moleculares estudadas foram analisados pelo Teste de qui-quadrado (Fisher ou Pearson). A significância estatística foi considerada com $p < 0,05$. Todas as análises foram realizadas com o auxílio do programa SPSS 15.0.

4 RESULTADOS

4.1 Variáveis clínico-patológicas

O carcinoma ductal invasivo correspondeu a 100% dos casos.

O tempo de história da doença variou de 0,36 a 10,82 anos, com uma média de 4,81 e mediana de 4,77 anos. A mediana do tamanho do tumor, foi de 4,5 cm, variando de 0,4 a 12 cm.

A idade variou de 28 a 88 anos, com mediana de 58 anos.

As variáveis clínico-patológicas estão apresentadas nas tabelas 2 e 3, e figura 4, como se segue.

O Carcinoma Ductal Invasivo em nossa casuística ocorreu em 02 pacientes abaixo dos 30 anos (2,2%), em 14 pacientes, a idade do acometimento tumoral ocorreu entre 30 e 39 anos (14,15%), em 15,16% dos casos encontravam-se nas pacientes entre 40 e 49 anos de idade, 22,23% dos casos encontravam-se nas pacientes entre 50 e 59 anos de idade, 22,23% dos casos encontravam-se nas pacientes entre 60 e 69 anos de idade, 20,21% dos casos encontravam-se nas pacientes com idade igual ou superior a 70 anos.

TABELA 2 - Frequência da idade nas pacientes com Câncer de Mama

Idade	Nº de Pacientes
< 30 anos	2
$30 \geq x < 40$ anos	14
$40 \geq x < 50$ anos	15
$50 \geq x < 60$ anos	22
$60 \geq x < 70$ anos	22
≥ 70 anos	20
Total	95

Figura 4 - Apresentação das porcentagens das pacientes por faixa etária (frequência)

Os resumos dos dados clínico-patológicos das 95 pacientes analisadas encontram-se na tabela 3.

Os estádios patológicos I e II corresponderam a 50,6% dos casos, o estágio patológico III a 47,4% e o estágio patológico inicial IV a 2,1%.

Em relação ao grau nuclear, o grau III foi encontrado em 54,7% dos casos, 42,1% dos casos estavam classificados como grau II, 7,4% dos casos estavam classificados como grau I e para 1,1% das pacientes não havia referência do grau nuclear, sendo então na nossa casuística, o grau III - tumor mais indiferenciado – o mais comum.

Os resultados histopatológicos das peças operatórias demonstraram que os graus nucleares II e III corresponderam a 96,8% dos casos e o comprometimento linfonodal axilar foi: positivo em 60 casos (63,2%), negativos em 33 casos (34,7%) e não avaliados em 02 casos (2,1%). O esvaziamento axilar foi realizado em todas as pacientes.

Em 21 pacientes (22,1%) houve acometimento metastático, e 60 pacientes (63,2%) estavam livres de metástases.

Ao final do nosso trabalho em 24/04/2011, 66 pacientes (69,5%) estavam vivas, 27 pacientes (28,4%) haviam falecido e 02 pacientes foram perdidas para o seguimento (2,1%).

Tabela 3 - Resumo dos dados clínico-patológicos de 95 pacientes com câncer de mama

Parâmetros	Pacientes (%)
<i>Idade (anos)</i>	
Mediana (intervalo)	58 (28 – 88)
<i>Tamanho tumoral (cm)</i>	
Mediana (intervalo)	4,5 (0,4 – 12,0)
<i>Estadiamento patológico inicial</i>	
I	7 (7,4)
II	41 (43,2)
III	45 (47,4)
IV	2 (2,1)
<i>Grau Nuclear</i>	
I	2 (2,1)
II	40 (42,1)
III	52 (54,7)
ND	1 (1,1)
<i>Linfonodo patológico</i>	
Positivo	60 (63,2)
Negativo	33 (34,7)
ND	2 (2,1)
<i>Metástase</i>	
Sim	21 (22,1)
Não	60 (63,2)
ND	14 (14,7)
<i>Condição</i>	
Vivo	66 (69,5)
Morto	27 (28,4)
ND	2 (2,1)

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano, ND: não determinado.

4.2 Variáveis imunoistoquímicas

Na tabela 4, a frequência dos marcadores biológicos foi representada.

Em relação à expressão dos marcadores pela técnica imunoistoquímica, a frequência do receptor de estrógeno (RE) na nossa casuística foi de 47,4% dos casos, e o receptor de progesterona (RP) em 47,4%. O receptor do fator de crescimento epidérmico (HER2) foi superexpresso em 34,7%, semelhante a literatura (30%) e o Ki-67, que é exclusivamente nuclear, estava positivo em 47,4%.

A expressão nuclear de RE e RP e a positividade de HER2 na membrana celular, estão apresentadas nas Figuras 5 (A e B), 6 (A e B) e 7 (A e B).

Tabela 4 – Resumo dos dados imunoistoquímicos de 95 pacientes com câncer de mama

Paramêtros	Pacientes (%)	Paramêtros	Pacientes (%)
Receptor de estrógeno		CD24	
Positivo	45 (47,4)	positivo	71 (74,7)
negativo	35 (36,8)	negativo	19 (20,0)
ND	15 (15,8)	ND	5 (5,3)
Receptor de progesterona		Claudina 7 expressão	
Positivo	45 (47,4)	positivo	37 (38,9)
Negativo	35 (36,8)	negativo	49 (51,6)
ND	15 (15,8)	ND	9 (9,5)
HER2		CK5	
Positivo	33 (34,7)	positivo	17 (17,9)
Negativo	51 (53,7)	negativo	68 (71,6)
ND	11 (11,6)	ND	10 (10,5)
Ki67		CK6	
Positivo	45 (47,4)	positivo	2 (2,1)
Negativo	40 (42,1)	negativo	80 (84,2)
ND	10 (10,5)	ND	13 (13,7)
CD44		CK18	
Positivo	55 (57,9)	positivo	58 (61,1)
Negativo	23 (24,2)	negativo	27 (28,4)
ND	17 (17,9)	ND	10 (10,5)
CD44/CD24		Sub-grupos	
CD44 ⁺ /CD24 ⁺	43 (45,3)	Luminal A	24 (25,3)
CD44 ⁺ /CD24 ⁻	8 (8,4)	Luminal B	23 (24,2)
CD44 ⁻ /CD24 ⁺	16 (16,8)	HER2	9 (9,5)
CD44 ⁻ /CD24 ⁻	6 (6,3)	Triplo Negativo	20 (21,5)
ND	22 (23,2)	ND	19 (20,0)

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano,
 CK: citoqueratina,
 ND: não determinado.

Figura 5A - Fotomicrografia da expressão positiva nuclear de RE (200 x)

Figura 5B - Fotomicrografia da expressão negativa nuclear de RE (200 x)

Figura 6A - Fotomicrografia da expressão positiva nuclear de RP (200 x)

Figura 6B - Fotomicrografia da expressão negativa nuclear de RP (200 x)

Figura 7A - Fotomicrografia da expressão positiva de membrana para HER2 (200 x)

Figura 7B - Fotomicrografia da expressão negativa de membrana para HER2 (200 x)

A positividade nuclear para Ki67 e membrana celular para claudina 7, estão apresentadas na Figura 8 e Figura 9.

A positividade do índice de proliferação celular (Ki67 >20%) apareceu em 47,4% dos casos (45 pacientes) e a positividade de claudina 7, encontrada na membrana celular, foi de 38,9% dos casos (37 pacientes) e em contra-partida, a negatividade de claudina 7 foi maior com 51,6% dos casos (49 pacientes).

