

**UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL**  
**CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA**  
**SAÚDE**

**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ANDRÓGENO**  
**EM CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO**  
**E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES**  
**PROGNÓSTICOS**

**MAXIMILIANO CASSILHA KNEUBIL**

Caxias do Sul  
2015

**MAXIMILIANO CASSILHA KNEUBIL**

**EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ANDRÓGENO  
EM CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO  
E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES  
PROGNÓSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação  
em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul,  
visando a obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio F. Pasqualotto

Co-Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Eifler Guerra Godoy

Caxias do Sul  
2015

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Universidade de Caxias do Sul  
UCS - BICE - Processamento Técnico

K68e Kneubil, Maximiliano Cassilha, 1979-  
Expressão de receptor de andrógeno em carcinoma mamário triplo  
negativo e sua correlação com fatores prognósticos / Maximiliano  
Cassilha Kneubil. – 2015.  
67 f. : il. ; 30 cm

Apresenta bibliografia.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade de Caxias do Sul, Programa  
de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2015.  
Orientador: Prof. Dr. Fábio F. Pasqualotto ; Coorientadora: Profa.  
Dra. Alessandra Eifler Guerra Godoy.

1. Mamas - Câncer. 2. Tumores. 3. Prognóstico. 4.  
Imunohistoquímica. I. Título.

CDU 2. ed.: 618.19-006

Índice para o catálogo sistemático:

1. Mamas - Câncer	618.19-006
2. Tumores	616-006
3. Prognóstico	616-07
4. Imunohistoquímica	616-008.9-092.18

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária  
Roberta da Silva Freitas – CRB 10/1730

MAXIMILIANO CASSILHA KNEUBIL

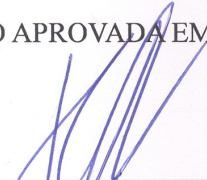
**EXPRESSÃO DE RECEPTOR ANDRÓGENO EM CARCINOMA MAMÁRIO  
TRIPLO NEGATIVO E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES PROGNÓSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando à obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

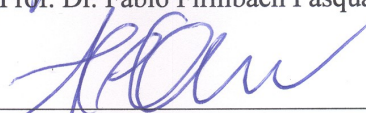
Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Eifler Guerra Godoy

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07 DE DEZEMBRO DE 2015



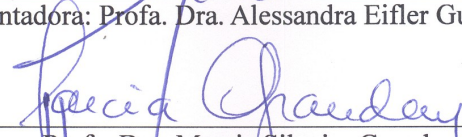
---

Orientador: Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto



---

Co-orientadora: Profa. Dra. Alessandra Eifler Guerra Godoy



---

Profa. Dra. Marcia Silveira Graudenz



---

Prof. Dr. José Mauro Madi



---

Prof. Dr. Renato Luis Rombaldi

**MAXIMILIANO CASSILHA KNEUBIL**

**EXPRESSÃO DE RECEPTOR DE ANDRÓGENO  
EM CARCINOMA MAMÁRIO TRIPLO NEGATIVO  
E SUA CORRELAÇÃO COM FATORES  
PROGNÓSTICOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em  
Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul, visando a  
obtenção de grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio F. Pasqualotto

Co-Orientadora: Prof. Dra. Alessandra Eifler Guerra Godoy

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 07 DE DEZEMBRO DE DOIS MIL E QUINZE.

Prof. Dr. Fábio F. Pasqualotto

Prof. Dra. Alessandra Eifler Guerra Godoy

**Dedicatória:** Este trabalho é dedicado à minha maravilhosa esposa Janaina e a minha amada filha Victoria, que são minha inspiração e minha alegria de viver.

## AGRADECIMENTOS

Este trabalho é fruto de esforço, dedicação e colaboração de muitas pessoas. À todas elas minha imensa gratidão. Mencionarei algumas, mas registro meu pedido de perdão para as omitidas.

Ao Prof. Fábio Pasqualotto, meu orientador, pela dedicação, sabedoria, companheirismo e excelência científica.

À Profa Alessandra E. Guerra Godoy, minha co-orientadora, pelo apoio, dedicação e amizade.

À Profa. Mariana Roesch Ely, pelo apoio, dedicação e excelência científica.

Ao Prof. Renato L. Rombaldi, pela amizade, apoio fundamental e imenso conhecimento científico durante todas as fases do projeto.

À Dra. Janaina Brollo, pelo apoio incondicional e carinho desde o início do projeto.

Ao Dr. Guilherme Portela Coelho, pela excelência profissional, disponibilidade e amizade.

Às alunas da Medicina Mariana Alessi e Nathalia Hoffmann, pelo apoio fundamental na coleta de dados.

Ao Dr. Bruno Wensing Raimann, pelo apoio, dedicação e amizade.

À Profa. Lessandra Michelin pela parceria, amizade e disponibilidade.

À CAPES pelo apoio financeiro através de bolsa.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro para a realização deste projeto.

Ao Laboratório Diagnose de Patologia e Citologia de Caxias do Sul, fundamental para realização desde projeto científico.

À Lucimara Serafim, pelo apoio e amizade.

Aos Professores do Programa de Pós- Graduação em Biotecnologia, especialmente ao Prof. Aldo J. P. Dillon, pela excelência científica, conhecimento adquirido e por terem me acolhido e por oportunizarem a realização deste trabalho.

E finalmente, às pacientes, por me motivarem e me inspirarem diariamente para a busca incessante por novos conhecimentos.

## RESUMO

*Introdução:* O câncer de mama é uma doença heterogênea e complexa. Carcinomas mamários triplo negativos (CMTN) são tumores com uma agressividade biológica intrínseca, resultando em um prognóstico desfavorável. O receptor de andrógeno (RA) é um dos marcadores mais estudados na atualidade em CMTN, estando associado com a gênese e desenvolvimento do câncer de mama.

*Objetivo:* Correlacionar a expressão do RA em pacientes com CMTN com características clínicas e patológicas referentes à idade do paciente, Ki-67, grau histológico e infiltração intratumoral de linfócitos (IIL).

*Métodos:* O estudo foi de delineamento transversal e retrospectivo, de todos os casos de CMTN registrados em uma instituição, entre janeiro de 2012 e maio de 2014. Os materiais histológicos dos tumores mamários foram submetidos ao estudo imunoistoquímico para RA, e foram correlacionados com as variáveis idade, grau histológico, IIL e Ki-67. A positividade para RA foi determinada com o anticorpo monoclonal RA 441. Quando o RA foi positivo, a expressão foi considerada fraca quando  $\text{Escore-H} \leq 150$  e forte quando  $\text{Escore-H} > 150$ . A análise da porcentagem de IIL foi realizada através de um corte do tumor emblocado em parafina e corado por hematoxilina e eosina (HE) e foi definida como a porcentagem de linfócitos em contato direto com células tumorais.

*Resultados:* 34 CMTN foram analisados. A média da idade foi de 51,9 anos (variação 30-82 anos). Das 34 amostras, 23 casos (67,7%) foram RA-negativo e 11 casos (32,3%) foram RA-positivo. Dos casos positivos, a expressão foi considerada fraca em 6 casos e



forte em 5 casos. A maioria dos pacientes (n=28, 82%) apresentaram tumores pouco diferenciados. A expressão média do Ki-67 foi 65% no grupo RA-negativo e 43,6% no grupo RA-positivo ( $p<0,05$ ). Observou-se uma associação estatisticamente significativa entre a variável idade e a expressão do RA ( $p<0,005$ ), sendo a idade média de 70,8 anos no grupo RA fortemente positivo e 42,3 anos no grupo RA fracamente positivo. Não se observou associação estatística entre a expressão do RA e as variáveis grau histológico e IIL. A porcentagem média de IIL foi 38,6% no grupo RA-positivo e 39,1% no grupo RA-negativo ( $p=0,3$ ).

*Conclusão:* A expressão do RA em CMTN esteve associada a pacientes mais idosas e a tumores com menor expressão de Ki-67. A expressão do RA em pacientes com CMTN delinhou 2 subgrupos com fenótipos distintos. No entanto, não houve associação entre expressão do RA com grau histológico e IIL.

**Palavras-chave:** Câncer de mama triplo negativo, Receptor de andrógeno.

## ABSTRACT

*Background:* Breast cancer is a heterogeneous and complex disease. Triple Negative Breast Cancer (TNBC) are characterized by intrinsic aggressive tumour biology resulting in poor prognosis. Androgen Receptor (AR) is one of newly emerging biomarker in TNBC and has been demonstrated to play an important role in the genesis and in the development of breast cancer.

*Objective:* In the present study, we explored the correlation of AR expression with age, Ki-67, histological subtype, histological grade and value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes (TIL) in TNBC.

*Methods:* We identified consecutive invasive TNBC from a cancer registry in a single institution between January 2012 and May 2014. The biopsies were analyzed by immunohistochemistry for AR and were correlated with age, histological grade, TIL and Ki-67. AR positivity was determined with clone AR 441 antibody. When AR was positive, the expression was considered weak when H-score $\leq$ 150 and strong when H-score $>$ 150. The analysis of percentage of TIL was performed on a single full-face HE-stained tumor section and TIL were defined as the percentage of lymphocytes in direct contact with the tumor cells.

*Results:* 34 TNBC have been analyzed to date. The mean age was 51.9 years (range 30-82). Of the 34 TNBC samples, 23 cases (67.7%) were AR-negative and 11 cases (32.3%) were AR-positive. Of the positive cases, the expression was weak in 6 cases and strong in 5 cases. Most patients (n=28, 82%) presented poorly differentiated tumors and all patients presented invasive ductal carcinoma. The mean expression of Ki67 was 65% in AR-negative group and 43.6% in AR-positive group, respectively (p<0.05).

Older age was associated with AR expression, the mean age in AR strong expression was 70.8 years ( $p < 0.005$ ) compared to 42.3 years in group with AR weak expression.

The AR expressions was not associated with histological grade and TIL. The mean of TIL was 38.6% in the AR-positive group and 39.1% in the AR-negative group ( $p = 0.3$ ).

*Conclusion:* The present analysis showed that AR expressiveness in TNBC was associated with older patients and tumors with lower expression of Ki67. The expressiveness of AR in patients with TNBC through IHC outlined 2 subgroups with distinctive phenotypes. However, the expression of RA in patients with TNBC was not associated with the percentage of TIL and histological grade.

**Key words:** Triple Negative Breast Cancer, Androgen Receptor.

## ÍNDICE

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>16</b>
<b>1.1 Objetivos</b>	<b>17</b>
<b>1.1.1 Objetivo geral</b>	<b>17</b>
<b>1.1.2 Objetivo específico</b>	<b>17</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA</b>	<b>17</b>
<b>2.1. Epidemiologia do câncer de mama</b>	<b>17</b>
<b>2.2. Importância do diagnóstico precoce do câncer de mama</b>	<b>19</b>
<b>2.2.1. Rastreamento mamográfico na população geral</b>	<b>19</b>
<b>2.2.2. Situações especiais de rastreamento mamário</b>	<b>19</b>
<b>2.3. Tratamento cirúrgico do câncer de mama</b>	<b>20</b>
<b>2.3.1. Cirurgia conservadora</b>	<b>20</b>
<b>2.3.2. Mastectomia</b>	<b>20</b>
<b>2.3.3. Princípios de oncoplastica</b>	<b>21</b>
<b>2.3.4. Cirurgia linfonodal</b>	<b>21</b>
<b>2.4. Fatores prognósticos</b>	<b>22</b>
<b>2.4.1. Idade</b>	<b>23</b>
<b>2.4.2. Receptor de estrógeno (RE)</b>	<b>24</b>
<b>2.4.3. Receptor de progesterona (RP)</b>	<b>25</b>
<b>2.4.4. Ki-67</b>	<b>25</b>
<b>2.4.5. Grau histológico</b>	<b>26</b>
<b>2.4.6. Infiltração intratumoral de linfócitos (IIL)</b>	<b>28</b>
<b>2.4.7. Human epidermal growth factor receptor (HER-2)</b>	<b>29</b>
<b>2.5. Radioterapia</b>	<b>30</b>
<b>2.6. Tratamento sistêmico</b>	<b>31</b>
<b>2.6.1. Hormonioterapia</b>	<b>31</b>
<b>2.6.2. Quimioterapia</b>	<b>32</b>
<b>2.7. Subtipos moleculares</b>	<b>32</b>
<b>2.7.1. Carcinoma mamário triplo negativo (CMTN)</b>	<b>34</b>
<b>2.8. Receptor de andrógeno (RA)</b>	<b>36</b>
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>37</b>
<b>3.1. Critérios de inclusão</b>	<b>38</b>

<b>3.2. Critérios de exclusão</b>	<b>38</b>
<b>3.3. Análise estatística</b>	<b>38</b>
<b>3.4. Análise imunoistoquímica (IMH)</b>	<b>39</b>
<b>4. RESULTADOS</b>	<b>44</b>
<b>5. DISCUSSÃO</b>	<b>49</b>
<b>6. CONCLUSÃO</b>	<b>53</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>54</b>

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b>	Representação espacial das taxas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade de Federação (neoplasia maligna da mama feminina).	18
<b>Figura 2.</b>	Ki-67– Proliferação Celular.	26
<b>Figura 3.</b>	Sistema de Graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis.	27
<b>Figura 4.</b>	Câncer de Mama– Graus variados de Infiltração Intratumoral de Linfócitos (IIL).	28
<b>Figura 5.</b>	Subtipos no Carcinoma Mamário Triplo Negativo.	35
<b>Figura 6.</b>	Escore-H.	42
<b>Figura 7.</b>	Expressão do RA Ausente.	42
<b>Figura 8.</b>	Expressão do RA Fraca (Escore-H<150).	43
<b>Figura 9.</b>	Expressão do RA Forte (Escore-H>150) .	43
<b>Figura 10.</b>	Fluxograma das pacientes selecionadas com câncer de mama	45
<b>Figura 11.</b>	Fluxograma das pacientes selecionadas com câncer de mama triplo negativo	45

**LISTA DE TABELAS**

<b>Tabela</b>	<b>Título</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b>	Sistema de Graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis.	27
<b>Tabela 2.</b>	Subtipos Moleculares definidos no Consenso de Saint Gallen 2013.	34
<b>Tabela 3.</b>	Anticorpos usados no estudo imunoistoquímico.	39
<b>Tabela 4.</b>	Critérios estabelecidos pela ASCO/CAP para o estudo imunoistoquímico do HER-2.	40
<b>Tabela 5.</b>	Expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras CMTN e correlação com idade.	46
<b>Tabela 6.</b>	Expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras de CMTN e correlações com Ki-67, grau histológico e IIL.	47
<b>Tabela 7.</b>	Intensidade da expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras de CMTN e correlação com a idade.	48
<b>Tabela 8.</b>	Intensidade da expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras de CMTN e correlações com Ki-67, grau histológico e IIL.	49

## LISTAS DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>AcM</b>	Anticorpo monoclonal
<b>AJCC</b>	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>ASCP</b>	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
<b>BLS</b>	Biópsia do Linfonodo Sentinela
<b>CAP</b>	<i>College of American Pathologists</i>
<b>CC</b>	Cirurgia Conservadora
<b>CM</b>	Câncer de Mama
<b>CMTN</b>	Carcinomas mamários triplo negativos
<b>DHT</b>	5-alfa-dihidrotestosterona
<b>E2</b>	Estradiol
<b>EBCTCG</b>	<i>Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group</i>
<b>G</b>	Grau de diferenciação histológica do tumor
<b>GII,</b>	Tumor moderadamente diferenciado
<b>GIII</b>	Tumor indiferenciado
<b>HE</b>	Hematoxilina e eosina
<b>HER-2</b>	<i>Human Epidermal Growth Factor Receptor</i>
<b>IA</b>	Inibidor de Aromatase
<b>IBCSG</b>	<i>International Breast Cancer Study Group</i>
<b>IC 95%</b>	Intervalo de Confiança de 95%
<b>IGF-1</b>	<i>Insuline-like growth factor I</i>
<b>IIL</b>	Infiltração Intratumoral de Linfócitos
<b>IMH</b>	Imunoistoquímica
<b>INCA</b>	Instituto Nacional do Câncer
<b>MSREs</b>	Moduladores Seletivos de Receptor de Estrógeno
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde
<b>RA</b>	Receptor de Andrógeno
<b>RCPATH</b>	<i>Royal College of Pathologists</i>
<b>RE</b>	Receptor de Estrógeno
<b>RP</b>	Receptor de Progesterona
<b>SCN</b>	Sistema de Classificação de Nottingham



<b>SG</b>	Sobrevida Global
<b>SLD</b>	Sobrevida Livre de Doença
<b>SPSS</b>	<i>Statistical Package for Social Sciences</i>
<b>µm</b>	Micrômetro

## 1. INTRODUÇÃO

No Brasil, o câncer da mama (CM) constitui a neoplasia maligna mais observada na população feminina. Segundo estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA), dos 576.000 novos casos de cânceres previstos para serem diagnosticados em 2014, o câncer de mama é o mais incidente na população feminina (excetuando câncer de pele não melanoma), sendo responsável por 57.120 novos casos (INCA, 2014).