Figura 8 - Fotomicrografia da expressão de Ki67 (200x)

Figura 9 – Fotomicrografia da expressão positiva de claudina 7 (200x)

Para as citoqueratinas, a positividade (imunoexpressão da membrana) foi encontrada para CK5 (células basais) somente em 17,9% dos casos, assim como para a CK6 (células basais) a imunoexpressão da membrana foi encontrada em 2,1% dos casos, sendo portanto os maiores valores encontrados para a negatividade tanto para CK5 (71,6%) e CK6 (84,2%) (Figura 10 A e B). Já para a citoqueratina 18 (CK18), a maior frequência dos casos positivos (61,1%) encontraram-se relacionados aos tumores luminais, confirmando que a CK18 é um marcador de células luminais (subgrupos luminal A e B com frequência total de 49,5% na nossa casuística) (tabela 4 e figura 11 (A e B). O CK6 não apresentou devido a alta negatividade.

Figura 10A - Fotomicrografia da expressão positiva de CK5 (200x).

Figura 10B - Fotomicrografia da expressão negativa de CK5 (200x).

Figura 11A - Fotomicrografia da expressão positiva de CK18 (200x)

Figura 11B - Fotomicrografia da expressão negativa de CK18 (200x)

A positividade de membrana para CD44 e predominantemente no citoplasma para CD24, estão apresentadas na figura 12 (A e B) e figura 13, respectivamente.

O CD44 foi expresso na membrana celular sendo freqüente em 55 casos (57,9%). O CD24 foi expresso no citoplasma e apresenta-se positivo em 71 casos (74,7%) (tabela 4).

Em relação aos 4 fenótipos do CD44 e CD24 formados, encontramos a maior freqüência dos casos no fenótipo $CD44^{+}CD24^{+}$ com 43 casos (45,3%), seguidos do fenótipo $CD44^{-}CD24^{+}$ com 16 casos (16,8%), no fenótipo considerado para células progenitoras “stem cells”, a freqüência encontrada foi de 8 casos (8,4%) e para a negatividade de ambos os marcadores, fenótipo $CD44^{-}CD24^{-}$, encontramos 6 casos (6,3%). Casos não classificados ficaram com 23,2% de freqüência (22 casos).

A categorização dos subgrupos de câncer de mama, leva em consideração os mesmos critérios utilizados por Carey et al., (2006). O subtipo triplo negativo foi encontrado em 21,5% (20 casos), o luminal A em 25,3% (24 casos), o luminal B em 24,2% (23 casos), o HER2 superexpresso em 9,5% (9 casos) (tabela 4).

Na tabela 5 as correlações entre CD44 e CD24 isolados e características dos tumores estão apresentadas. O status de CD44 não se correlacionou estatisticamente com nenhuma das variáveis estudadas, apresentando uma associação marginal com grau nuclear III ($p=0,08$) e com tumores HER2⁺ ($p=0,12$). Ao contrário, o CD24 positivo associou-se a presença do receptor de estrógeno positivo ($p = 0,05$), ao receptor de progesterona positivo ($p = 0,02$) e ao Ki67 positivo ($p = 0,01$) e associou-se marginalmente a claudina 7 ($p=0,17$) e CK18 ($p=0,14$).

Tabela 5 – Correlação entre a expressão de CD44 e CD24 com os marcadores moleculares e características clínico patológicas

Paramêtros	CD44			CD24		
	Negativo (%)	Positivo (%)	P	Negativo (%)	Positivo (%)	P
Estadiamento Patológico						
I/II	14 (35,0)	26 (65,0)	0,31	13 (28,3)	33 (71,7)	0,12
III	8 (22,2)	28 (77,8)		6 (14,0)	37 (86,0)	
Grau Nuclear						
I	0 (0)	2 (100,0)	0,08	1 (50,0)	1 (50,0)	0,52
II	14 (41,2)	20 (58,8)		8 (21,6)	29 (78,4)	
III	8 (19,5)	33 (80,5)		9 (18,0)	41 (82,0)	
Linfonodo Patológico						
Positivo	16 (34,0)	31 (66,0)	0,30	13 (22,8)	44 (77,2)	0,79
Negativo	6 (20,7)	23 (79,3)		6 (18,8)	26 (81,3)	
Receptor de estrógeno						
Positivo	11 (26,2)	31 (73,8)	0,79	5 (11,4)	39 (88,6)	0,05
Negativo	9 (31,0)	20 (69,0)		10 (30,3)	23 (69,7)	
Receptor de progesterona						
Positivo	7 (21,9)	25 (78,1)	0,42	2 (6,1)	31 (93,9)	0,02
Negativo	12 (32,4)	25 (67,6)		12 (27,3)	32 (72,7)	
HER2						
Positivo	6 (19,4)	25 (80,6)	0,12	5 (16,7)	25 (83,3)	1,00
Negativo	16 (39,0)	25 (61,0)		10 (19,6)	41 (80,4)	
Ki-67						
Positivo	13 (31,0)	29 (69,0)	1,00	4 (9,3)	39 (90,7)	0,01
Negativo	9 (28,1)	23 (71,9)		13 (33,3)	26 (66,7)	
Claudina 7						
Positivo	6 (18,8)	26 (81,3)	0,12	4 (11,8)	30 (88,2)	0,17
Negativo	15 (35,7)	27 (64,3)		13 (26,5)	36 (73,5)	
CK5						
Positivo	4 (28,6)	10 (71,4)	1,00	2 (12,5)	14 (87,5)	0,51
Negativo	17 (28,8)	42 (71,2)		14 (21,5)	51 (78,5)	
CK6						
Positivo	0 (0)	2 (100,0)	1,00	0 (0)	1 (100,0)	1,00
Negativo	19 (27,9)	49 (72,1)		14 (18,2)	63 (81,8)	
CK18						
Positivo	12 (24,5)	37 (75,5)	0,28	9 (15,8)	48 (84,2)	0,14
Negativo	9 (37,5)	15 (62,5)		8 (32,0)	17 (68,0)	

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano, CK: citokeratina, *P* = significância estatística pelo teste de qui-quadrado, *P*: valores (bi-caudado) menores que 0,05 foram considerados estatisticamente significativo.

Figura 12A - Fotomicrografia da expressão positiva de CD44 (200x)

Figura 12B - Fotomicrografia da expressão negativa de CD44 (200x)

Figura 13 - Fotomicrografia da expressão positiva de CD24 (200x)

A seguir, a frequência dos casos categorizados em 04 fenótipos de acordo com a presença ou ausência de CD44 e CD24 foram relacionados aos subgrupos tumorais (Tabela 6).

A expressão dos fenótipos de CD44 e CD24 combinados variou dentro dos subtipos tumorais, mas sem correlação estatística. Os tumores luminais A, luminal B, HER2 positivo, apresentam uma frequência maior do fenótipo CD44⁺/CD24⁺ quando comparado ao subgrupo triplo negativo. O fenótipo CD44⁺CD24⁺ também foi mais comum no HER2 (85,7%) e o fenótipo CD44⁻CD24⁻ foi pouco frequente em todos os subgrupos. O fenótipo CD44⁺CD24⁻, correspondente às “stem cells”, foi encontrado em um número muito pequeno de tumores e aparentemente está concentrado nos tumores triplo negativos (04 casos, 22,2%) (Tabela 6). A distribuição de tumores CD44⁻CD24⁺ é equitativa e sem significado estatístico.