O CM é uma doença heterogênea e complexa (Perou *et al.*, 2000). Durante a última década, análises genômicas utilizando “microarrays” têm revolucionado o campo da pesquisa do CM (Sorlie *et al.*, 2001). Subtipos moleculares foram identificados, delineando fatores de risco diferentes (Millikan *et al.*, 2008; Phipps *et al.*, 2011a), prognósticos distintos (Phipps *et al.*, 2011b), bem como diferentes histórias naturais, diferentes taxas de sobrevida e sensibilidade aos tratamentos locais e sistêmicos (van de Vijver *et al.*, 2002; Wang *et al.*, 2005; Slamon *et al.*, 1987; Slamon *et al.*, 1989; Carey *et al.*, 2006).

Carcinomas mamários triplo negativos (CMTN) são definidos pela ausência da expressão de receptores de estrógenos (RE) e de receptores de progesterona (RP), bem como pela ausência da superexpressão ou amplificação do gene HER2-neu. Representam aproximadamente 15-20% de todos os cânceres de mama e estão associados a um comportamento biológico mais agressivo, alto risco de recorrências, metástases à distância e pior sobrevida quando comparados com subtipos de tumores com receptores hormonais positivos (Curigliano & Goldhirsch, 2011; Carey *et al.*, 2006; Nielsen *et al.*, 2004; Sorlie *et al.*, 2003). Um painel de alterações moleculares como aumento de mutações no p53, Ki-67 elevado, perda da função do BRCA 1 e a presença de vários ativadores de tirosina-quinase estão relacionadas a esse subtipo molecular (Curigliano & Goldhirsch, 2011).

Devido a sua característica biomolecular desfavorável, a quimioterapia convencional é atualmente o único tratamento disponível para as pacientes portadoras de CMTN. Recentes estudos têm procurado identificar marcadores tumorais que subclassifiquem esses tumores e permitam selecionar protocolos quimioterápicos menos ou mais citotóxicos para cada paciente e, além disso, descobrir novas terapias alvo.

Dentre estes marcadores, o receptor de andrógeno (RA) é um dos mais estudados na atualidade (Pistelli *et al.*, 2014).

Foi realizada revisão bibliográfica nas bases de dados *Pubmed National Library of Medicine*, *Scielo (Scientific Eletronic Library Online)*, *Sciencemedic (Science Based Medicine)* e *Medline Health Information from National Library of Medicine*, empregando-se a palavra-chave primária “câncer de mama”, seguida das palavras-chave secundárias “receptor de andrógeno” e “carcinoma mamário triplo negativo”, e seus termos correspondentes em inglês, “*breast cancer*”, “*androgen receptor*” e “*triple negative breast cancer*”. Foram verificados 942 trabalhos que abordaram o câncer de mama e receptor de andrógeno, sendo selecionados 34 artigos. Nesta revisão, incluímos apenas os artigos originais e excluímos os artigos de revisão. Somente os artigos em inglês, português e espanhol foram lidos, bem como os artigos com *abstract*. O levantamento bibliográfico compreendeu o período de 10 anos (2005 a 2015).

## **1.1. Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Avaliar a expressão de RA nos pacientes portadores de CMTN através de estudo imunoistoquímico.

### **1.1.2 Objetivo específico**

Correlacionar a expressão da RA com fatores prognósticos presentes nos resultados anatomo-patológicos e clínicos como idade, grau histopatológico, Ki67 e infiltração intratumoral de linfócitos.

## **2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

### **2.1. Epidemiologia do Câncer de Mama**

O CM ocupa posição de destaque mundial por ser a neoplasia maligna mais incidente na mulher (excluindo os tumores de pele não melanoma) e a maior causa de mortalidade por câncer no sexo feminino, correspondendo a 22% dos casos novos a cada ano (INCA, 2014).

No Brasil, as taxas de mortalidade por CM continuam elevadas, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61% (INCA, 2014).

Assim como ocorre no restante do mundo, onde as taxas de incidência se diferenciam conforme o grau de desenvolvimento da região, no Brasil as taxas de incidência mais elevadas estão nas regiões Sul, Sudeste e Centro-oeste, enquanto as menores taxas de incidência estão nas regiões Norte e Nordeste conforme Figura 1. (INCA, 2014) Na região Sul, a estimativa foi de 70,98 casos novos para 100.000 mulheres no ano de 2014 e particularmente em Porto Alegre, a estimativa foi de 87,72 casos para 100 mil mulheres. (INCA, 2014) Essas informações evidenciam a elevada incidência do CM e reforçam cada vez mais a importância do assunto que tem se tornado um problema de saúde pública.

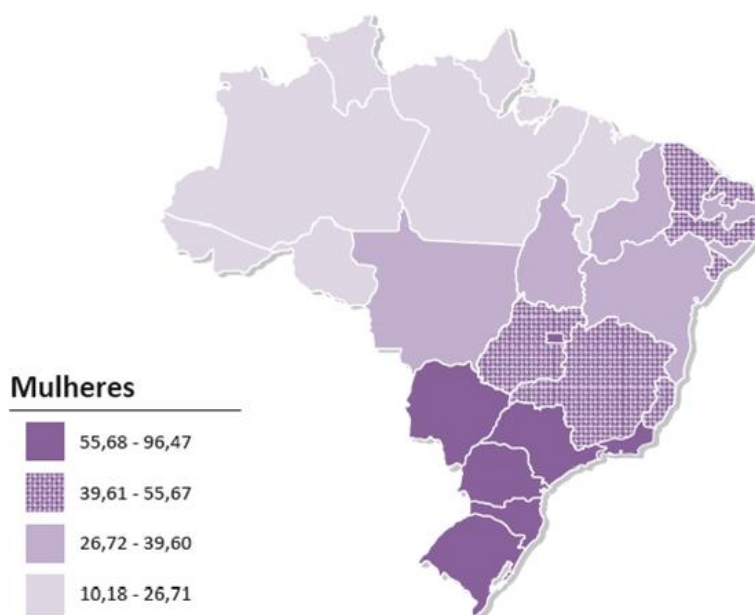


Figura 1. Representação espacial das taxas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2014, segundo Unidade de Federação (neoplasia maligna da mama feminina). (INCA, 2014)

## **2.2. Importância do diagnóstico precoce do câncer de mama**

No Brasil, o CM tem o seu quadro agravado pelo fato do diagnóstico ser feito, na maioria das vezes, numa fase tardia da doença, em especial junto às classes com menor poder aquisitivo. A detecção precoce de CM de tumores pequenos não palpáveis permite um tratamento mais conservador, menos mutilante e com maior qualidade de vida, determinando a cura da doença em até 95% dos casos, muitas vezes sem a necessidade de quimioterapia (Chala *et al.*, 2011).

### **2.2.1. Rastreamento mamográfico na população geral**

Medidas que podem reduzir a mortalidade pelo CM incluem o diagnóstico precoce através do rastreamento mamográfico, visto que esse rastreamento reduz a mortalidade em até 40% (Coldman *et al.*, 2014), além de avanços terapêuticos advindos do conhecimento da biologia tumoral como quimioterapia, hormonioterapia, terapia-alvo e radioterapia, constituindo um tratamento individualizado para cada paciente.

O rastreamento por mamografia é o único método validado que comprovadamente reduz a mortalidade por CM, preconizado nas mulheres anualmente a partir dos 40 anos. Segundo a Sociedade Brasileira de Mastologia, mulheres acima de 40 anos devem realizar a mamografia de rastreamento que é, atualmente, o melhor método para o diagnóstico precoce deste tipo de tumor (Chala *et al.*, 2011).

### **2.2.2. Situações especiais de rastreamento mamário**

Nas mulheres com risco elevado para o CM, os tumores costumam ocorrer mais precocemente e serem mais agressivos. Mulheres com parentes de primeiro grau acometidos por CM devem iniciar o rastreamento 10 anos antes da idade em que foi diagnosticado o câncer, mas não antes dos 30 anos. Já as pacientes com mutações genéticas nos genes BRCA1 e BRCA2 devem iniciar o rastreamento entre 25-30 anos associado à ressonância magnética das mamas (Bauab & Aguillae, 2011).

## **2.3. Tratamento cirúrgico do câncer de mama**

### **2.3.1. Cirurgia conservadora**

A cirurgia conservadora (CC) da mama representa um dos maiores avanços no tratamento do câncer. A técnica consiste na retirada cirúrgica apenas do tumor, seguida de radioterapia sobre o parênquima remanescente. Trata-se da opção preferencial para o tratamento do CM inicial, pois as taxas de cura são semelhantes à da mastectomia, proporcionando melhor qualidade de vida das pacientes (Novita *et al.*, 2011).

Os primeiros relatos de cirurgias parciais da mama datam de 1940 (Novita *et al.*, 2011). No entanto, o primeiro estudo randomizado demonstrando a eficácia da CC foi publicado por Umberto Veronesi *et al.* em 1981. Posteriormente, outros ensaios clínicos randomizados também demonstraram que a CC era equivalente à mastectomia, fato comprovado após 20 anos de seguimento clínico (Veronesi *et al.*, 2002, Fisher *et al.*, 2002).

### **2.3.2. Mastectomia**

Segundo Sakorafas, as primeiras descrições sobre o tratamento do CM remontam de papiros egípcios datados de 3.000 a 2.500 a.C. Andreas Vasalius (1514-1564) acreditava que o tratamento do CM deveria ser realizado por ampla excisão cirúrgica, tendo feito referências à importância do envolvimento dos linfonodos axilares.

William Halsted foi o primeiro quem descreveu, em 1884, de forma científica, a técnica cirúrgica de mastectomia radical. A partir de estudos de Geoffrey Keynes, em 1924, e da descrição da técnica da quadrantectomia por Umberto Veronesi, em 1980, vários estudos randomizados comprovaram que a CC, seguida de radioterapia, produz efeitos equivalentes, em termos de sobrevida, quando comparadas à mastectomia (Veronesi *et al.*, 2002, Fisher *et al.*, 2002), cuja indicação se restringiu a tumores extensos em que a cirurgia conservadora ficasse inviável (Pace *et al.*, 2011).

### 2.3.3. Princípios de oncoplástica

Em estágios mais avançados, o tratamento conservador ainda pode ser empregado, principalmente em mamas de maior volume, associado à Oncoplástica, que associa a ressecção oncológica associada a técnicas de plástica como mamoplastia redutora, obtendo um bom resultado estético, contribuindo excepcionalmente na qualidade de vida e na feminilidade das pacientes.

Em pacientes com mamas pequenas e médias, que apresentam grandes tumores, o tratamento de escolha é a mastectomia. Entretanto, muitas dessas pacientes podem se beneficiar de uma reconstrução imediata através de próteses mamárias, expansores e retalhos músculo-cutâneos, diminuindo o sentimento de mutilação da perda da mama e preservando a autoimagem.

### 2.3.4. Cirurgia linfonodal

A biópsia do linfonodo sentinela (BLS) consiste em um dos principais avanços do tratamento do CM. Antigamente, pensava-se que quanto mais radical fosse o tratamento cirúrgico, maiores seriam os benefícios. Entretanto, as cirurgias mamárias estão se tornando cada vez mais conservadoras, partindo de um tratamento ultraradical, descrito pelo cirurgião Halsted em 1894 e indicado para tumores de mama de todos os tamanhos, com a retirada da mama, músculos peitorais e um esvaziamento completo dos linfonodos da axila, chegando atualmente às cirurgias mais conservadoras com a retirada do tumor com margens livres e a BLS no tratamento do CM inicial (Urban *et al.*, 2011).

Com o rastreamento mamográfico, os tumores são diagnosticados cada vez mais em estágios iniciais, sem o comprometimento da linfonodos axilares, não justificando tratamentos radicais que, além de não gerar benefícios na sobrevida das pacientes, acrescentam uma significativa morbidade, como o linfedema, parestesia em membro superior e seroma. A BLS é um método minimamente invasivo e se aplica em pacientes com tumores de mama iniciais sem o comprometimento da axila ao exame físico e consiste da retirada do primeiro linfonodo que recebe a drenagem linfática da mama, sendo que se este não estiver comprometido, pode-se assumir que existem poucas probabilidades de se encontrarem metástases em outros linfonodos axilares

vizinhos a ele, tornando desnecessária a retirada de outros linfonodos (Urban *et al.*, 2011).

Essa avaliação é realizada durante a cirurgia, após a injeção de um corante chamado Azul Patente ou após a injeção de um radiofármaco, que auxiliam na identificação do linfonodo sentinela, cuja avaliação anatomopatológica é realizada através do exame de congelação intra-operatório por patologista. O primeiro estudo randomizado foi realizado pelo Instituto Europeu de Oncologia de Milão em 2003, consagrando essa técnica, podendo ser indicada inclusive durante a gestação, após quimioterapia neoadjuvante e em tumores multicêntricos ou multifocais (Veronesi *et al.*, 2003).