Tabela 6 – Distribuição dos fenótipos de CD44 e CD24 de acordo com parâmetros imunoistoquímicos e frequência nos subgrupos moleculares.

Paramêtros	CD44 ⁺ CD24 ⁺	CD44 ⁺ CD24 ⁻	CD44 ⁻ CD24 ⁺	CD44 ⁻ CD24 ⁻	P
Luminal A (HER2-/RE ⁺ ou RP ⁺)	12 (57,1)	1 (4,8)	7 (33,3)	1 (4,8)	0,30
Luminal B (HER2 ⁺ /RE ⁺ ou RP ⁺)	14 (70,0)	2 (10,0)	3 (15,0)	1 (5,0)	
HER2 ⁺ /RE ⁻ e RP ⁻	6 (85,7)	0 (0)	0 (0)	1 (14,3)	
Triplo-negativo	7 (38,9)	4 (22,2)	5 (27,8)	2 (11,1)	
Estadiamento Patológico					
I+II	21 (55,3)	4 (10,5)	7 (18,4)	6 (15,8)	0,12
III	22 (64,7)	4 (11,8)	8 (23,5)	0 (0)	
Grau Nuclear					0,08
I	1 (50,0)	1 (50,0)	0 (0)	0 (0)	
II	16 (51,6)	2 (6,5)	8 (25,8)	5 (16,1)	
III	26 (66,7)	5 (12,8)	8 (20,5)	0 (0)	
Linfonodo Patológico					
Positivo	25 (56,8)	4 (9,1)	10 (22,7)	5 (11,4)	0,57
Negativo	18 (64,3)	4 (14,3)	5 (17,9)	1 (3,6)	
Metástases					
Positivo	14 (82,4)	0 (0)	2 (11,8)	1 (5,9)	0,16
Negativo	24 (53,3)	7 (15,6)	10 (22,2)	4 (8,9)	
Ki67					
Positivo	24 (60,0)	3 (7,5)	12 (30,0)	1 (2,5)	0,06
Negativo	17 (54,8)	4 (16,1)	4 (12,9)	5 (16,1)	
Claudina 7					0,5
Positivo	20 (69,0)	3 (10,3)	5 (17,2)	1 (3,4)	
Negativo	22 (52,4)	5 (11,9)	11 (26,2)	4 (9,5)	
CK5					0,98
Positivo	8 (61,5)	1 (7,7)	3 (23,1)	1 (7,7)	
Negativo	34 (60,7)	6 (10,7)	11 (19,6)	5(8,9)	
CK6					0,89
Positivo	1 (100,0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	
Negativo	40 (61,5)	6 (9,2)	14 (21,5)	5 (7,7)	
CK18					0,22
Positivo	32 (66,7)	4 (8,3)	9 (18,8)	3 (6,3)	
Negativo	9 (40,9)	4 (18,2)	6 (27,3)	3 (13,6)	

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano, RE, receptor de estrógeno, RP, receptor de progesterona, CK: citoqueratina, Valores de *P* (bi-caudado) menores que 0,05 foram considerados como significativos

A associação desses fenótipos com a maioria das características clínico-patológicas e marcadores biológicos não foi observada, porém a frequência do Ki67 positiva associou-se marginalmente ao fenótipo CD44⁺ CD24⁺ (p=0,06).

Na tabela 7 estão as possíveis associações entre claudina 7, Ki67 e citoqueratinas com os subgrupos definidos por imunoistoquímica dos tumores. Nenhuma correlação entre a expressão de claudina 7 e Ki67 entre os subtipos foi estabelecida (p=0,22 e p=0,47, respectivamente).

A claudina 7 negativa é mais comum nos tumores triplo negativos.

A CK5 distribuiu-se em todos os subgrupos (luminais, HER2 e triplo negativos), mas somente 31,6% (n=6) dos tumores triplo negativos expressam CK5 positivo, portanto na nossa casuística o número de casos classificados como basais foi muito pequeno. A CK18 mostrou associação com os subtipos luminais e uma maior frequência de CK18 negativa foi encontrada no subtipo triplo negativo (p=0,003) (Tabela 7).

Tabela 7 – Distribuição das proteínas de acordo com os grupos moleculares do carcinoma ductal invasivo de mama

<i>Paramêtros</i>	Luminal A (HER2-/RE ⁺ RP ⁺)	Luminal B (HER2 ⁺ /RE ⁺ ou RP ⁺)	HER2 ⁺ /RE ⁻ e RP ⁻	Triplo negativo	<i>P</i>
<i>Claudina 7</i>					
Positivo	11 (45,8)	14 (60,9)	5 (55,6)	6 (30,0)	0,22
Negativo	13 (54,2)	9 (44,4)	4 (44,4)	14 (70,0)	
<i>KI67</i>					
Positivo	14 (60,9)	15 (65,2)	5 (55,6)	8 (42,1)	0,47
Negativo	9 (39,1)	8 (34,8)	4 (44,4)	11 (57,9)	
<i>CK5</i>					
Positivo	4 (17,4)	2 (8,7)	4 (44,4)	6 (31,6)	0,10
Negativo	19 (82,6)	21 (91,3)	5 (55,6)	13 (68,4)	
<i>CK18</i>					
Positivo	18 (78,3)	20 (87,0)	5 (55,6)	7 (36,8)	0,003
Negativo	5 (21,7)	3 (13,0)	4 (44,4)	12 (63,2)	

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano, RE, receptor de estrógeno, RP, receptor de progesterona, CK: citoqueratina, Valores de *P* (bi-caudado) menores que 0,05 foram considerados como significativos,

Como a frequência positiva da CK6 foi de 2,1% (02 casos), não houve associação com as demais variáveis.

Na nossa casuística houve uma prevalência dos casos nos estadiamentos III patológicos, com maior frequência no subgrupo luminal A com 13 casos (54.2%), porém sem significado estatístico quando comparado com os outros subgrupos. Houve uma tendência maior de acometimento linfonodal nos subgrupos luminal A com 17 casos (73,9%) seguido pelo subgrupo HER2 com 12 casos (66,7%) também sem significado estatístico. Em relação ao desenvolvimento de metástases,

houve prevalência estatística ($p=0,001$) no subgrupo HER2 com 6 casos (85,7%) (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição do estadiamento, linfonodo patológico e metástases de acordo com os grupos moleculares do carcinoma ductal invasivo de mama

<i>Parâmetros</i>	Luminal A (HER2 ⁻ /RE ⁺ RP ⁺)	Luminal B (HER2 ⁺ /RE ⁺ ou RP ⁺)	HER2 ⁺ /RE ⁻ e RP ⁻	Triplo negativo	<i>P</i>
<i>Estadiamento</i>					
I	2 (8,3)	3 (13,0)	1 (11,1)	1 (5,0)	0,96
II	9 (37,5)	10 (43,5)	4 (44,4)	9 (45,0)	
III	13 (54,2)	9 (39,1)	4 (44,4)	9 (45,0)	
IV	0	1 (4,3)	0 (0,0)	1 (5,0)	
<i>Linfonodo Patológico</i>					
Positivo	17 (73,9)	12 (54,5)	12 (66,7)	12 (60,0)	0,58
Negativo	6 (26,1)	10 (43,5)	3 (33,3)	8 (40,0)	
<i>Metástases</i>					
Positivo	8 (36,4)	3 (15,8)	61 (85,7)	2 (11,8)	0,001
Negativo	14 (63,6)	16 (84,2)	1 (14,,3)	15 (88,2)	

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano, RE, receptor de estrógeno, RP, receptor de progesterona, Valores de *P* (bi-caudado) menores que 0,05 foram considerados como significativos.

Na avaliação da claudina 7 com os marcadores biológicos, esta apresentou-se com significado estatístico relevante, quando a sua ausência foi mais frequente com o receptor de progesterona positivo ($p=0,02$) e CK5 positivo ($p=0,03$). A claudina 7 negativa ainda relacionou-se marginalmente com os receptores de HER2 negativos ($p = 0,07$) (Tabela 9).

Tabela 9 – Correlação entre a expressão de claudina 7 e marcadores biológicos e características clínico-patológicas

Características	Expressão de claudina 7		P
	Negativo (%)	Positivo (%)	
Estadiamento patológico			
I/II	23 (57.5)	17 (42.5)	1.00
III/IV			
Grau Nuclear			
I	0 (0)	2 (100.0)	0.21
II	22 (62.9)	13 (37.1)	
III	27 (56.6)	21 (43.8)	
Linfonodos			
Positivo	20 (62.5)	12 (37.5)	0.50
Negativo	28 (53.8)	24 (46.2)	
Metástases			
M1	7 (35.0)	13 (65.9)	0,07
M0	33 (60,0)	22 (40,0)	
Receptor de estrógeno			
Positivo	23 (52.3)	21 (47.7)	0.65
Negativo	20 (58.8)	14 (41.2)	
Receptor de progesterona			
Positivo	29 (65.9)	15 (34.1)	0.02
Negativo	14 (40.0)	21 (60.0)	
HER2			
Positivo	14 (42.4)	19 (57.6)	0.07
Negativo	31 (64.6)	17 (35.4)	
Ki-67			
Positivo	25 (55.6)	20 (44.4)	0.82
Negativo	22 (59.5)	15 (40.5)	
CK5			
Positivo	14 (82.4)	3 (17.6)	0.03
Negativo	32 (50.0)	32 (50.0)	
CK6			
Positivo	1 (50.0)	1 (50.0)	1.00
Negativo	43 (56.6)	33 (43.4)	
CK18			
Positivo	31 (54.4)	26 (45.6)	0.64
Negativo	16 (61.5)	10 (38.5)	

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano, Valores de *P* (bi-caudado) menores que 0,05 foram considerados como significativos.

As curvas de sobrevida global para as pacientes categorizadas como apresentando tumores CD44⁺ não diferiram estatisticamente das com tumores CD44⁻, mas os casos positivos mostraram um tempo maior de sobrevida (média = 07 anos) se comparado ao grupo CD44⁻ (média = 6,4 anos). De outro lado, pacientes com tumores CD24⁺ tiveram uma sobrevida menor (média = 7,9 anos), comparadas aos tumores CD24⁻ (média = 8,6 anos) mas sem significância estatística ($p=0,32$) (Gráfico 1B).

Quanto à sobrevida livre de doença relacionada ao CD44, cerca de 66% das pacientes que tinham positividade para esta proteína, não apresentaram metástases no tempo de seguimento se comparadas a 77,8% das CD44⁻ ($p=0,39$) (Gráfico 1D).

A sobrevida livre de doença foi maior também no subgrupo CD24⁻ e com tendência marginalmente significativa a um tempo menor de sobrevida livre de doença no subgrupo CD24⁺ ($p=0,07$) (Gráfico 1 – E), 72% das pacientes não apresentaram metástases no intervalo de 08 anos, ao passo que 94,1% das pacientes CD24⁻ tiveram um tempo livre de recorrência prolongado (9,5 anos).

Em relação aos fenótipos combinados, o fenótipo CD44⁺CD24⁻ relacionou-se a uma melhor sobrevida global (87,5% de pacientes vivos) (Gráfico 1 C e F). O fenótipo CD44⁻CD24⁺ associou-se a pior sobrevida global (53,3% de pacientes vivos) (Gráfico 1 – C). O fenótipo CD44⁺CD24⁺ apresentou pior sobrevida livre de doença (Gráfico 1 – F). As frequências relacionadas aos fenótipos para a sobrevida livre de doença foram distribuídas conforme se seguem: CD44⁺CD24⁺ = 63,2% de pacientes sem

metástases, $CD44^+CD24^- = 100\%$ das pacientes sem metástases, $CD44^-CD24^+ = 83,3\%$ de pacientes sem metástases e $CD44^-CD24^- = 80\%$ de pacientes sem metástases.

A mediana de seguimento neste estudo foi de 4,8 anos (0,36 – 10,88 anos).

Em relação aos gráficos/curvas de sobrevida global e intervalo livre de doença, a primeira avaliação foi relacionada aos subgrupos moleculares onde a sobrevida global foi maior no grupo triplo negativo, seguido pelo luminal B, luminal A e HER2 com a pior sobrevida global (Gráfico 1 – A). Quanto a sobrevida livre de doença, a curva seguiu o mesmo perfil. Interessantemente, os subgrupos considerados como pior prognóstico (luminal B e triplo negativo) tiveram uma melhor sobrevida livre de doença se comparados ao luminal A. Quanto ao subgrupo HER2, este é semelhante a literatura com pior sobrevida livre de doença e sobrevida global (Gráfico 2 – B).

A expressão positiva de claudina 7 não se associou a sobrevida global, mas mostrou-se estatisticamente associada a um intervalo de doença reduzido ($p=0,05$) (Gráfico 2 – C e D).

Gráficos 1A - Sobrevida global de acordo com a expressão de CD44 ($p=0,68$), **B** = Sobrevida global de acordo com a expressão de CD24 ($p=0,32$), **C** = Sobrevida global de acordo com o fenótipo CD44/CD24 ($p=0,72$), **D** = Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de CD44 ($p=0,39$), **E** = Sobrevida livre de doença de acordo com a expressão de CD24 ($p=0,07$) e **F** = Sobrevida livre de doença de acordo com o fenótipo CD44/CD24 ($p=0,26$)

Gráficos 2A - Sobrevida global de acordo com subgrupos moleculares definidos imunoistoquimicamente ($p=0,003$), **B** = Sobrevida livre de doença acordo com subgrupos moleculares ($p<0,001$), **C** = Sobrevida global acordo com claudina 7 ($p=0,73$) e **D** = Sobrevida livre de doença acordo com claudina 7 ($p=0,05$)

5 DISCUSSÃO

Para tentar explicar a recorrência observada em muitos pacientes, apesar de uma resposta boa a endócrino ou quimioterapias convencionais, sugeriu-se que uma subpopulação de células no tumor mostra características de “stem cells”. Como células tronco normais estas células tem capacidade de auto-renovação e de regenerar todos os tipos celulares existentes dentro da massa tumoral e apresentam resistência à terapia e se distinguem das demais por marcadores de superfície específicos: CD44⁺/CD24⁻. Tumores diferem na proporção de CD44 e CD24 (Park et al., 2010).

O objetivo do presente estudo foi determinar a frequência de 4 fenótipos definidos por dois marcadores: CD44 e CD24, em amostras de tecido parafinado de pacientes com carcinoma de mama, subdivididas em diferentes grupos conforme a presença ou ausência de RE, RP e HER2. Na nossa análise, a frequência dos subgrupos encontrados foi semelhante à encontrada por Carey, et al., 2006.