A perspectiva futura será a de não realizar o esvaziamento axilar em tumores iniciais com até 5 cm de diâmetro e sem linfonodos axilares palpáveis, mesmo que o linfonodo sentinela apresente-se comprometido por metástases. Recentemente foi publicado o estudo Z0011 realizado por um grupo de cirurgiões oncológicos americanos, que não comprovou benefícios do esvaziamento axilar na sobrevida das pacientes, nem mesmo na taxa de recidiva local ou axilar em pacientes que receberam um tratamento conservador. No caso, foi retirado somente um segmento da mama que incluísse o tumor com tecido normal ao redor, seguido de radioterapia, mesmo nos casos em que a BLS tivesse constatado a presença de metástases (Giuliano *et al.*, 2011). Atualmente, a indicação de esvaziamento axilar, ou seja a retirada de múltiplos linfonodos axilares, se restringe ao carcinoma inflamatório, a presença de adenopatia axilar clinicamente indubitável ou comprovada por citologia obtida por punção com agulha fina guiada por ultrassonografia.

#### **2.4. Fatores prognósticos**

Fatores prognósticos são parâmetros passíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditores da sobrevida da paciente. Nos últimos anos, em relação ao CM feminino, inúmeros novos fatores têm sido mencionados na literatura mundial nos últimos anos. Uma terapia baseada em uma avaliação prognóstica possibilita a aplicação das diferentes modalidades terapêuticas



utilizadas no tratamento do câncer com a intensidade e a efetividade adequadas e individualizadas para aquele paciente específico (De Abreu & Koifman, 2002). A seguir, serão apresentados alguns fatores prognósticos de forma detalhada.

#### **2.4.1. Idade**

A definição de CM em mulheres jovens é controversa. Alguns autores classificam como sendo a idade do diagnóstico em mulheres com menos de 35 anos, enquanto outros definem como 40 anos a idade limite. O diagnóstico de CM em pacientes com idade inferior a 35 anos é pouco frequente, a despeito do observando aumento da frequência nos últimos anos. O CM nessa faixa etária comumente apresenta características biológicas mais agressivas e maior taxa de recorrência pós-cirúrgica em comparação a tumores em faixas etárias mais elevadas. Entretanto, o estadiamento clínico e patológico no momento do diagnóstico não parece ser diferente daquelas pacientes mais idosas (Oliveira Filho *et al.*, 2011).

Avaliando as características biológicas, as de maior importâncias nessa faixa etária são a menor imunorreatividade para receptores de estrógenos (ER) e progesterona (PR) e maior incidência de mutações genéticas, principalmente BRCA 1 e 2 (15% a 30%), que estão relacionadas ao desenvolvimento de tumores de alto grau histológico, ausência de expressão de receptores hormonais (RE e RP) e altas taxas de proliferação celular (Oliveira Filho *et al.*, 2011).

O CM é a neoplasia maligna mais incidente entre as mulheres no Brasil e no mundo. Para o Brasil em 2014, foram esperados 57.120 casos novos, com um risco estimado de 56 casos a cada 100 mil habitantes (INCA, 2014). Sabe-se que a maioria dos casos acontece nas pacientes com menos de 65 anos, porém existe uma porcentagem de aproximadamente 25% dos casos que ocorrem em pacientes com mais de 70 anos (Hurria *et al.*, 2008). O grande desafio de tratar este subgrupo de pacientes é que as mulheres com mais de 70 anos raramente são incluídas nos “trials clínicos randomizados” e normalmente apresentam-se com outros fatores inerentes ao grupo etário tais como comorbidades e menor tolerabilidade aos tratamentos propostos.

O CM em pacientes idosas está associado, na maioria das vezes, a um perfil biológico favorável devido à alta prevalência de tumores com alta expressividade hormonal, ausência da hiperexpressão do Human Epidermal Growth Factor Receptor

(HER-2) e baixo índice proliferativo (Hurria *et al.*, 2008). O subtipo histológico mais comum é o carcinoma ductal invasor, porém com uma maior proporção das histologias mais favoráveis como os carcinomas mucinosos e papilíferos (Hurria *et al.*, 2008). No entanto, mulheres com mais de 70 anos apresentam maiores índices de mortalidade por câncer de mama quando comparadas às pacientes mais jovens (Quaglia *et al.*, 2009). O estudo EUROCORE comparou a sobrevida entre pacientes de 55-69 anos vs 70-84 anos diagnosticadas no período de 1988-2002 e demonstrou que a sobrevida das pacientes entre 55-69 anos é maior do que no subgrupo das pacientes com mais de 70 anos (Quaglia *et al.*, 2009).

#### **2.4.2. Receptor de estrógeno (RE)**

A expressão do receptor de estrógeno (RE) é sem dúvida o mais importante biomarcador em CM, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino. Tumores RE-positivos usam o esteróide hormonal estradiol como seu principal estímulo para crescimento. RE é, portanto, o alvo direto das terapias endócrinas (Buitrago *et al.*, 2011).

Diferentes estudos confirmam que os pacientes com doença RE-negativo não têm nenhum benefício durante 5 anos tratamento adjuvante com tamoxifeno, mas algum benefício pode ser obtido no grupo de tumores RE-negativo que expressam o receptor de progesterona (RP). O tratamento com tamoxifeno reduz a taxa anual de morte por câncer de mama em 31% na doença de RE positivo (EBCTCG, 1998).

Embora a ausência ou a presença do RE seja utilizado para obtenção de decisões sobre o tratamento, pouca atenção tem sido dada sobre o valor dos níveis de expressão quantitativa como um indicador preditivo. Evidências publicadas a partir de 1970 sugerem uma correlação direta entre os níveis de expressão dos RE e resposta à terapia endócrina (Byar *et al.*, 1979). O *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* relatou que os níveis mais elevados de RE associaram-se a um menor risco de recorrência quando as pacientes receberam tamoxifeno adjuvante (EBCTCG, 1998). Resultados similares foram obtidos no estudo NSABP-14 usando o ensaio de ligante e de expressão de mRNA do RE (Paik *et al.*, 2004).

### 2.4.3. Receptor de progesterona (RP)

A expressão do Receptor de Progesterona (RP) é fortemente dependente da presença de RE. Tumores expressando RP, mas não o RE, são incomuns e representam 1% de todos os casos de câncer de mama (Viale *et al.*, 2007). Por esta razão, tumores com expressão de RP e falta de expressão do RE devem passar por um novo teste para avaliar o RE e eliminar a possibilidade de um falso negativo. Nos raros casos de expressão apenas do RP, alguns benefícios limitados com uso de tamoxifeno foram descritos, por isto a terapia endócrina é ainda amplamente recomendada. A presença de RP em câncer primário de mama está associada com prognóstico mais favorável e tumores mais diferenciados. Além disso, tumores RE+/RP+ respondem a terapias endócrinas melhor do que tumores RE+/RP- em pacientes na pré e pós-menopausa (Bardou *et al.*, 2003; Baum *et al.*, 2003; Obr & Edwards *et al.*, 2012). Vários estudos indicam que a perda de expressão RP em tumores primários está associada com um fenótipo mais agressivo e com pior sobrevida global (Liu *et al.*, 2010), em consequência de alterações nas vias de sinalização do RP como hiperativação da via PI3K/Akt/mTOR. Tumores mamários em ratos transgênicos com superexpressão do coativador AIB1 apresentaram alta expressão do RE, perda da expressão do RP e um aumento da ativação do *insuline-like growth factor I* (IGF-I) na via PI3K/Akt/mTOR (Creighton *et al.*, 2009 ; Torres-Arzayán *et al.*, 2004).

### 2.4.4. Ki-67

Ki-67 é uma proteína nuclear que não é expressa nas células em repouso (G0), mas pode ser detectada na fase G1 e M do ciclo celular. Sua utilização como um marcador de proliferação celular mostrou que o percentual de células positivas para Ki-67 pode ser usado para estratificar pacientes como de bom prognóstico ou grupos de mal prognóstico (Brown *et al.*, 1996; Molino *et al.*, 1997). (Figura 2).

O anticorpo monoclonal MIB-1 reconhece o Ki-67, e pode ser usado em peças fixadas em formalina ou em seções do tecido de blocos de parafina. Vários estudos têm sugerido que o MIB-1 pode ter maior valor preditivo do que anti-Ki-67 (Buitrago *et al.*, 2011).

O Ki-67 pode ser considerado como um fator de proliferação facilmente avaliado e reprodutível, e pode ser uma alternativa ou complemento ao grau histológico como uma ferramenta de prognóstico e para a seleção do melhor tratamento adjuvante (Marie *et al.*, 2010).

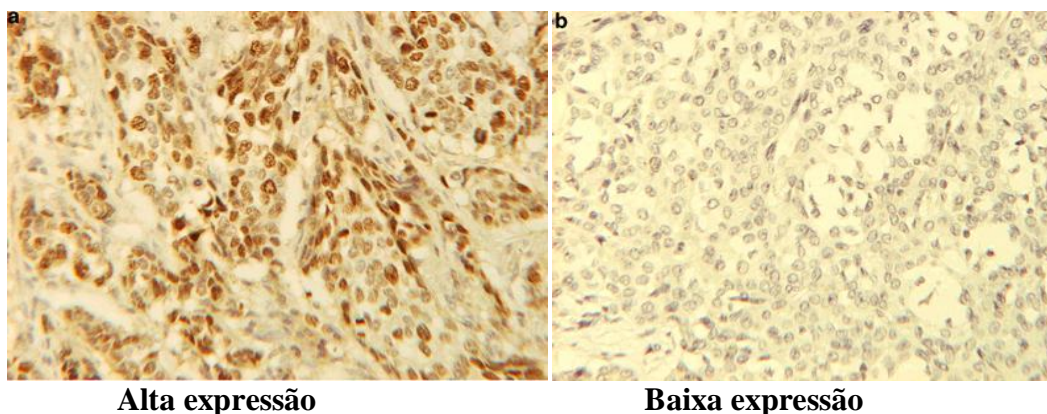


Figura 2. Ki-67– Proliferação Celular (Tan *et al.*, 2005). Figura 2a. Alta expressão de Ki-67. Figura 2b. Baixa expressão do Ki-67.

#### 2.4.5. Grau histológico

A graduação histológica Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis e conhecida como o Sistema de Classificação de Nottingham (SCN) (Elston & Ellis, 1991) é o sistema de gradação recomendado por vários organismos profissionais em nível internacional, como a Organização Mundial de Saúde (OMS), American Joint Committee on Câncer (AJCC), da União Europeia (UE) e do Royal Colégio de Patologistas (RCPATH, UK) (Tavassoli & Devilee, 2003). A relevância e prognóstico do SCN em câncer de mama foram inicialmente demonstrados em 1991 (Elston & Ellis, 1991) e foi validado posteriormente, em vários estudos independentes (Simpson *et al.*, 2000; Lundin *et al.*, 2001).

O SCN (Tabela 1) é baseado em padrões morfológicos como formação tubular, pleomorfismo nuclear e número de mitoses, designando como valor 1 (favorável) a 3 (desfavorável) para cada característica.

Tabela 1. Sistema de Graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis .

Característica	Score
<b>Formação tubular</b>	
Alta Formação tubular (>75%)	1
Moderada formação tubular (10-75%)	2
Baixo grau ou nenhuma formação tubular (<10%)	3
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	
Baixo (células pequenas uniformes, núcleos regulares)	1
Moderado (aumento moderado do tamanho e variabilidade)	2
Acentuado pleomorfismo e variação nuclear	3
<b>Contagem mitótica</b>	
0-5	1
6-10	2
>11	3

(Elston & Ellis, 1991).

Após, os escores destas três categorias são somados, obtendo-se os escores combinados (Figura 3):

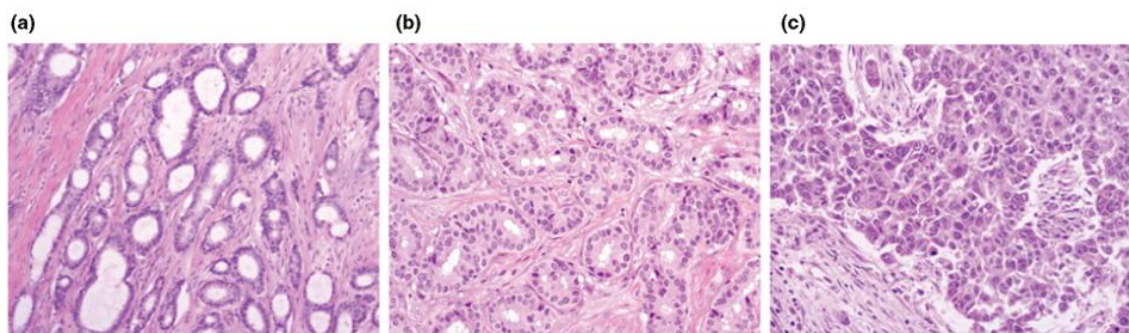


Figura 3. Sistema de Graduação de Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston e Ellis (Rakha *et al.*, 2010). Figura 3a. 3 a 5 pontos = GRAU 1 ou bem diferenciado. Figura 3b. 6 a 7 pontos = GRAU 2 ou moderadamente diferenciado. Figura 3c. 8 a 9 pontos = GRAU 3 ou pouco diferenciado.

Estudos demonstraram que pacientes com grau histológico 1 têm melhor prognóstico como foi descrito na pesquisa de Henson *et al.* (1991) que descreveram que pacientes com tumores de grau 1 com tamanhos inferiores a 2 cm tinham um excelente



prognóstico, com 99% de sobrevida em 5 anos, mesmo quando apresentavam linfonodos axilares positivos. Estes resultados são apoiados por um estudo do grupo de Nottingham (Rakha *et al.*, 2008), que incluiu 2.219 casos de CM operáveis e seguimento a longo prazo. O grau histológico é considerado um fator prognóstico de relevância seja independente ou em combinação com o estado linfonodal e o tamanho tumoral.

#### 2.4.6. Infiltração intratumoral de linfócitos (IIL)

Evidências sugerem que o sistema imune influencia no prognóstico do câncer de mama (Demaria *et al.*, 2011). A infiltração intratumoral de linfócitos (IIL) no câncer de mama foi descrita décadas atrás, sendo mais proeminente em tumores mais agressivos e com alta proliferação celular a exemplo de tumores HER-2 positivos e CMTN. Recentemente, estudos randomizados demonstraram que a presença de IIL está associada à maiores taxas de resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante (Adams *et al.*, 2014), bem como uma maior sobrevida livre de doença e uma maior sobrevida global após quimioterapia adjuvante (Loi *et al.*, 2013) (Figura 4).

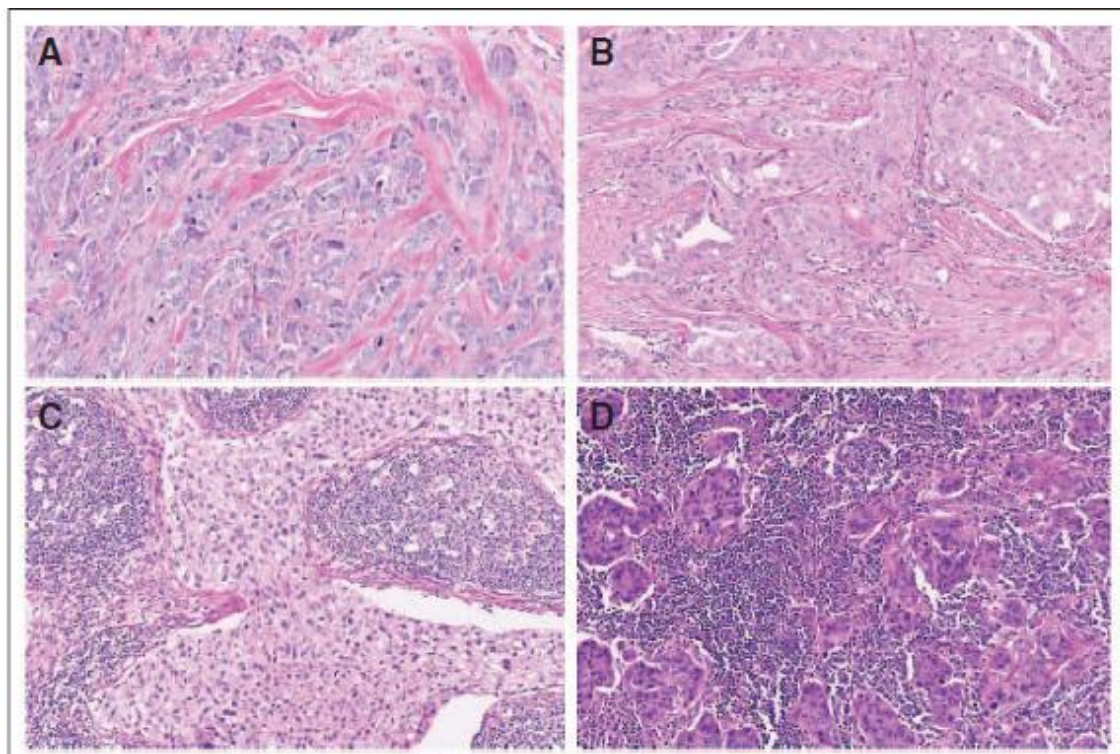


Figura 4. Câncer de Mama– Graus variados de Infiltração Intratumoral de Linfócitos em aumento 10X (IIL) (Adams *et al.*, 2014). Figura 4A: IIL 0%, Figura 4B: IIL 20%, Figura 4C: Formação de folículos linfóides e Figura 4D: IIL 80%.

No câncer, a transformação neoplásica altera a estrutura de tecidos e induz respostas imunes que conduzem à eliminação de tumores em desenvolvimento. No entanto, a eliminação incompleta das células resulta no descontrole do sistema imunológico. Este processo é conhecido como *Immunoediting* e é suportado por diversas evidências clínicas que mostram que o sistema imune intacto pode prevenir e controlar o câncer através da geração de respostas imunes tumor-específicas. *Immunoediting* descreve o processo de progressão maligna com base no tumor e as interações das células do sistema imune em três fases: (1) *eliminação*, onde células do tumor são eliminadas pela imunovigilância; (2) *equilíbrio*, em que as células do câncer estão sob controle, mas não são eliminadas pelo sistema imune; e (3) *escape*, em que modificações nas células tumorais impulsionam a progressão da doença (Dushyanthen, 2015).

Estudos pré-clínicos sugerem que os agentes citotóxicos podem exercer parcialmente a sua atividade antitumoral por indução da resposta imune contra células tumorais (Apetoh *et al.*, 2007; Andre *et al.*, 2013). A morte celular imunogênica induzida por agentes citotóxicos permite apresentação cruzada de antígenos, ativação de células dendríticas e indução de células T citotóxicas tumor-específicas. Alguns estudos sugeriram que os agentes citotóxicos, incluindo antraciclina e taxanos, poderiam induzir uma resposta imune tumor-específica e alguns desses fármacos poderiam levar à atração de linfócitos no leito tumoral (Demaria *et al.*, 2001; Ladoire *et al.*, 2011)

Dieci *et al.* (2014), em seu estudo recente, demonstram que a presença de IIL na doença residual pós-quimioterapia neoadjuvante está associado a um melhor prognóstico em pacientes com CMTN.

#### **2.4.7. Human epidermal growth factor receptor (HER-2)**

O gene HER-2 (human epidermal growth factor receptor 2) pertence à família ErbB de receptores tirosina-quinase e é superexpresso e/ou amplificado em 20-30% dos carcinomas invasivos de mama (Cho *et al.*, 2003; Owens *et al.*, 2004). Em modelos pré-

clínicos, a superexpressão e/ou amplificação do HER-2 foi associada com resistência à radioterapia (Liang *et al.*, 2003) e a uma agressividade fenotípica intrínseca (Voduc *et al.*, 2010).

Trastuzumabe é um anticorpo monoclonal composto por dois sítios específicos de antígenos que se ligam à porção de justamembranar do domínio extracelular do receptor HER-2 e evita a ativação da tirosina-quinase intracelular (Albanell *et al.*, 1996; Valabrega *et al.*, 2007).

A aprovação do trastuzumabe como tratamento *standard* para pacientes com CC HER-2 positivos em estágio inicial já foi bem fundamentada através de trials clínicos, mostrando aumento da sobrevida livre de doença (SLD) de 46-52% (Romond *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2007).

## 2.5. Radioterapia

A radioterapia teve uma evolução surpreendente nas últimas décadas. Em 1951, em Ottawa, no Canadá, foi produzido o primeiro equipamento emissor de fótons de megavoltagem, disponível comercialmente. Conhecido como telecobaltoterapia, foi o primeiro a ser utilizado em larga escala na prática clínica. Hoje vem sendo substituído por aceleradores lineares, que dirigidos por poderosos softwares, são capazes de emitir a radiação de forma mais segura e precisa. O tipo de radiações utilizadas no tratamento de pacientes oncológicos são as radiações ionizantes, capazes de promover alterações na estrutura e formação da fita de DNA (Bronzzatt *et al.*, 2011).

Outra forma de radioterapia que vem ganhando força na oncologia é a radioterapia intraoperatória, ou seja, a radioterapia é administrada durante o ato cirúrgico em casos bem selecionados, reduzindo o tempo total de tratamento de 6 semanas (tratamento tradicional) para poucos minutos durante o ato cirúrgico após a retirada do tumor.

O emprego de uma CC, ou seja, com retirada do tumor e preservação da mama, implica obrigatoriamente na utilização de radioterapia para a eliminação de eventuais células tumorais residuais, realizada geralmente após o término da quimioterapia quando esta é indicada, em cinco sessões por semana, com duração média de cinco a seis semanas. A radioterapia apresenta um papel de destaque após o tratamento conservador, sendo demonstrado com um grande número de pacientes que diminui a



recidiva tumoral em torno de 17-19% em 5 anos e com benefício em sobrevida em torno de 5% em 15 anos de seguimento (EBCTCG, 2005). Já nas pacientes que foram submetidas à mastectomia (retirada da mama), a radioterapia é indicada em casos específicos: em pacientes com tumores maiores que 5 cm, com margens comprometidas ou quando apresentam comprometimento de linfonodos axilares (Bronzzatt *et al.*, 2011).

Durante a radioterapia, um terço das pacientes apresenta algum tipo de reação adversa, geralmente de grau leve, não comprometendo a atividade cotidiana das pacientes, diferentemente dos efeitos colaterais da quimioterapia que tendem a ser mais pronunciados. As reações geralmente são fadiga, ressecamento da pele, eritema cutâneo prurido e descamação, sintomas estes geralmente de leve intensidade e transitórios. A radioterapia teve uma evolução surpreendente nas últimas décadas, caminhando junto com a evolução tecnológica, havendo melhoria dos equipamentos e das técnicas de irradiação o que diminuiu substancialmente os seus efeitos colaterais, sendo atualmente considerado um tratamento seguro e com pouca morbidade (Bronzzatt *et al.*, 2011).

## **2.6. Tratamento Sistêmico**

### **2.6.1. Hormonioterapia**

O estrógeno desempenha papel fundamental no desenvolvimento do CM. A hormonioterapia bloqueia ou reduz as concentrações de estrógenos, impedindo que os hormônios cheguem às células cancerígenas que dependem de estrógeno e/ou progesterona. Por isso, essa modalidade de tratamento está indicada em pacientes com tumores hormônio-positivos, sendo altamente eficaz, diminuindo o risco de recidiva e aumentando o tempo de sobrevida dessas pacientes (Shimada *et al.*, 2011).

O tratamento comumente é preconizado com o uso de moduladores seletivos de receptor de estrógeno (MSREs), podendo funcionar como agonistas, antagonistas ou agonistas/antagonistas, dependendo do tecido-alvo em que irão agir. Dentre eles, o tamoxifeno foi o mais estudado e utilizado nos trabalhos de adjuvância. Esta droga atua por meio de inibição que exerce sobre o crescimento das células tumorais por antagonismo competitivo nos RE do tecido mamário (Baum *et al.*, 2002)

Outra classe de drogas frequentemente utilizada em tumores com expressão de receptores hormonais é o inibidor de aromatase (IA), que inibem a conversão de androgênio em estrogênio nos tecidos periféricos através da inibição enzimática da

aromatase. Os representantes desta classe comercialmente disponíveis são o anastrozol, o letrozol e o exemestano (Shimada *et al.*, 2011).

### **2.6.2. Quimioterapia**

A quimioterapia nada mais é que um medicamento citotóxico, eliminando principalmente as células de crescimento rápido, o que inclui as células cancerígenas e alguns tipos de células saudáveis do corpo, por isso os efeitos colaterais. Existem inúmeros medicamentos quimioterápicos e cada uma tem a sua indicação precisa, bem como efeitos colaterais específicos. Normalmente é administrada em ciclos com pausa entre eles, que dependem de cada medicação, os ciclos comumente são semanais, a cada três semanas ou a cada quatro semanas (Goldhirsch *et al.*, 2009).

O tratamento quimioterápico pode ser dividido em: neoadjuvante, adjuvante e paliativo. O tratamento adjuvante refere-se à administração de quimioterapia sistêmica que sucede o tratamento cirúrgico, com o intuito de prevenir e/ou retardar a recidiva da doença. O termo neoadjuvância representa o tratamento sistêmico que antecede a cirurgia e visa à redução do tumor, das metástases nodais e das micrometástases, aumentando a chance de operabilidade ou de cirurgias menos radicais. A quimioterapia paliativa é realizada quando há a presença de metástases à distância, com o objetivo de aumentar a sobrevida e/ou melhorar a qualidade de vida da paciente (Simon *et al.*, 2011).

### **2.7. Subtipos moleculares**

O CM é uma neoplasia heterogênea caracterizada por alterações moleculares (Perou *et al.*, 2000). Processos biológicos específicos, vias de sinalizações distintas e diferentes subtipos moleculares estão associados com diferentes prognósticos e sensibilidade às terapias disponíveis (Prat & Perou, 2011). Até recentemente, os tumores de mama eram classificados utilizando-se apenas fatores prognósticos tradicionais, como *status* linfonodal, tamanho do tumor, subtipo histológico e grau histológico, além do estadiamento clínico da doença, os quais isoladamente têm limitada capacidade preditiva.

O advento da tecnologia de microarranjos de DNA e a análise paralela de

diversos genes nos permitiu correlacionar perfis de expressão gênica aos desfechos clínicos das pacientes. Pesquisadores analisaram mais de oito mil genes e identificaram inicialmente cinco subtipos: luminal A, luminal B, HER-2 superexpresso, triplo negativo e mama-normal símile. Porém, devido à dificuldade em realizar esses testes na prática clínica, painéis imunoistoquímicos têm sido propostos para a identificação desses subtipos, buscando reproduzir os perfis de expressão gênica (Goldhirsch *et al.*, 2011).

Os Consensos de Saint Gallen em 2013 recomendaram a adoção do painel de RE, RP, HER-2 e a pesquisa do Ki-67, o qual avalia a atividade proliferativa e que melhor caracteriza os tumores luminais no intuito de identificar os subtipos moleculares por aproximação através da imunoistoquímica (Goldhirsch *et al.*, 2013) (Tabela 2).

O subtipo molecular luminal A representa aproximadamente 60% dos casos dos carcinomas de mama e tem o melhor prognóstico. Na sua maioria, são tumores que apresentam receptores de estrógenos e progesterona fortemente expressos, baixo grau histológico, baixo índice de proliferação (Ki 67 <14%) e HER-2 negativo. Os anties-trogênicos, tamoxifeno e IA, são as terapias alvo-específicas fundamentais para o seu tratamento sistêmico. Existe forte evidência de que a quimioterapia não adiciona benefícios quando comparada à hormonioterapia exclusiva nessa subpopulação. O estudo *IBCSG (International Breast Cancer Study Group) IX trial* realizado em pacientes pós-menopáusicas, com axila negativa e receptores hormonais positivos revelou que o grupo tratado com Ciclofosfamida, Metotrexato e 5-Fluorouracil não apresentou benefício comparado ao grupo que usou hormonioterapia exclusiva. Adicionalmente, no estudo correspondente em pacientes pré-menopáusicas (*IBCSG VIII trial*) também não foi encontrado benefício com adição de quimioterapia ao tratamento adjuvante das pacientes cujos tumores tinham superexpressão de receptores hormonais e baixo índice de proliferação (Aebi *et al.*, 2011).

Os tumores do subtipo luminal B possuem, em sua maioria, receptores hormonais positivos, embora por vezes esses sejam expressos em baixos níveis e não raramente apresentem alto índice proliferativo. São caracterizados por expressarem genes associados ao HER-2 e a um maior número de genes de proliferação celular. São tumores de pior prognóstico comparados aos luminais A (Goldhirsch *et al.*, 2013).

Tabela 2. Subtipos Moleculares definidos no Consenso de Saint Gallen 2013.

Subtipo molecular	Características
Luminal A	Luminal A RE* e/ou RP** positivo, >ou igual a 20% HER-2*** negativo Ki-67 baixo (<14%)
Luminal B	Luminal B – HER2 negativo RE* e/ou RP*** positivo, <20% HER2*** negativo Ki-67 alto (≥14%) Luminal B – HER2 positivo RE* positivo HER-2*** superexpresso ou amplificado Qualquer valor de Ki-67 ou RP**
HER-2 superexpresso	HER-2 não luminal RE* e RP** negativo HER-2*** superexpresso ou amplificado
Triplo Negativo	Triplo Negativo RE* e RP** negativo HER-2*** negativo ou não amplificado

\* RE: Receptor de estrógeno. \*\*RP: Receptor de progesterona. \*\*\*HER-2: Human epidermal growth factor receptor. (Goldhirsch *et al.*, 2013).

### 2.7.1. Carcinoma Mamário Triplo Negativo (CMTN)

O CM é uma doença heterogênea, que engloba vários perfis moleculares distintos, com diferentes comportamentos clínicos e respostas à terapia. Em particular, os CMTN representam cerca de 10% a 17% de todos os cânceres de mama, são caracterizados por serem tumores pouco diferenciados, sem expressão imunoistoquímica de RE, RP, e HER-2, apresentam alta proliferação celular, maior agressividade e um risco maior de recidiva locorregional em comparação com outros subtipos moleculares (Nishimura & Arima, 2008; Bauer *et al.*, 2007).

A história natural da CMTN é caracterizada por um risco aumentado de recorrência à distância nos primeiros 3-5 anos após o diagnóstico seguido de um rápido declínio do risco de recidiva após esse período (Liedtke *et al.*, 2008; Dent *et al.*, 2009). O tratamento padrão do CMTN em estágios iniciais é baseado em regimes quimioterápicos contendo antraciclinas em combinação com taxanos, embora esse tratamento padrão seja baseado em dados de grandes ensaios clínicos em mulheres com câncer não selecionadas para um subtipo molecular específico (Citron *et al.*, 2003).