No presente estudo, luminal A e luminal B foram os subgrupos mais comuns definidos pela imunoistoquímica (total = 49,5%). Esta frequência está dentro dos valores de outros estudos (27 a 73,4%). As demais frequências dos outros subgrupos também acompanharam a literatura (5,2 a 32%) (Carey et al., 2007, Tamimi et al., 2008, Spitale et al., 2009, Reis Filho et al., 2006). Não encontramos associação significativa entre os diferentes subgrupos e características clínico-patológicas confirmando estudos prévios

(Carey, 2006, Yang et al., 2007, Munirah et al., 2011). No entanto CK18 (um marcador epitelial luminal) foi predominante expresso nos subtipos luminais ($p = 0.003$). Conforme Pratt et al (2011) a sobrevida global do grupo triplo negativo não foi diferente dos demais grupos, excepcionando-se o grupo HER2 que mostrou pior prognóstico tanto em relação à sobrevida global como ao intervalo livre de doença. O grupo luminal A, mostrou inesperadamente um pior prognóstico em relação aos dados de literatura (Wirapati et al., 2008). No entanto este subgrupo na nossa casuística apresentou alta frequência de metástases (33.3%) e pode conter vários casos com alto índice de proliferação, mensurado através do Ki67.

Shipitsin et al., (2007) sugeriram que $CD24^+$ e $CD44^+$ representam populações diferentes com perfis gênicos específicos. As células $CD24^+$ representam células luminais melhor diferenciadas e as células $CD44^+$ são células mais semelhantes as células progenitoras. A positividade maior que encontramos foi para o CD24 isolado (74,7%) o qual foi estatisticamente associado aos receptores de progesterona ($p = 0,02$) e estrógeno ($p=0,05$) e marginalmente ao marcador de células luminais CK18, confirmando estudos anteriores com células em cultura (Sheridan et al., 2006, Filmore e Kuperwasser, 2008) e foi também associado positivamente ao marcador de proliferação Ki67 confirmando estudos anteriores com células de carcinoma de mama (MCF-7) (Kim et al., 2007)

Nos trabalhos de Kim et al., 2011, a sobrevida livre de doença em 10 anos de seguimento nos grupos com expressão negativa de CD24, foi mais prevalente que nos $CD24^+$ (68,9% para $CD24^-$ e 55,6% para o $CD24^+$)

e o mesmo aconteceu na sobrevida global (74,6% para o grupo CD24⁻ de e 60,9% para o grupo CD24⁺). A sobrevida livre de doença em 10 anos nos grupos com expressão para CD44 foi respectivamente de 62,2% para o grupo CD44⁻ e 73% para o grupo CD44⁺, a sobrevida global foi de 68,1% para o grupo CD44⁻ foi de 77,7% para o grupo CD44⁺.

Nossos resultados foram semelhantes em relação a sobrevida livre de doença verificamos as frequências 72,1% para os casos CD24⁺ e 94,1% para os CD24⁻ ($p = 0.07$) e em relação à sobrevida global 72,7% de pacientes vivos exibiam tumores CD24⁺ e 84,2% para os casos CD24⁻. Quanto ao CD44, a sobrevida global dos CD44⁺ foi melhor do que negativos (68,5% versus 59,1% respectivamente de pacientes vivos).

A ligação da proteína CD24⁺ com mau prognóstico já foi descrita em vários tumores sólidos incluindo câncer de mama (Kristiansen et al., 2003, Lim et al., 2005). A transfecção de CD24 em células de carcinoma de mama levou à aquisição de propriedades metastáticas (Baumann et al., 2005). CD24⁺ também foi associado à proliferação, adesão e invasão em células MCF-7 (Kim et al., 2007). Portanto CD24 está associado a um comportamento agressivo embora na nossa casuística esteja associado um fenótipo epitelial diferenciado estando associado significativamente de ER⁺, PR⁺ e marginalmente a CK18⁺.

A expressão do CD24 parece ser um marcador de mau prognóstico no câncer de mama e a expressão de CD44, um marcador de bom prognóstico. Clay et al., (2010) sugeriram que em câncer de mama, CD24⁺ poderia ser um marcador de células tronco.

Verificamos uma percentagem muito pequena de tumores que expressam o fenótipo convencional de “stem cell” $CD44^+/CD24^-$ (aproximadamente 8,4%). Ao contrário, Al-Hajj et al., 2003, demonstraram a presença de $CD44^+/CD24^-$ em todas as amostras de câncer de mama, Honeth et al., 2008, encontraram este fenótipo em 25 casos (31%), Mylona et al., 2008 relataram uma positividade de 58,7% e Abraham et al., 2005, encontraram uma positividade de 22%. Discrepâncias podem estar relacionadas aos métodos de obtenção das amostras, quer em tumores sólidos ou em efusão pleural, por exemplo. Métodos de determinação do CD44 e CD24 por simples ou dupla marcação, por imunoistoquímica e o uso de tissue microarray aonde o pequeno tamanho das amostras pode levar a erros, embora esta situação possa ser minimizada pela utilização de várias amostras do mesmo tumor.

Estudos indicam que tumores $CD44^+CD24^-$ relacionam-se a tumores basais (Sheridan C et al., 2006, Honneth et al., 2008, Klingbeil et al., 2010). Embora em nossos estudos tenhamos notado que este fenótipo é mais comum nos tumores triplo negativos não encontramos associações estatísticas entre subgrupos e fenótipos. Tumores $CD44^+CD24^-$ também não foram encontrados no subgrupo HER2, confirmando resultados anteriores Honneth et al., 2008. Outros trabalhos indicaram que linhagens de câncer de mama expressando $CD44^+CD24^-$ exibem propriedades invasivas e metastáticas (Sheridan et al., 2006, Meyer et al., 2009). Carcinomas mamários que apresentam células com este imuno fenótipo, segundo Abraham et al., (2005) apresentaram alta taxa de metástase, o que não foi

confirmado em nosso trabalho. Não encontramos metástase no grupo com este fenótipo, e a maior ocorrência de metástase (82,4%) ocorreu no grupo CD44⁺CD24⁺ ($p = 0.016$).

Uma das características definidas das “stem cells” é a capacidade de invasão e metastatização do tumor (Sheridan et al., 2006, Giatromanolaki et al., 2010), que levam a um pior prognóstico, no entanto, nos nossos resultados não observamos uma associação entre os CD44⁺CD24⁻ e os parâmetros de sobrevida e intervalo livre de doença, embora paradoxamente houvesse uma tendência para uma melhor sobrevida para estas pacientes, portanto as características de CD44⁺CD24⁻ observadas no nosso estudo não estão de acordo com as propriedades tumorigênicas descritas. Resultados semelhantes foram observados anteriormente por Mylona et al., (2007). Abraham et al (2005). A análise do CD44⁺CD24⁻ em oito linhagens celulares demonstrou uma frequência de 25% e sugeriu-se que este marcador não deveria ser um marcador universal de células tronco (Hwang-Verslues et al., 2009). Estes resultados sugerem que existem outros marcadores para stem cells.