Os CMTN apresentam uma incidência maior de mutações no gene BRCA1 e BRCA2 (Palma *et al.*, 2015; Metzger-Filho *et al.*, 2012), incluindo diversos subtipos (Figura 5). O genes BRCA1 e 2 são importantes genes supressores de tumor que desempenham um papel crucial na reparação do DNA, a sua ausência é observada em 5% de todos os pacientes com CM. Mutações nos genes BRCA1 e 2 são pouco frequentes no CM. No entanto, há uma incidência elevada de mutações germinativas em BRCA 1 ou 2 especificamente em pacientes com CMTN, correspondendo a cerca de 20%. (Gonzalez-Ângulo *et al.*, 2011).

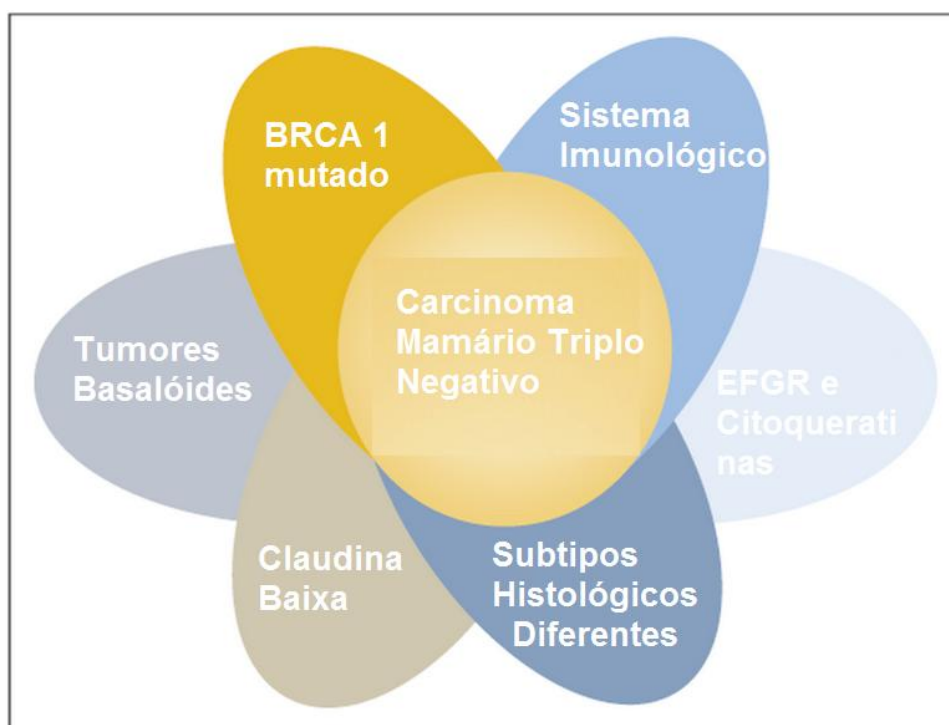


Figura 5. Subtipos no Carcinoma Mamário Triplo Negativo (Metzger-Filho *et al.*, 2012-Adaptado).

## 2.8. Receptor de andrógeno (RA)

Há um número crescente de estudos evidenciando o RA como um marcador de prognóstico particularmente entre pacientes com CM com RE positivo e como preditor da resposta a hormonioterapia (Castellano *et al.*, 2010; Collins *et al.*, 2011; Park *et al.*, 2010; Hu *et al.*, 2011). Em pacientes com CM metastático, a sobrevida mediana após a recorrência da doença foi significativamente maior em paciente com tumores com expressão de RA (Schippinger *et al.*, 2006).

Novos alvos terapêuticos são particularmente necessários para CMTN devido à ausência de terapias anti-hormonais convencionais e agentes bloqueadores anti-HER2 neste grupo (Gucalp *et al.*, 2010; Schneider *et al.*, 2008). Na atualidade, tem havido um interesse substancial em identificar novas opções terapêuticas para CMTN, sendo o RA um possível alvo molecular. O RA é frequentemente coexpresso com RE, RP e/ou HER-2, com uma frequência de 6,6-75% entre os casos de CMTN (Safarpour *et al.*, 2014). Moinfar *et al.* (2003) encontrou expressão RA em 88% dos cânceres de mama invasivos grau 1 em comparação com 47% dos tumores de grau 3. Embora a taxa de expressão relatada para RA tenha variado amplamente, provavelmente devido aos diferentes pontos de corte utilizadas em diversos estudos, a expressão RA em CMTN tem valor prognóstico e tem sido associada a um menor tamanho tumoral, menor grau histológico, estágios clínicos mais iniciais, menor taxa mitótica, menor índice de proliferação avaliado pelo Ki-67 e a tumores menos agressivos (McNamara *et al.*, 2013; Witzel *et al.*, 2013). Em contrapartida, a menor expressão de RA se correlaciona com o aparecimento precoce de metástases, menor intervalo livre de doença e menor sobrevida (McNamara *et al.*, 2011; Witzel *et al.*, 2013). Além disso, a superexpressão do RA está relacionada à resistência ao tamoxifeno no CM em modelos *in vitro* e *in vivo* (De Amicis *et al.*, 2010).

Considerando a disponibilidade de inibidores de andrógenos na prática clínica, como por exemplo, a bicalutamida e a enzalutamida, a investigação de RA como um possível alvo molecular no tratamento do câncer de mama é de crucial importância (Park *et al.*, 2010). A bicalutamida atualmente está sob investigação em ensaios clínicos fase II em pacientes com CM metastático RE+/RA+ (Gucalp *et al.*, 2013). Em ensaios pré-clínicos, utilizando linhagem celulares, Cochrane *et al.* (2014) demonstraram que a

enzalutamida e a bicalutamida inibiram a proliferação celular em linhagens celulares do câncer *in vitro* de mama mediada pela 5-alfa-dihidrotestosterona (DHT). Já a enzalutamida inibiu a proliferação mediada pelo estradiol (E2) de células de câncer de mama RE+/RA+. Em xenoinxertos com células MCF7 (ER+/AR+), a enzalutamida inibiu o crescimento celular conduzido pelo E2 tão eficiente quanto o tamoxifeno devido a diminuição da proliferação celular. Além disso, a enzalutamida também inibiu o crescimento tumoral conduzido pelo DHT. Já em xenoinxertos com linhagens celulares MCF7 (RE positivo) e MDA-MB-453 (RE negativo) devido o aumento da apoptose (Cochrane *et al.*, 2014).

Em um estudo avaliando 2.171 pacientes com CM, 77% foram RA+ por imunoistoquímica (Collins *et al.*, 2011). Entre os subtipos, 88% de tumores RE+, 59% de HER-2+, e 32% dos CMTN (RE-/RP-/HER-2-) foram positivos para a expressão do RA por imunoistoquímica (Collins *et al.*, 2011). Semelhante ao RE e RP, a expressão do RA está associada a tumores bem-diferenciados (Park *et al.*, 2010) e mais indolentes (Hu *et al.*, 2011).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

O estudo foi de delineamento transversal e retrospectivo, realizado mediante revisão sistemática de prontuários médicos eletrônicos, preenchidos por ocasião do estudo histopatológico de material obtido por biopsias e/ou peças cirúrgicas com carcinoma ductal invasivo, no Laboratório Diagnóstico de Patologia e Citopatologia, na cidade de Caxias do Sul, no período de 01 de janeiro de 2012 a 30 de junho de 2014.

Em 2012, foi publicada a quarta edição da classificação de tumores de mama da Organização Mundial de Saúde (OMS). Em relação aos tumores invasivos, são reconhecidos o carcinoma mamário invasivo de tipo não especial e mais de 20 tipos histológicos especiais com características clinico-patológicas, histórias naturais e respostas terapêuticas distintas. Usualmente identificado na prática médica como carcinoma ductal invasivo (CDI), o CDI de tipo não especial corresponde a cerca de 50-80% dos casos, sendo definido como uma neoplasia epitelial mamária invasiva que não preenche critério para nenhum tipo especial. Portanto, por definição, é essencialmente diagnóstico de exclusão de outros tipos histológicos e constitui um grupo de tumores

bastante heterogêneo (Lakhani *et al.*, 2012).

Os perfis imunoistoquímicos foram revisitados e foram selecionadas as pacientes que apresentavam o fenótipo triplo negativo, ou seja, aqueles que não expressavam receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e tampouco a superexpressão e/ou amplificação para o gene HER-2-neu. No subgrupo identificado como CMTN, a expressão do RA foi analisada por imunoistoquímica (IMH). Após a coleta desses dados, a expressão de RA foi correlacionada com as características referentes à idade do paciente, grau histológico, infiltração intratumoral de linfócitos (IIL) e Ki-67. Esse projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de Ensino e Pesquisa da Associação Cultural e Científica Virvi Ramos em 18/09/2013 (Número do parecer: 383.616).

### **3.1. Critérios de inclusão**

Mulheres com diagnóstico de carcinoma ductal invasor de mama com fenótipo triplo negativo, ou seja, não expressavam receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e não apresentavam superexpressão e/ou amplificação para o gene HER-2.

### **3.2. Critérios de exclusão**

Foram excluídas as pacientes que não apresentaram todas as informações devidamente preenchidas sobre as características clinico-patológicas necessárias para a análise estatística.

### **3.3. Análise estatística**

Após coletadas as informações, os dados foram tabulados e analisados com o auxílio do programa SPSS (Statistical Package for Social Sciences) versão 17.0. Para a análise estatística foram utilizadas médias, desvios-padrões e teste *t* de Student para variáveis numéricas, e qui-quadrado para variáveis categóricas com intervalo de confiança de 95% (IC 95%). Foi adotado nível de significância (alfa) de 5%.



### 3.4. Análise imunoistoquímica (IMH)

RA, RE, RP, HER-2 e antígeno Ki-67 foram avaliados com os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal (AcM) de camundongo (AR441, diluição 1/50, Dako, Glostrup, Dinamarca) para RA, AcM para RE (Dako, Glostrup Dinamarca diluição 1/100), MAb para RP (Dako diluição 1/800), MAb MIB-1 para antígeno Ki-67 (Immunontech, Marselha França, 1/2000) e anti-soro policlonal (Dako diluição 1/3200) com a proteína HER-2 para o gene HER-2-neu (Tabela 3).

Tabela 3. Anticorpos usados no estudo imunoistoquímico.

Anticorpo	Clone	Diluição	Fabricante
RA	AR 441	1:50	Dako
RE	PPG5/ 10	1:100	Dako
RP	PgR 636	1:800	Dako
HER-2	K5207	1:3200	Dako
Ki-67	MIB-1	1:2000	Immunontech

Para o RE e RP foi considerado positivo a marcação nuclear de qualquer intensidade em  $\geq 1\%$  das células tumorais como preconizado pela ASCO/CAP (American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists). (Deyarmin *et al.*, 2013). Para o estudo imunoistoquímico do HER2 foram também utilizados os critérios estabelecidos pela ASCO/CAP (Tabela 4). (Wolff *et al.*, 2013). Sendo considerados os estudos imunoistoquímicos HER-2 negativos: o escore 0 e o escore 1+, HER-2 indeterminado: escore 2+ e HER-2 positivo: Escore 3+.

Tabela 4. Critérios estabelecidos pela ASCO/CAP para o estudo imunoistoquímico do HER-2.

<b>HER-2</b>	<b>Descrição</b>
Escore 0	Nenhuma coloração observada ou coloração de membrana incompleta e fraca/pouco perceptível em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas
Escore 1+	Coloração de membrana incompleta e fraca/pouco perceptível em $> 10\%$ das células tumorais invasivas.
Escore 2+	Coloração de membrana circunferencial incompleta e/ou fraca/moderada em $> 10\%$ das células tumorais invasivas; ou coloração de membrana completa e circunferencial intensa em $\leq 10\%$ das células tumorais invasivas.
Escore 3+	Coloração de membrana circunferencial completa e intensa em $> 10\%$ das células tumorais invasivas

Recomendações ASCO/CAP (Wolff *et al.*, 2013).

Todos os casos HER2 positivos 2+ foram submetidos ao teste de FISH para pesquisa da amplificação do gene HER2 conforme recomendação da ASCO-CAP. Foram utilizadas duas sondas de DNA de cores vermelha e verde correspondendo ao HER2 e ao centrômero do cromossomo 17 (CEN-17) respectivamente. Foi considerado amplificado quando a relação HER2/CEN-17 for superior a 2.2 conforme recomendação do ASCO/CAP (Wolff *et al.*, 2013).

Após a seleção dos casos, os blocos de parafina foram resfriados a 10°C, sendo realizados novos cortes de 3µm e montados sobre lâminas identificadas com etiquetas com código de barras, que permaneceram durante 1 hora na estufa para desparafinação e hidratação das mesmas. A seguir, as lâminas permaneceram no equipamento PTlink, sendo efetuada a recuperação antigênica em *EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH* (Dako), a 97°C por 20 minutos.

As lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente em *EnVision™ FLEX Wash Buffer* (Dako). As avaliações imunoistoquímicas foram feitas no equipamento

Autostainer Link 48 (Dako) através de um processo automatizado, constituído por diversas etapas. As lâminas foram lavadas sucessivamente com Tampão Wash Buffer (20x) marca Dakon com diluição 1:20 utilizando 50 ml de tampão e 950 ml de água destilada após pipetagem e incubação de cada reagente. Os reagentes pipetados automaticamente e incubados foram Flex Peroxidase block por 5 minutos, anticorpo Receptor de Andrógeno (Monoclonal Mouse Anti-Human Androgen Receptor AR 441) por 20 minutos e Polímero por 20 minutos HRP Envision DAKO. As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO, Liquid DAB+) por 10 minutos e na sequência, os cortes foram contra-corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos e mergulhados sucessivamente em banhos de álcool absoluto e xilol. E finalmente, foram acopladas lamínulas sobre as lâminas através de aparelho específico da marca Dako.

As imagens dos cortes histológicos foram digitalizadas através do microscópio *Leica DME*, acoplado ao sistema de câmera de vídeo *Leica EC3* e com sistema analisador de imagens Application Suite EZ. A avaliação imunoistoquímica do receptor do androgênio foi realizada classificando a intensidade e a porcentagem da marcação cromogênica através de um sistema de pontuação denominado ESCORE-H (Atkins *et al.*, 2004) que varia de 0 a 300, baseada em fórmula matemática descrita a seguir:  $ESCORE-H = PCNC \times 0 + PCFC \times 1 + PCMC \times 2 + PCIC \times 3$ . (PCNC - Porcentagem de células não coradas; PCFC - Porcentagem de células fracamente coradas; PCMC - Porcentagem de células moderadamente coradas; PCIC - Porcentagem de células intensamente coradas) (Figura 6).