Hurt et al., (2008) encontraram evidências de que as células CD44⁺/CD24⁻ estão possivelmente relacionadas com a iniciação tumoral e com um pobre prognóstico nos pacientes acometidos pelo carcinoma de próstata. Por outro lado, Li et al., (2007) recentemente encontraram que as células tronco cancerígenas são caracterizadas pelo imunofenótipo CD44⁺/CD24⁻. Este fenótipo também foi encontrado em células de carcinoma escamoso de cabeça e pescoço (Oliveira et al., 2011). Outros prováveis marcadores podem definir em diversos tipos de tumores humanos sólidos as

populações celulares que se assemelham a células tronco com propriedades altamente tumorigênicas. Em tumores cerebrais e prostáticos, foi encontrado que a expressão de CD133 define uma subpopulação de células com elevado potencial tumorigênico (Singh et al., 2003, Richardson et al., 2004), enquanto em melanomas, a população de células tronco cancerígenas expressava o marcador CD20 (Fang et al., 2005). Estes estudos sugerem que diferentes marcadores podem ser expressos em diversos tumores pelas células tronco cancerígenas. Portanto, é possível que cada subgrupo tumoral possua seu fenótipo específico de marcadores.

O fenótipo $CD44^+CD24^+$ embora não apresentando impacto significativo no prognóstico das pacientes relacionou-se a uma maior frequência de Ki67 ($p = 0.06$) sugerindo uma associação com proliferação, paralelamente aos resultados obtidos com CD24 isolados. Os trabalhos de Kim et al., (2011), relatam que o grupo de $CD44^+CD24^+$ é considerado um fenótipo de prognóstico pior em câncer de mama com alta significância estatística. Estes autores analisaram 643 casos e é possível que o número menor de casos no nosso estudo ($n = 95$) tenha ocasionado a ausência de significância estatística.

Além dos subgrupos definidos por Perou et al., (2000), recentemente um novo grupo, referido como “claudin low” ou com baixa expressão de claudinas incluindo a claudina 7 foi identificado em um estudo de Herschkowitz et al., 2007 em casos de carcinomas de mama.

Como os tumores basais, tumores com baixa expressão de claudina são geralmente triplo-negativos e expressam marcadores associados a

transição epitélio-mesênquima como vimentina e twist e estão associados ao fenótipo CD44⁺CD24⁻ e à expressão diminuída de marcadores luminais de diferenciação, baixa frequência de HER2 e de marcadores de proliferação (Creighton et al., 2010, Pratt et al., 2010).

No presente estudo, a claudina 7 positiva foi encontrada em 38,9% dos tumores de mama, mostrando uma positividade menor no fenótipo triplo negativo embora sem atingir a significância estatística. A positividade da claudina 7 foi mais comum nos tumores dos subgrupos luminais e no subgrupo HER2 positivo ($p = 0.2$), enquanto claudina 7 negativa mostrou uma relação direta com marcadores basais como o CK5 positivo ($p = 0.03$), com expressão negativa do HER2 e com a positividade do RP, embora sem correlação com Ki67. Não encontramos a claudina 7 negativa como sendo de pior prognóstico, ao contrário do que sugere a literatura (Pratt e Perou, 2011). A expressão reduzida de claudina 7 foi previamente associada a tumores de alto grau e doença metastática (Kominsky et al., 2003, Szasz et al., 2011). No entanto claudina 7 positiva, embora não estatisticamente associada à sobrevida, associou-se a um intervalo livre de doença reduzido ($p = 0.05$) e uma maior frequência de metástase (65,9%) se comparada a claudina 7 negativa (35%, $p = 0.07$).

Não temos até o presente momento, uma explicação clara para este achado. O mesmo fenômeno acontece com a claudina 4, cuja expressão aumentada está associada a um pior prognóstico (Lanigan et al., 2005). Podemos especular de acordo com a proposta de Shipitsin et al. (2007) que a evolução clonal envolvendo a heterogeneidade tumoral tenha favorecido a

expansão de uma população de células claudina 7 positivas durante a progressão tumoral. Park et al. (2007), relataram uma forte expressão de claudina 7 nos focos metastáticos. Outra possibilidade baseia-se no trabalho de Morita et al. (1999) que propuseram que a exata proporção de claudinas diferentes determina a intensidade da força da junção aderente. Um aumento da frequência de claudina 7 poderia resultar em desequilíbrio da percentagem de claudina levando à formação de uma junção aderente defeituosa e posteriormente facilitando a progressão tumoral.

De acordo com Lanigan et al., 2008, é possível que a visão tradicional de que as proteínas de adesão devem ser perdidas com a progressão do câncer de mama precisa ser revista.

Myal et al., 2010, propuseram a existência de um novo subtipo de câncer de mama, o qual chamaram de “claudin high”, que exibiria uma alta percentagem de claudinas e este novo subtipo poderia potencialmente ter um uso diagnóstico.

6 CONCLUSÕES

O carcinoma da mama exhibe uma heterogeneidade tumoral muito grande e em decorrência deste fato, foram definidos vários subgrupos tumorais baseados na expressão gênica desses tumores. Através desta classificação clássica, receptores de estrogênio, receptores de progesterona e fator de crescimento epidérmico (HER2), definimos através da imunoistoquímica, subgrupos como o luminal A, luminal B, HER2⁺ e triplo-negativo. Na literatura, foi sugerido que essa heterogeneidade seria devida em parte à presença de células tronco tumorais em cada subgrupo intrínseco, e que sua presença poderia ser avaliada através da análise de CD44 e CD24. Nós definimos 04 fenótipos através das combinações destas análises (CD44⁺CD24⁺, CD44⁺CD24⁻, CD44⁻CD24⁺ e CD44⁻CD24⁻) e a sua influência no prognóstico, assim como a associação com a expressão de Ki67, citoqueratinas (CK5, CK6 e CK18) e claudina 7.

Verificamos uma percentagem muito pequena de tumores que expressam o fenótipo convencional de “stem cell” CD44⁺CD24⁻ (aproximadamente 8,4%).

Características definidas para “stem cells” incluem uma morfologia celular basal, capacidade de invasão e metastatização e proliferação do tumor levando a um pior prognóstico das pacientes, no entanto, nos nossos resultados não observamos uma associação entre a percentagem de células com fenótipo CD44⁺CD24⁻ e parâmetros clinico-patológicos ligados a

prognóstico, frequência de metástase ou associação com o subgrupo triplo negativo ou com o marcador basal CK5. Além do mais a frequência de células tumorais CD44⁺CD24⁻ não exerceu um impacto significativo na sobrevida e intervalo livre de doença, embora houvesse uma tendência para um aumento de sobrevida para estas pacientes.

Sugerimos que as características dos tumores CD44⁺CD24⁻ parecem não estar de acordo com as propriedades tumorigênicas descritas na literatura e enfatizam a necessidade de outros marcadores para células tronco.

O fenótipo CD44⁻CD24⁺ também não mostrou uma associação significativa com a sobrevida global ou intervalo livre de doença embora estivesse associado a uma tendência para um prognóstico pior destas pacientes. O CD24 isolado correlacionou-se positivamente com os marcadores luminais (RP, RE) e com o Ki67 sugerindo um perfil proliferativo. Embora não associado à sobrevida o CD24⁺ isolado foi um indicador prognóstico significativo de um intervalo livre de doença reduzido.

Em virtude da emergência de um novo subgrupo de tumores triplo negativos definidos pela baixa expressão de claudinas, esperaríamos uma associação da claudina negativa com pior prognóstico. Paradoxalmente pacientes com tumores claudina 7 positiva exibem um intervalo de livre de doença reduzido.

Baseados em nossos resultados concluimos que a análise da frequência de CD44⁺ e claudina 7 positivos podem contribuir para a determinação do prognóstico do carcinoma de mama.