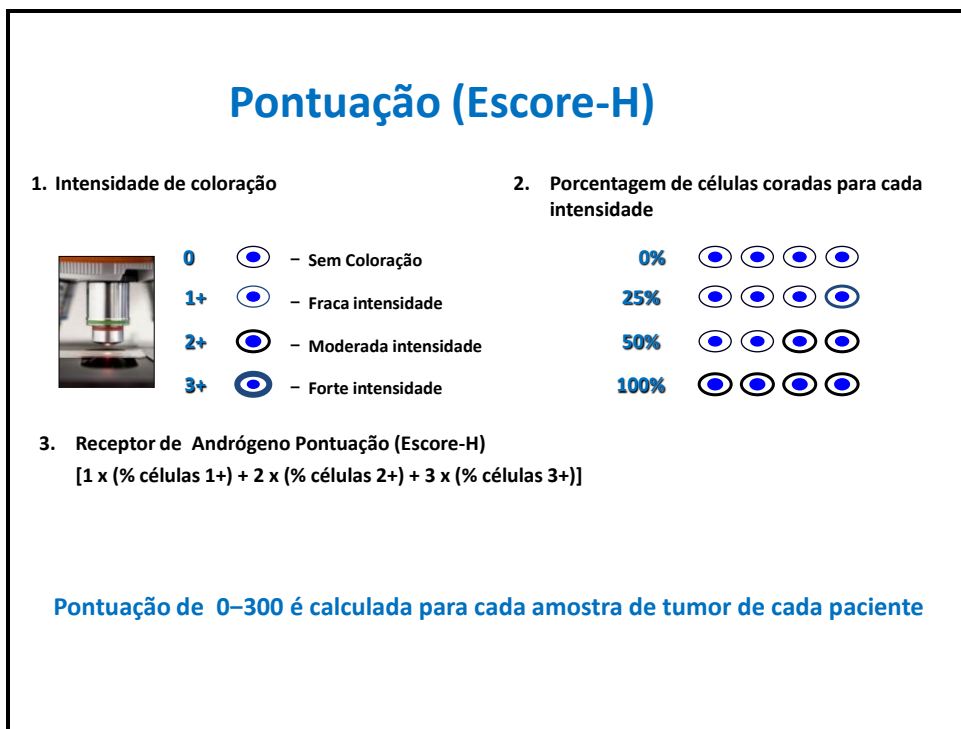


Figura 6. Escore-H (Atkins *et al.*, 2004).

A expressão de RA foi considerada fraca quando  $\text{Escore-H} \leq 150$  e foi considerada forte quando  $\text{Escore-H} > 150$ . A avaliação do Escore-H foi realizada por dois patologistas, sendo esse sistema de pontuação exemplificado nas Figuras 7, 8 e 9.



Figura 7. Expressão do RA ausente.

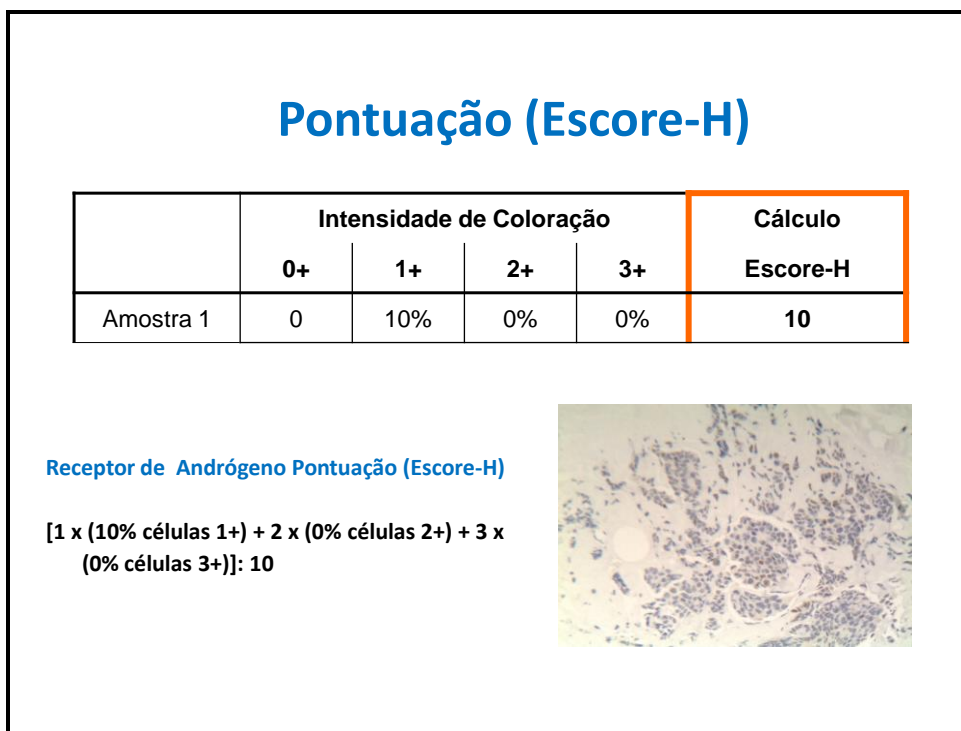


Figura 8. Expressão do RA fraca (Escore-H $\leq$ 150)

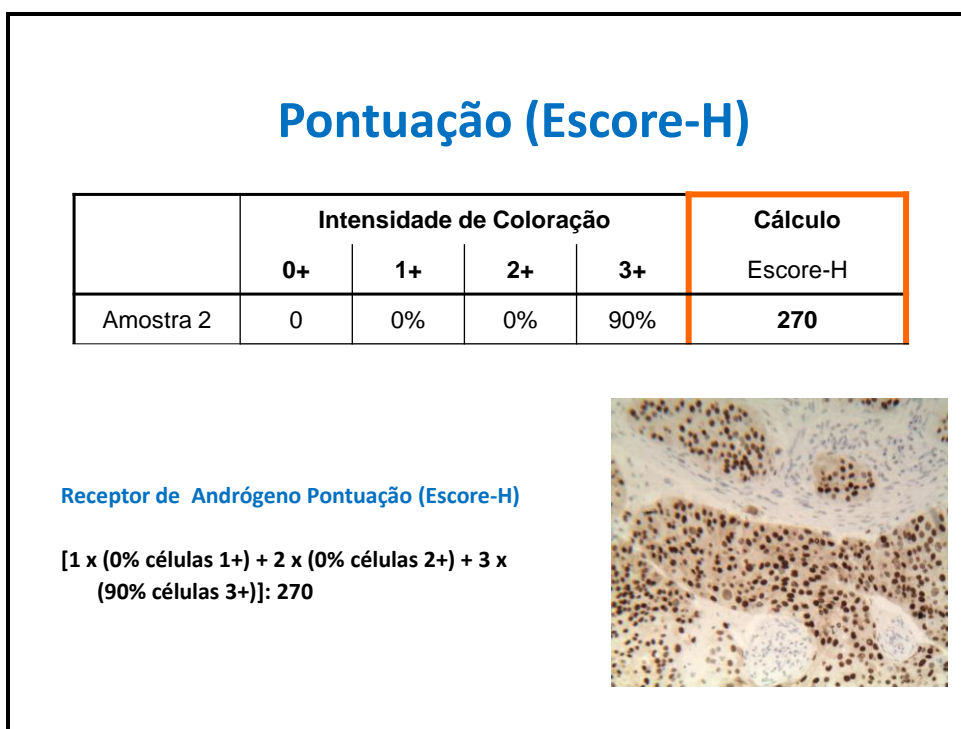


Figura 9. Expressão do RA forte (Escore-H $>$ 150)

A análise da porcentagem de IIL foi realizada através de um corte do tumor emblocado em parafina e corado por Hematoxilina e Eosina (HE) e foi definida como a porcentagem de linfócitos em contato direto com células tumorais.

#### **4. RESULTADOS**

No período do estudo foram analisadas 314 pacientes portadoras de carcinoma ductal invasor de mama, sendo selecionadas 34 pacientes com CMTN (10,8%), sendo 24 referentes a biópsias percutâneas e 10 referentes a peças cirúrgicas. (Figura. 10). Todas as pacientes com CMTN eram do sexo feminino, com média de idade de 51,9 anos (30 a 82 anos). A expressão de RA através de IMH foi negativa para 23 casos (68%) e positiva para 11 casos (32%). Dos casos positivos para RA, a expressão foi considerada fraca (Escore-H  $\leq$ 150) em 6 casos e forte (Escore-H  $>$ 150) em 5 casos. (Figura. 11). A maioria dos tumores apresentou Ki-67 elevado, com índice acima de 50% em 72% (n=8/11 casos) das pacientes. O estudo do grau histológico tumoral revelou que todos os casos apresentavam um índice de diferenciação elevado, ou seja, 28 (82%) tumores eram indiferenciados (GIII) e 6 (18%) eram moderadamente diferenciados (GII).

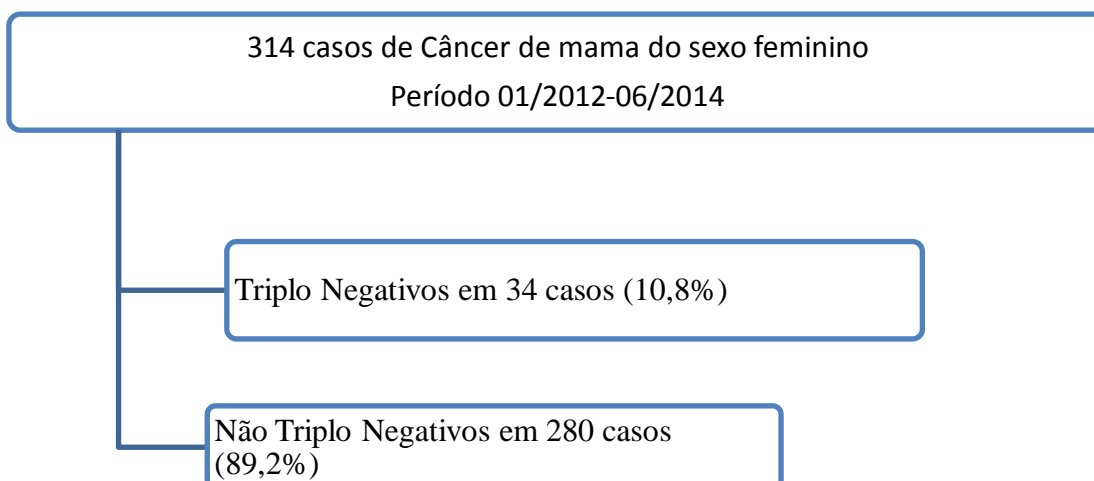


Figura 10. Fluxograma das pacientes selecionadas com câncer de mama

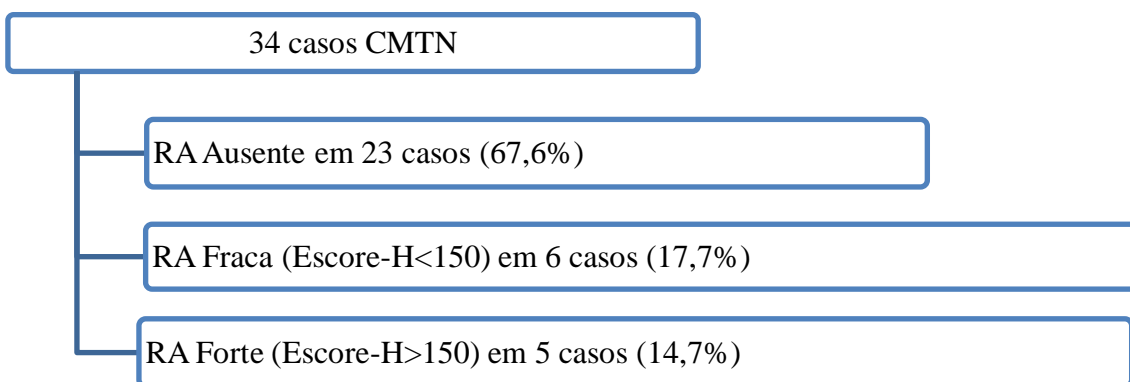


Figura 11. Fluxograma das pacientes selecionadas com câncer de mama triplo negativo

A análise dos resultados apresentados na tabela 5 apontou uma média da idade maior no grupo RA positivo (55,3 anos) quando comparado ao grupo RA negativo (50,5 anos), ainda sem significância estatística. Diante dos dados apresentados sobre a idade das pacientes portadoras CMTN com expressão do receptor androgênico, pode-se observar que 72,8% (n=8/11 casos) apresentavam idade superior a 50anos (p=0,038).

Tabela 5. Expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras CMTN e correlação com idade.

Variável	Expressão do receptor androgênico				p
	Sim n=11		Não n=23		
	n	%	n	%	
Idade					0,038
30-34	3	27,3	2	8,7	
35-39	-	-	5	21,7	
40-44	-	-	2	8,7	
45-49	-	-	3	13	
50-54	2	18,2	4	17,4	
55-59	2	18,2	1	4,3	
60-64	1	9,1	-	-	
65-69	-	-	3	13	
>70	3	27,3	3	13	
Média	55,3±18,7		50,5±13,7		NS

p<0,05 foi considerado significativo. NS= não significativo estatisticamente.

O estudo da variável Ki-67 no grupo de pacientes portadoras CMTN (tabela 4), demonstrou que a média da expressão do antígeno Ki-67 foi menor no grupo RA positivo (43,6±22,9%) quando comparado ao grupo RA negativo (65±20,9%) (p<0,011). Observou-se associação estatística significativa entre o grupo de RA positivo e a expressão do antígeno Ki-67 inferior a 50% (p<0,038).

No entanto, a análise entre a expressão do RA em pacientes portadoras de CMTN e as variáveis grau histológico e IIL, representados na tabela 6, não demonstrou associação estatística significativa. Em relação ao grau histológico, em ambos os grupos foi observado predominantemente tumores grau III (p=0,309). A porcentagem média de IIL foi 38,6% no grupo RA-positivo e 39,1% no grupo RA-negativo (p=0,391).



Tabela 6. Expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras de CMTN e correlações com Ki-67, grau histológico e IIL.

Variável	Expressão do receptor androgênico				p
	Sim n=11		Não n=23		
	n	%	n	%	
<b>Ki67</b>					
<50	8	72,7	8	34,8	<0,038
51-100	3	27,3	15	65,2	
Média	43,6±22,9		65±20,9		<0,011
<b>Grau de diferenciação histológico do tumor*</b>					
GII	2	27,3	3	13	NS
GIII	8	72,7	20	87	
<b>IIL**</b>					
≤59	6	54,5	16	69,6	NS
≥60	5	45,5	7	30,4	
Média	38,6±32,1		39,1±26,4		NS

\*Grau de diferenciação histológica do tumor: GII – moderadamente diferenciado, GIII – indiferenciado.  $p < 0,05$  foi considerado significativo. \*\*IIL: Infiltração intra-tumoral de linfócitos. NS= não significativo estatisticamente.

A tabela 7 representa o estudo entre a intensidade da expressão do RA e a variável idade. Observou-se associação estatística significativa ( $p < 0,003$ ) entre o grupo que apresentou expressão do RA fortemente positivo (H-score>150) e a média de idade de 70,8 anos. Todos os casos de expressão do RA fortemente positivo (H-score>150) apresentaram idade superior a 50 anos.

Tabela 7. Intensidade da expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras de CMTN e correlação com a idade.

Variável	Expressão positiva do receptor androgênico				p
	1-150		151-300		
	n=6		n=5		
	n	%	n	%	
Idade					<0,015
30-34	3	50	-	-	
35-39	-	-	-	-	
40-44	-	-	-	-	
45-49	-	-	-	-	
50-54	2	33,3	-	-	
55-59	1	16,7	1	20	
60-64	-	-	1	20	
65-69	-	-	-	-	
>70	-	-	3	60	
Média	42,3±12,4		70,8±11,2		<0,003

p<0,05 foi considerado significativo. Escore-H  $\leq$ 150: 1-150, fracamente positivo. Escore-H >150: 151-300, fortemente positivo.

A análise entre a intensidade da expressão do RA e as variáveis Ki-67, grau histológico e IIL estão representados na tabela 8. A porcentagem média de expressão do Ki-67 (50±22,8%; p=0,339), porcentagem de grau histológico III (GIII) (83,7%; p=0,387) e a porcentagem média de IIL (42,5±34; p=0,685) foram mais elevadas no grupo fracamente positivo para RA, porém sem significância estatística.

Tabela 8. Intensidade da expressão do receptor androgênico em pacientes portadoras de CMTN e correlações com Ki-67, grau histológico e IIL.

Variável	Expressão do receptor androgênico positiva				p
	0-150 n=6		151-300 n=5		
	n	%	n	%	
Ki67					
<50	4	66,7	4	80	NS
51-100	2	33,3	1	20	
Média	50±22,8		36±23		NS
Grau de diferenciação histológica do tumor*					
GII	1	16,3	2	40	NS
GIII	5	83,7	3	60	
IIL**					
≤59	3	50	3	60	NS
≥60	3	50	2	40	
Média	42,5±34		34 ±32,9		NS

p<0,05 foi considerado significativo. Escore-H ≤150: 1-150, fracamente positivo. Escore-H >150: 151-300, fortemente positivo.\*Grau de diferenciação histológica do tumor: GII – moderadamente diferenciado, GIII – indiferenciado. \*\*IIL: Infiltração intratumoral de linfócitos. NS= não significativo estatisticamente.

## 5. DISCUSSÃO

O RA é uma proteína existente no núcleo de determinadas células, onde se ligam os hormônios masculinos testosterona e diidrotestosterona. Esse receptor é normalmente encontrado no sistema urogenital masculino e nas áreas onde normalmente crescem pêlos nos homens. Recentes estudos também demonstram sua expressão no câncer de mama, incluindo o CMTN. Segundo Collins *et al*, (2011), 77% dos carcinomas invasivos de mama são RA positivos. Esse estudo evidenciou que a expressão do RA foi comumente observada em tumores luminal A (91%) e B (68%) e menos frequentemente em tumores Her2-neu positivos (59%). Apesar de ser definido pela ausência da expressão do RE e de RP e sendo considerado hormonalmente não

respondedor, 35% dos CMTN expressam RA (Park *et al.*, 2010).

A sinalização do RA exerce um efeito antiestrogênico, inibindo a proliferação celular no tecido mamário normal, sendo essa ação mais evidenciada no CM do subtipo luminal, cuja expressão concomitante do receptor de estrogênio  $\alpha$  (RE $\alpha$ ) e do RA está associada a um prognóstico mais favorável (Hu *et al.*, 2011; Honma *et al.*, 2013; Hickey *et al.*, 2012). Em contrapartida, a sinalização do RA pode promover o crescimento celular de um subgrupo de tumores RE $\alpha$ -negativo: tumores de mama RA positivos com fenótipo molecular do tipo apócrino sendo que neste subgrupo (Moore *et al.*, 2012; Iggo *et al.*, 2011). Naderi *et al.* (2011) demonstraram um sinergismo entre RA e inibidores da via de sinalização MEK. Em adição, He *et al.* (2012) demonstraram que a expressão de RA representa um fator prognóstico favorável em sobrevida livre de doença (SLD) e em sobrevida global (SG) em pacientes com CMTN ( $p=0,032$ ).

Estudos experimentais em animais e modelos celulares como o de Narayanan *et al.* (2014) já apontaram resultados favoráveis no uso drogas moduladoras seletivas do receptor de androgênio em tumores de mama triplo negativos.

A prevalência de 32% de CMTN que expressam RA presentes em nosso estudo se assemelha a média de outros trabalhos como o de Collins *et al.* (2011) (32%) e Park *et al.* (2010) (35%). Este dado reforça a importância do estudo do RA em câncer de mama, pois se trata de uma significativa porção das pacientes portadoras de CMTN que em um futuro próximo poderão se beneficiar de novas terapias alvo.

Em conformidade com estudos anteriores (Pistelli *et al.*, 2014; Park *et al.*, 2010), esse estudo demonstrou que a forte expressão do RA está associada a pacientes mais idosas ( $p<0,05$ ) quando se subdivide o grupo RA positivo entre fracamente e fortemente positivos, com idade média maior neste último (70,8 anos). Essa associação também foi

demonstrada nos outros subtipos moleculares, nos quais os estudos demonstraram que a expressão do RA esteve relacionada às pacientes mais idosas e tumores biologicamente menos agressivos (Hu *et al.*, 2011; Honma *et al.*, 2013; Hickey *et al.*, 2012; Qi *et al.*, 2012).

O Ki-67 é uma proteína nuclear presente nas células em multiplicação, em todas as fases do ciclo celular exceto na fase de G0 (zero), identificada através do anticorpo monoclonal MIB-1, constituindo o principal biomarcador de proliferação celular em uso (Gerdes *et al.*, 2006). Analisando a expressão do Ki-67, o trabalho demonstrou que CMTN que expressam o receptor andrógeno tem menores taxas de proliferação celular se comparados aos que não expressam este receptor ( $p < 0,05$ ). Dados também observado em recentes estudos como o de Pistelli *et al.* (2014), que utilizaram como ponto de corte 30% e do autor Qi *et al.* (2012), que utilizaram a média do Ki-67. Esse estudo apontou significância nos dois métodos de análise, porém estabelecemos um ponto de corte alto (50%), pelo fato de 70% dos CMTN apresentaram  $Ki-67 > 50\%$ .

Evidências sugerem que o sistema imune atua no prognóstico do câncer de mama. Recentes estudos sugerem que a presença de infiltração intratumoral de linfócitos (IIL) está relacionada com SG, SLD e resposta a quimioterapia neoadjuvante em tumores triplo negativos (Adams *et al.*, 2014). A IIL é frequentemente encontrada em tumores com alta proliferação celular. Não foi observada nesse estudo a correlação estatística entre a expressão do RA ou da intensidade da expressão do receptor de andrógeno e a IIL.

Em contrapartida, entende-se as várias limitações desse estudo, incluindo a sua natureza retrospectiva e ao número reduzido da amostra de pacientes avaliados. Apesar

das vantagens da avaliação do Ki-67, grau histológico e IIL, a avaliação desses parâmetros apresentam inúmeras limitações, pois reflete a análise de pequenas regiões do tumor evidenciada através de biópsias e peças cirúrgicas, e não de todo o tumor, em virtude da heterogeneidade tumoral, que mescla áreas menos e mais proliferativas com diversos graus de diferenciação histológica (Romero *et al.*, 2014).

Outro viés dessa pesquisa foi mesclar a análise de biópsias mamárias e de peças cirúrgicas. Entretanto a avaliação exclusiva de peças cirúrgicas seria inviável, já que muitas pacientes com CMTN se apresentam no diagnóstico inicial com metástase à distância o que inviabiliza a realização do tratamento cirúrgico curativo. Além disso, muitas pacientes com CMTN iniciam o tratamento com quimioterapia neoadjuvante (antes da cirurgia), impossibilitando a análise de parâmetros patológicos importantes como grau histológico, Ki-67, tamanho tumoral e número de linfonodos axilares comprometidos. Fato observado neste grupo de pacientes estudadas, já que uma parcela significativa apresentou resposta patológica completa com o uso da quimioterapia, ou seja, remissão completa do tumor.

A avaliação do grau histológico não demonstrou relação com a expressão do RA, resultado corroborado em outros trabalhos (Pistelli *et al.*, 2014; Qi *et al.*, 2012). A tentativa de subclassificar a expressão androgênica entre forte e fraca não demonstrou significância estatística em relação ao Ki-67 e grau histológico, e uma das possíveis explicações seria o tamanho da amostra extremamente reduzida de pacientes apresentando positividade para RA (n=11).

Portanto, estudos prospectivos e com séries maiores de pacientes que investiguem a expressividade de RA no CM são necessários, visto que a compreensão dos mecanismos moleculares que envolvem os RA é fundamental para o

desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas no câncer de mama.

## 6. CONCLUSÃO

Esse estudo evidenciou subgrupos distintos de pacientes portadoras de CMTN quando observamos a expressão tumoral do RA. A expressividade alta do RA em pacientes portadoras de CMTN esteve associada às pacientes mais idosas, portadoras de tumores com baixos índices de proliferação celular, avaliada através da expressão do antígeno Ki-67, e provavelmente, menos agressivos sob o ponto de vista biológico. Os resultados alcançados nesse estudo, associados aos dados compilados da literatura, sugerem que a identificação dos subgrupos de expressão tumoral do RA em pacientes portadoras de CMTN poderá orientar os profissionais da saúde a terem uma abordagem individualizada, desenvolvimento de estratégias terapêuticas específicas, além de um melhor acompanhamento e vigilância. Além disso, sabemos que as drogas que se ligam aos receptores de andrógenos são medicações hormonioterápicas com baixa incidência de efeitos colaterais e excelente tolerabilidade, o que torna este horizonte ainda mais promissor pensando não só na eficácia, mas também na efetividade do tratamento das pacientes com CMTN RA positivos.

Não houve correlação estatística entre grau de diferenciação tumoral e IIL com a expressividade androgênica.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Adams, S.; Gray, R.J.; Demaria, S.; Goldstein, L.; Perez, E.A.; Shulman, L.N.; Martino, S.; Wang, M.; Jones, V.E.; Saphner, T.J.; Wolff, A.C.; Wood, W.C.; Davidson, N.E.; Sledge, G.W.; Sparano, J.A.; Badve, S.S. (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in triple-negative breast cancers from two phase III randomized adjuvant breast cancer trial: ECOG 2197 and ECOG 1199. **J. Clin. Oncol.** 32(27):2959-66.

Aebi, S.; Sun, Z.; Braun, D.; Price, K.N.; Castiglione-Gertsch, M.; Rabaglio, M.; Gelber, R.D.; Crivellari, D.; Lindtner, J.; Snyder, R.; Karlsson, P.; Simoncini, E.; Gusterson, B.A.; Viale, G.; Regan, M.M.; Coates, A.S.; Goldhirsch A. (2011). Differential efficacy of three cycles of CMF followed by tamoxifen in patients with ER-positive and ER-negative tumors: Long-term follow up on IBCSG Trial IX. **Ann. Oncol.** 22(9): 1981-87.

Albanell, J.; Bellmunt, J.; Molina, R.; García, M.; Caragol, I.; Bermejo, B.; Ribas, A.; Carulla, J.; Gallego, O.S.; Español, T.; Solé Calvo, L.A. (1996). Node-negative breast cancers with p53-/HER2-neu- status may identify women with very good prognosis. **Anticancer Res.** 16(2): 1027-32.

Andre, F.; Dieci, M.V.; Dubsy, P.; Sotiriou, C.; Curigliano, G.; Denkert, C.; Loi, S. (2013). Molecular pathways: involvement of immune pathways in the therapeutic response and outcome in breast cancer. **Clin. Cancer. Res.** 19(1): 28–33.

Anonymous .(1998). Tamoxifen for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. **Lancet.** 351(9114): 1451–67.

Apetoh, L.; Ghiringhelli, F.; Tesniere, A.; Obeid, M.; Ortiz, C.; Criollo, A.; Mignot, G.; Maiuri, M.C.; Ullrich, E.; Saulnier, P.; Yang, H.; Amigorena, S.; Ryffel, B.; Barrat, F.J.; Saftig, P.; Levi, F.; Lidereau, R.; Nogues, C.; Mira, J.P.; Chompret, A.; Joulin, V.; Clavel-Chapelon, F.; Bourhis, J.; André, F.; Delaloge, S.; Tursz, T.; Kroemer, G.; Zitvogel, L. (2007). Toll-like receptor 4-dependent contribution of the immune system to anticancer chemotherapy and radiotherapy. **Nat. Med.** 13 (9): 1050-9.

Atkins, D.; Reiffen, K.A.; Tegtmeier, C.L.; Winther, H.; Bonato, M.S.; Störkel, S. (2004). Immunohistochemical detection of EGFR in paraffin-embedded tumor tissues: variation in staining intensity due to choice of fixative and storage time of tissue sections. **J. Histochem. Cytochem.** 52(7): 893-901.

Bardou, V.J.; Arpino, G.; Elledge, R.M.; Osborne, C.K.; Clark, G.M. (2003). 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.** 21(10):1973-9.



Bauab, S.P.; Aguilae, V.L.N. (2011). **Situações Especiais do Rastreamento Mamário** In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências**. Editora Atheneu. pp 59-68.

Bauer, K.R.; Brown, M.; Cress, R.D.; Parise, C.A.; Caggiano, V. (2007). Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple negative phenotype: A population-based study from the California cancer Registry. **Cancer**. 109(9): 1721-8.

Baum, M.; Buzdar, A.; Cuzick, J.; Forbes, J.; Houghton, J.; Howell, A.; Sahmoud, T. (2003). Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early-stage breast cancer: results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen Alone or in Combination) trial efficacy and safety update analyses. **Cancer**. 98(9):1802-10.

Baum, M.; Buzdar, A.; Cuzick, J.; Forbes, J.; Houghton, J.; Klijn, J.G.; Sahmoud, T. (2002). Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of ATAC randomised Trial. **Lancet**. 359(9324):2131-9.

Bronzatt, E. (2011). Radioterapia no Câncer de Mama. In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências**. Editora Atheneu. pp 361-368.

Brown, R.W.; Allred, D.C.; Clark, G.M.; Osborne, C.K.; Hilsenbeck, S.G. (1996). Prognostic value of Ki67 compared to S phase fraction in axillary node-negative breast cancer. **Clin. Cancer Res**. 2(3): 585-92.

Buitrago, F.; Uemura, G.; Sena, M.C.F. (2011). Fatores prognósticos em câncer de mama. **Com. Ciências Saúde** - 22 Sup 1:S69-S82.

Byar, D.P.; Sears, M.E.; McGuire, W.L. (1979). Relationship between estrogen receptor values and clinical data in predicting the response to endocrine therapy for patients with advanced breast cancer. **Eur. J. Cancer**. 15 299-310.

Carey, L.A.; Perou, C.M.; Livasy, C.A.; Dressler, L.G.; Cowan, D.; Conway, K.; Karaca, G.; Troester, M.A.; Tse, C.K.; Edmiston, S.; Deming, S.L.; Geradts, J.; Cheang, M.C.; Nielsen, T.O.; Moorman, P.G.; Earp, H.S.; Millikan, R.C. (2006). Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. **JAMA**. 295(21): 2492-2502.

Castellano, I.; Allia, E.; Accortanzo, V.; Vandone, A.M.; Chiusa, L.; Arisio, R.; Durando, A.; Donadio, M.; Bussolati, G.; Coates, A.S.; Viale, G.; Sapino, A. (2010). Androgen receptor expression is a significant prognostic factor in estrogen receptor positive breast cancers. **Breast Cancer Res. Treat.** 124(3):607-17.