6 ANEXOS

Anexo 1 - Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não-melanoma, na população brasileira

Figura 1

Tipos de câncer mais incidentes estimados para 2010, exceto pele não melanoma, na população brasileira

Fonte: Instituto Nacional de Câncer - INCA/ MS

Fonte: www.inca.gov.br/estimativa/2010

Anexo 2 - Estimativas para o ano 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária.*

Mulheres				
Localização Primária Neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos			
	Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama Feminina	49.240	49,27	17.540	74,56
Colo do Útero	18.430	18,47	5.280	22,50
Cólon e Reto	14.800	14,80	5.530	23,54
Traquéia, Brônquio e Pulmão	9.830	9,82	3.130	13,37
Estômago	7.680	7,70	2.340	9,94
Leucemias	4.340	4,33	1.330	5,52
Cavidade Oral	3.790	3,76	1.090	4,48
Pele Melanoma	2.970	2,92	860	3,38
Esôfago	2.740	2,69	660	2,55
Outras Localizações	78.770	78,83	28.510	121,33
Subtotal	192.590	192,74	66.270	282,03
Pele não Melanoma	60.440	60,51	12.800	54,45
Todas as Neoplasias	253.030	253,23	79.070	336,52

* Números arredondados para 10 ou múltiplos de 10

Fonte: www.inca.gov.br/estimativa/2010

7 REFERÊNCIAS

Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44⁺ / CD24⁻/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005, 11, 1154-9.

Afify A, Purnell P, Nguyen L. Role of CD44s and CD44v6 on human breast cancer cell adhesion, migration, and invasion. *Exp Mol Pathol*. 2009 Apr,86(2):95-100.

Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc. Natl Acad. Sci U.S.A.* 2003, 100, 3983-8.

Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004 Sep 20,23(43):7274-82.

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

Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, et al., Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 2003,21:1973-9.

Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, Yagita H, Sleeman JP. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10783-93.

Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, Birnbaum D. How basal are triple-negative breast cancer? *International Journal of Cancer* 2008,123: 236-8.

Carey LA, Perou CM, Livasy CA et al.: Race, Breast Cancer Subtypes and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*, 2006, 295: 2492-2502.

Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, Ollila DW, Sartor CI, Graham ML, Perou CM. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329-34.

Cariatti M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. *Histopathology.* 2008, 52, 99-107.

Cheang MCU, Voduc D, Perou CM, Nielsen TO. Basal-like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res* 2008, 14:1368-76.

Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, Watson M, Davies S, Bernard PS, Parker JS, Perou CM, Ellis MJ, Nielsen TO. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009 May 20;101(10):736-50.

Clay MR, Tabor M, Owen JH, Carey TE, Bradford CR, Wolf GT, Wicha MS, Prince ME. Single-marker identification of head and neck squamous cell carcinoma cancer stem cells with aldehyde dehydrogenase. *Head Neck*. 2010 Sep,32(9):1195-201.

Cowin P, Wysolmerski J. Molecular mechanisms guiding embryonic mammary gland development. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jun 1,2(6):a003251.

Creighton CJ, Chang JC, Rosen JM. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) in tumor-initiating cells and its clinical implications in breast cancer. *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2010 Jun,15(2):253-60.

Deome KB, Faulkin Lj Jr, Bern HA, et al., Development of mammary tumors from hiperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Câncer Res* 1959,19:515-20.

Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003 Oct,36 Suppl 1:59-72. Review.

Fang D, Nguyen TK, Leishear K, Finko R, Kulp AN, Hotz S, Van Belle PA, Xu X, Elder DE, Herlyn M. A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. *Cancer Res*. 2005 Oct 15,65(20):9328-37.

Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008,10(2):R25.

Fisher B, Redmond CK, Wickerham DL, Rockette HE, Brown A, Allegra J, Bowman D, Plotkin D, Wolter J. Relation of estrogen and/or progesterone receptor content of breast cancer to patient outcome following adjuvant chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 1983,3(4):355-64.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, et al., Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med* 2000, 124:966-78.

Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2010 Apr 20.

Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell.* 2007 Nov,1(5):555-67.

Glinsky GV, Berezovska O, Glinskii AB. Microarray analysis identifies a death-from-cancer signature predicting therapy failure in patients with multiple types of cancer. *J Clin Invest.* 2005, 115, 1503-1521.

Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science* 1977, 197, 461-463.

Hardy EE, Pinotti JA, Osis MJD, Faúndes A. Variáveis reprodutivas e risco para câncer de mama: Estudo caso-controle desenvolvido no Brasil. *Boletín de la Oficina Sanitária Panamericana*, 1993;115:93-102).

Hennesy 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 May 15;69(10):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(5):R76.

Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg A, Hegardt C. The CD44⁺/CD24⁻ phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R53.

Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF, Livasy C, Carey LA, Reynolds E, Dressler L, *et al.*: The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006, 7: 96.

Hunt, KK, Robb, GL, Strom, EA, Ueno, NT. Breast Cancer. Second Edition. University of Texas. *Springer*, 2008, pág. 31-36.

Hwang-Verslues WW, Kuo WH, Chang PH, Pan CC, Wang HH, Tsai ST, Jeng YM, Shew JY, Kung JT, Chen CH, Lee EY, Chang KJ, Lee WH. Multiple lineages of human breast cancer stem/progenitor cells identified by profiling with stem cell markers. *PLoS One.* 2009 Dec 21;4(12):e8377.

Joshi PA, Jackson HW, Beristain AG, Di Grappa MA, Mote PA, Clarke CL, Stingl J, Waterhouse PD, Khokha R. Progesterone induces adult mammary stem cell expansion. *Nature*. 2010 Jun 10,465(7299):803-7.

Kim HJ, Kim JB, Lee KM, Shin I, Han W, Ko E, Bae JY, Noh DY. Isolation of CD24(high) and CD24(low/-) cells from MCF-7: CD24 expression is positively related with proliferation, adhesion and invasion in MCF-7. *Cancer Lett*. 2007 Dec 8,258(1):98-108.

Kim HJ, Kim MJ, Ahn SH, Son BH, Kim SB, Ahn JH, Noh WC, Gong G. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status. *Breast*. 2011 Feb,20(1):78-85.

Klingbeil P, Natrajan R, Everitt G, Vatcheva R, Marchio C, Palacios J, Buerger H, Reis-Filho JS, Isacke CM. CD44 is overexpressed in basal-like breast cancers but is not a driver of 11p13 amplification. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Feb,120(1):95-109.

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 Apr 3,22(13):2021-33.

Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schlüns K, Denkert C, Dahl E, Pilarsky C, Altevogt P, Guski H, Dietel M. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003 Oct 15,9(13):4906-13.

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 May 1;124(9):2088-97.

Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):1030-7.

Lim KH, Oh DY, Chie EK, Han W, Im SA, Kim TY, Park IA, Noh DY, Ha SW, Bang YJ. Metaplastic breast carcinoma: clinicopathologic features and prognostic value of triple negativity. *Jpn J Clin Oncol*. 2010 Feb;40(2):112-8.

Lim SC. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomed Pharmacother*. 2005 Oct;59 Suppl 2:S351-4.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R *et al.*: Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol.*, 2006, 19, 264-71.

Mani SA, Guo W, Liao MJ, Eaton EN, Ayyanan A, Zhou AY, Brooks M, Reinhard F, Zhang CC, Shipitsin M, Campbell LL, Polyak K, Briskin C, Yang J, Weinberg RA. The epithelial-mesenchymal transition generates cells with properties of stem cells. *Cell*. 2008 May 16;133(4):704-15.

Marusyk A, Polyak K. Tumor heterogeneity: cases and consequences. *BB Acta* 2010; 1805:105-17

Meyer MJ, Fleming JM, Ali MA, Pesesky MW, Ginsburg E, Vonderhaar BK. Dynamic regulation of CD24 and the invasive, CD44posCD24neg phenotype in breast cancer cell lines. *Breast Cancer Res.* 2009,11(6):R82.

Morita K, Furuse M, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin multigene family encoding four-transmembrane domain protein components of tight junction strands. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1999 Jan 19,96(2):511-6.

Munirah MA, Siti-Aishah MA, Reena MZ, Sharifah NA, Rohaizak M, Norlia A, Rafie MK, Asmiati A, Hisham A, Fuad I, Shahrin NS, Das S. Identification of different subtypes of breast cancer using tissue microarray. *Rom J Morphol Embryol.* 2011,52(2):669-77.

Myal Y, Leygue E, Blanchard AA. Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol.* 2010, 2010:956897.

Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, Nakopoulou L. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44⁺/CD24^(-/low) and CD44⁻/CD24⁺ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2008 Jul,39(7):1096-102.

Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, et al., Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptor reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol* 2005,123:21-27.

Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, *et al.*, Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004, 10: 5367-74.

Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science*. 1976 Oct 1,194(4260):23-8.

Oliveira LR, Oliveira-Costa JP, Araujo IM, Soave DF, Zanetti JS, Soares FA, Zucoloto S, Ribeiro-Silva A. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011 Feb,40(2):135-42.

Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, Schlessinger J, Lippman ME, King CR. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol*. 1990 Jan,8(1):103-12.

Park D, Kåresen R, Axcróna 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*. 2007 Jan,115(1):52-65.

Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 1,16(3):876-87.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, Rees CA, Pollack JR, Ross DT, Johnsen H, Akslen LA, *et al.*: Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000, 406: 747-752.

Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancer. *Oncologist* 2010, 15 Suppl 5:39-48.

Polyak K and Kalluri R. The role of the microenvironment in Mammary Gland Development and Cancer. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2010,2:a003244.

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 Sep 2, 12(5):R68.

Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb,5(1):5-23.

Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, Hung G, Robinson RA, Harris C, El-Naggar A, Slamon DJ, Phillips RN, Ross JS, Wolman SR, Flom KJ. HER2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol*. 1997 Aug,15(8):2894-904.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AHS, Robertson JF, Ellis IO: Prognostic Markers in Triple-Negative Breast Cancer. *Cancer*, 2007, 109:25-32.

Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J Clin Pathol*. 2006 Mar,59(3):225-31. Review.

Reya T, Morrison SJ, Clarke MF et al., Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001, 414:105-11.

Richardson GD, Robson CN, Lang SH, Neal DE, Maitland NJ, Collins AT. CD133, a novel marker for human prostatic epithelial stem cells. *J Cell Sci.* 2004 Jul 15;117(Pt 16):3539-45.

Rodriguez-Pinilla SM, Sarrio D, Honrado E, et al., Prognostic significance of basal-like phenotype and fascin expression in node-negative invasive breast carcinomas. *Clin Cancer Res* 2006, 12: 1533-9.

Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, Goulet R Jr, Badve S, Nakshatri H. CD44⁺/CD24⁻ breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R59.

Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, Nikolskaya T, Serebryiskaya T, Beroukhi R, Hu M, Halushka MK, Sukumar S, Parker LM, Anderson KS, Harris LN, Garber JE, Richardson AL, Schnitt SJ, Nikolsky Y, Gelman RS, Polyak K. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 2007 Mar;11(3):259-73.

Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB. Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res.* 2003 Sep 15;63(18):5821-8.

Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2/neu oncogene. *Science.* 1987 Jan 9;235(4785):177-82.

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 HER2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science*. 1989 May 12;244(4905):707-12.

Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, et al., Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 2001, 344: 783-92.

Smalley M, Ashworth A. Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nat Cancer* 2003;3:832-44.

Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johsen H, Hastie T, Eisen MB, van de RM, Jeffrey SS, et al., Gene expression patterns of the breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001, 98:10869-10874.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, et al., Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003, 100:8418-8423.

Spitale A, Mazzola P, Soldini D, Mazzucchelli L, Bordoni A. Breast cancer classification according to immunohistochemical markers: clinicopathologic features and short-term survival analysis in a population-based study from the South of Switzerland. *Ann Oncol*. 2009 Apr;20(4):628-35.

Spradling A, Drummond-Barbosa D, Kai T. Stem cells find their niche. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):98-104.

Stingl J, Eirew P, Ricketson I, et al., Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature* 2006;439:993-7.

Stingl J, Raouf A, Emerman JT, et al., Epithelial progenitors in the normal human mammary gland. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 2005;10:49-59.

Surveillance Research, American Cancer Society, 2005.

Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, Nemeth Z, Baranyai Z, Dede K, Madaras L, Kulka J. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2011 Jan;28(1):55-63.

Tamimi RM, Baer HJ, Marotti J, Galan M, Galaburda L, Fu Y, Deitz AC, Connolly JL, Schnitt SJ, Colditz GA, Collins LC. Comparison of molecular phenotypes of ductal carcinoma in situ and invasive breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2008;10(4):R67.

Tan P.H., Jayabaskar T., Yip G., Tan Y., Hilmy M., Selvarajan S., Bay B.H.. p53 and c-kit (CD117) protein expression as prognostic indicators in breast phyllodes tumors: a tissue microarray study. *Mod Pathol*. 2005 Dec;18(12):1527-34.

Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER2/neu oncogenes protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol*. 1989 Aug,7(8):1120-8.

Tauber JH, Herschkowitz JI, Komurov K, Zhou AY, Gupta S, Yang J, Hartwell K, Onder TT, Gupta PB, Evans KW, Hollier BG, Ram PT, Lander ES, Rosen JM, Weinberg RA, Mani SA. Core epithelial-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin-low and metaplastic breast cancer subtypes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Aug 31,107(35):15449-54.

Tavassoli FA, Devilee P: *World Health Organization of Tumours*. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs Lyon: IARCpress, 2003.

Vesuna F, Lisok A, Kimble B, Raman V. Twist modulates breast cancer stem cells by transcriptional regulation of CD24 expression. *Neoplasia*. 2009 Dec,11(12):1318-28.

Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, de Jong D, Van de Vijver MJ, Van't Veer LJ, Peterse JL. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008 Oct, 216(2):141-50.

Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat* 2009 Sep,117(2):273-80.

Wirapati P, Sotiriou C, Kunkel S, Farmer P, Pradervand S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Ignatiadis M, Sengstag T, Schütz F, Goldstein DR, Piccart M, Delorenzi M. Meta-analysis of gene expression profiles in breast cancer: toward a unified understanding of breast cancer subtyping and prognosis signatures. *Breast Cancer Res.* 2008,10(4):R65..

Wright MH, Calcagno AM, Salcido CD, Carlson MD, Ambudkar SV, Varticovski L. Brca1 breast tumors contain distinct CD44⁺/CD24⁻ and CD133⁺ cells with cancer stem cell characteristics. *Breast Cancer Res.* 2008,10(1):R10.

Yang XR, Sherman ME, Rimm DL, Lissowska J, Brinton LA, Peplonska B, Hewitt SM, Anderson WF, Szeszenia-Dabrowska N, Bardin-Mikolajczak A, Zatonski W, Cartun R, Mandich D, Rymkiewicz G, Ligaj M, Lukaszek S, Kordek R, García-Closas M. Differences in risk factors for breast cancer molecular subtypes in a population-based study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2007 Mar,16(3):439-43.