Chala, L.C.; Shimizu, C.; Moraes, P.C. (2011). **Rastreamento Mamográfico na População Geral.** In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências.** Editora Atheneu. pp 51-58.

Cho, H-S.; Mason, K.; Ramyar, K.X.; Stanley, A.M.; Gabelli, S.B.; Denney D.W.Jr.; Leahy, D.J. (2003). Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab. **Nature.** 421(6924),756–60.

Citron, M.L.; Berry, D.A.; Cirincione, C.; Hudis, C.; Winer, E.P.; Gradishar, W.J.; Davidson, N.E.; Martino, S.; Livingston, R.; Ingle, J.N.; Perez, E.A.; Carpenter, J.; Hurd, D.; Holland, .JF.; Smith, B.L.; Sartor, C.I.; Leung, E.H.; Abrams, J.; Schilsky, R.L; Muss, H.B.; Norton, L. (2003). Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741/Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. **J. Clin. Oncol.** 21(8): 1431-9.

Cochrane, D.R.; Bernales, S.; Jacobsen, B.M.; Cittelty, D.M.; Howe, E.N.; D'Amato, N.C.; Spoelstra, N.S.; Edgerton, S.M.; Jean, A.; Guerrero, J.; Gómez, F.; Medicherla, S.; Alfaro, I.E.; McCullagh, E.; Jedlicka, P.; Torkko, K.C.; Thor, A.D.; Elias, A.D.; Protter, A.A.; Richer, J.K. (2014). Role of the androgen receptor in breast cancer and preclinical analysis of enzalutamide. **Breast Cancer Res.** 16(1): R7.

Coldman, A.; Phillips, N.; Wilson, C.; Decker, K.; Chiarelli, A.M.; Brisson, J.; Zhang, B.; Payne, J.; Doyle, G.; Ahmad, R. (2014). Pan-Canadian study of mammography screening and mortality from breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst.** 106(11).

Collins, L.C.; Cole, K.S.; Marotti, J.D.; Hu, R.; Schnitt, S.J.; Tamimi, R.M. (2011). Androgen receptor expression in breast cancer in relation to molecular phenotype: results from the Nurses' Health Study. **Mod. Pathol.** 24(7): 924–931.

Creighton, C.J. ; Kent Osborne , C. ; van de Vijver, M.J. ; Foekens, J.A. ; Klijn, J.G. ; Horlings, H.M. ; Nuyten, D. ; Wang, Y. ; Zhang, Y. ; Chamness, G.C. ; Hilsenbeck, S.G. ; Lee, A.V. ; Schiff, R. (2008). Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. **Breast Cancer Res. Treat.** 114 (2): 287–99.

Curigliano, G.; Goldhirsch, A. (2011). The triple-negative subtype: new ideas for the poorest prognosis breast cancer. **J. Natl. Cancer Inst. Monogr.** 2011(43):108-10.

De Abreu, E.; Koifman, S. (2002). Fatores prognósticos no câncer de mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 48(1): 113-31.

De Amicis, F.; Thirugnansampanthan, J.; Cui, Y.; Selever, J.; Beyer, A.; Parra, I.; Weigel, N.L.; Herynk, M.H.; Tsimelzon, A.; Lewis, M.T.; Chamness, G.C.; Hilsenbeck, S.G.; Ando, S.; Fuqua, S.A. (2010). Androgen receptor overexpression induces tamoxifen resistance in human breast cancer cells. **Breast Cancer Res. Treat.** 121(1):1-11.

Deyarmin, B.; Kane, J.L.; Valente, A.L.; van Laar, R.; Gallagher, C.; Shriver, C.D.; Ellsworth, R.E. (2013). Effect of ASCO/CAP guidelines for determining ER status on molecular subtype. **Ann. Surg. Oncol.** 20(1):87-93.

Demaria, .; Volm, M.D.; Shapiro, R.L.; Yee, H.T.; Oratz, R.; Formenti, S.C.; Muggia, F.; Symmans, W.F. (2001). Development of tumor-infiltrating lymphocytes in breast cancer after neoadjuvant paclitaxel chemotherapy. **Clin. Cancer Res.** 7(10): 3025-3030.

Demaria, S.; Pilonis, K.A.; Adams, S. (2011). **Cross-talk of breast cancer cells with the immune system.** In: Gunduz M, Gunduz E (Ed.) **Breast Cancer: Carcinogenesis, Cell Growth and Signalling Pathways.** Rijeka, Croatia, InTech. pp 457-482.

Dent, R.; Hanna, W.M.; Trudeau, M.; Rawlinson, E.; Sun, P.; Narod, S.A. (2009). Pattern of metastatic spread in triple-negative breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** 115(2):423-8.

Dieci, M.V.; Criscitiello, C.; Goubar, A.; Viale, G.; Conte, P.; Guarneri, V.; Ficarra, G.; Mathieu, M.C.; Delalogue, S.; Curigliano, G.; Andre, F. (2014). Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes on residual disease after primary chemotherapy for triple-negative breast cancer: a retrospective multicenter study. **Ann. Oncol.** 25(3): 611-8.

Dushyanthen, .; Beavis, P.A.; Savas, P.; Teo, Z.L.; Zhou, C.; Mansour, M.; Darcy, P.K.; Loi, S. (2015). Relevance of tumor- infiltrating lymphocytes in breast cancer. **BMC Med.** 13:202.

EBCTCG. Clarke, M.; Collins, R.; Darby, S.; Davies, C.; Elphinstone, P.; Evans, V.; Godwin, J.; Gray, R.; Hicks, C.; James, S.; MacKinnon, E.; McGale, P.; McHugh, T.; Peto, R.; Taylor, C.; Wang, Y. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). (2005). Effects of radiotherapy and of differences in the surgery for breast cancer on local recurrence and survival: an overview of the randomised trials. **Lancet**. 366(9503): 2087-106.

Elston, C.W.; Ellis, I.O. (1991). Pathological prognostic factors in breast cancer I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathology**. 19(5): 403-410.

Fisher, B.; Anderson, S.; Bryant, J.; Margolese, R.; Deutsch, M.; Fisher, E.R.; Jeong, J.H.; Wolmark, N. (2002). Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy; lumpectomy and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 347(16): 1233-1241.

Gaedcke, J.; Traub, F.; Milde, S.; Wilkens, L.; Stan, A.; Ostertag, H.; Christgen, M.; von Wasielewski, R.; Kreipe, H.H. (2007). Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastasis from breast cancer. **Mod. Pathol.** 20(8):864-70.

Gerdes, J.; Schwab, U.; Lemke, H.; Stein, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int. J. Cancer**; 31(1): 13-20.

Giuliano, A.E.; Hunt, K.K.; Ballman, K.V.; Beitsch, P.D.; Whitworth, P.W.; Blumencrans, P.W.; Leitch, A.M.; Saha, S.; McCall, L.M.; Morrow, M. (2011). Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical Trial. **JAMA**. 305(6):569-75.

Goldhirsch, A.; Ingle, J.N.; Gelber, R.D.; Coates, A.S.; Thürlimann, B.; Senn, H.J. Panel members. (2009). Thresholds for therapies: highlights of St Gallen International Expert Consensus on Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Ann. Oncol.** 20(8): 1319-29.

Goldhirsch, A.; Winer, E.P.; Coates, A.S.; Gelber, R.D.; Piccart-Gebhart, M.; Thürlimann, B, *et al.* (2013). Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer. **Ann. Oncol.** 24(9):2206-23.

Gonzalez-Angulo, A.M.; Timms, K.M.; Liu, S.; Chen, H.; Litton, J.K.; Potter, J.; Lanchbury, J.S.; Stemke-Hale, K.; Hennessy, B.T.; Arun, B.K.; Hortobagyi, G.N.; Do, K.A.; Mills, G.B.; Meric-Bernstam, F. (2011). Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. **Clin. Cancer Res.** 17(5): 1082-9.

Gucalp, A.; Traina, T.A. (2010). Triple-negative breast cancer: Role of the androgen receptor. **Cancer J.** 16(1): 62-65.

Gucalp, A.; Tolaney, S.; Isakoff, S.J.; Ingle, J.N.; Liu, M.C.; Carey, L.A.; Blackwell, K.; Rugo, H.; Nabell, L.; Forero, A.; Stearns, V.; Doane, A.S.; Danso, M.; Moynahan, M.E.; Momen, L.F.; Gonzalez, J.M.; Akhtar, A.; Gir, D.D.; Patil S.; Feigin, K.N.; Hudis, C.A.; Traina, T.A. Translational Breast Cancer Research Consortium (TBCRC 011). (2013). Phase II trial of bicalutamide in patients with androgen receptor-positive, estrogen receptor-negative metastatic breast cancer. **Clin. Cancer Res.** 19(19): 5505-12.

Halsted, W.S. (1907). The results of radical operations for cure of cancer of the breast. **Ann. Surg.** 46(1):1-9.

He, J.; Peng, R.; Yuan, Z.; Wang, S.; Peng, J.; Lin, G.; Jiang, X.; Qin, T. (2012). Prognostic value of androgen receptor expression in operable triple-negative breast cancer: a retrospective analysis based on a tissue microarray. **Med. Oncol.** 29(2):406-10.

Henson, D.E.; Ries, L.; Freedman, L.S.; Carriaga, M. (1991). Relationship among outcome, stage of disease, and histologic grade for 22,616 cases of breast cancer. The basis for a prognostic index. **Cancer.** 68(10): 2142-9.

Hickey, T.E.; Robinson, J.L.; Carroll, J.S.; Tilley, W.D. (2012). Minireview: The Androgen Receptor in Breast Tissues: Growth Inhibitor, Tumor Suppressor, Oncogene? **Mol. Endocrinol.** 26(8):1252-67.

Honma, N.; Horii, R.; Iwase, T.; Saji, S.; Younes, M.; Ito, Y.; Akiyama, F. (2013). Clinical importance of androgen receptor in breast cancer patients treated with adjuvant tamoxifen monotherapy. **Breast Cancer.** 20 (4): 323-330.

Hu, R.; Dawood, S.; Holmes, M.D.; Collins, L.C.; Schnitt, S.J.; Cole, K.; Marotti, J.D.; Hankinson, S.E.; Colditz, G.A.; Tamimi, R.M. (2011). Androgen receptor expression and breast cancer survival in postmenopausal women. **Clin. Cancer Res.** 17(7): 1867-74.

Hurria, A.; Wong, L.F.; Villaluna, D.; Bhatia, S.; Chung, C.T.; Mortimer, J.; Hurvitz, S.; Naeim, A. (2008). Role of age and health in treatment recommendations for the older adults with breast cancer: the perspective of oncologists and primary care providers. **J. Clin. Oncol.** 26(33): 5386-92.

Iggo, R.D. (2011). New insights into the role of androgen and estrogen receptors in molecular apocrine breast tumours. **Breast Cancer Res.** 13(6): 318.

INCA - Instituto Nacional do Cancer Estimativa 2014 - Incidência de Câncer no Brasil. **Disponível (online)** <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>.

Ladoire, S.; Mignot, G.; Dabakuyo, S.; Arnould, L.; Apetoh, L.; Rébé, C.; Coudert, B.; Martin, F.; Bizollon, M.H.; Vanoli, A.; Coutant, C.; Fumoleau, P.; Bonnetain, F.; Ghiringhelli, F. (2011) In situ immune response after neoadjuvant chemotherapy for breast cancer predicts survival. **J. Pathol.** 224(3): 389–400.

Lakhani, S.; Ellis, I.; Schnitt S., *et al.* (2012). 4th. Lyon: IARC Press. WHO Classification of Tumours of the Breast.

Liang, K.; Ang, K.K.; Milas, L.; Hunter, N.; Fan, Z. (2003). The epidermal growth factor receptor mediates radioresistance. **Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.** 57(1): 246–54.

Liedtke, C.; Mazouni, C.; Hess, K.R.; André, F.; Tordai, A.; Mejia, J.A.; Symmans, W.F.; Gonzalez-Angulo, A.M.; Hennessy, B.; Green, M.; Cristofanilli, M.; Hortobagyi, G.N.; Pusztai, L. (2008). Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. **J. Clin. Oncol.** 26(8):1275–1281.

Liu, S.; Chia, S.K.; Mehl, E.; Leung, S.; Rajput, A.; Cheang, M.C.; Nielsen, T.O. (2010) Progesterone receptor is a significant factor associated with clinical outcomes and effect of adjuvant tamoxifen therapy in breast cancer patients. **Breast Cancer Res. Treat.** 119(1): 53–61.

Loi, S.; Sirtaine, N.; Piette, F.; Salgado, R.; Viale, G.; Van Eenoo, F.; Rouas, G.; Francis, P.; Crown, J.P.; Hitre, E.; de Azambuja, E.; Quinaux, E.; Di Leo, A.; Michiels, S.; Piccart, M.J.; Sotiriou, C. (2013). Prognostic and predictive value of tumor-infiltrating lymphocytes in a phase III randomized adjuvant breast cancer trial in node-positive breast cancer comparing the addition of docetaxel to doxorubicin with doxorubicin-based chemotherapy: BIG 02-98. **J. Clin. Oncol.** 31(7):860-7.

Lundin, J.; Lundin, M.; Holli, K.; Kataja, V.; Elomaa, L.; Pylkkanen, L.; Turpeenniemi-Hujanen, T.; Joensuu, H., (2001). Omission of histologic grading from clinical decision making may result in overuse of adjuvant therapies in breast cancer: results from a nationwide study. **J. Clin. Oncol.** 19(1): 28-36.

Marie, K.; Par-Ola, B., Dorthe, G., Kristina, L., Per, M., Marten, F. (2010), for the South Sweden Breast Cancer Group. The prognostic value of Ki67 is dependent on estrogen receptor estado and histological grade in premenopausal patients with node-negative breast cancer. **Modern Pathology.** 23: 251-9.

McNamara, K.M.; Yoda, T.; Miki, Y.; Chanplakorn, N.; Wongwaisayawan, S.; Incharoen, P.; Kongdan, Y.; Wang, L.; Takagi, K.; Mayu, T.; Nakamura, Y.; Suzuki, T.; Nemoto, N.; Miyashita, M.; Tamaki, K.; Ishida, T.; Ohuchi, N.; Sasano, H. (2011).

Androgenic pathway in triple negative invasive ductal tumors: its correlation with tumor cell proliferation. **Cancer Sci.** 104(5): 639-346.

Metzger-Filho, O.; Tutt, A.; de Azambuja, E.; Saini, K.S.; Viale, G.; Loi, S.; Bradbury, I.; Bliss, J.M.; Azim, H.A Jr.; Ellis, P.; Di Leo, A.; Baselga, J.; Sotiriou, C.; Piccart-Gebhart, M. (2012). Dissecting the heterogeneity of triple-negative breast cancer. **J. Clin. Oncol.** 30(15):1879-87.

Millikan, R.C.; Newman, B.; Tse, C.K.; Moorman, P.G.; Conway, K.; Dressler, L.G.; Smith, L.V.; Labbok, M.H.; Geradts, J.; Bensen, J.T.; Jackson, S.; Nyante, S.; Livasy, C.; Carey, L.; Earp, H.S.; Perou, C.M. (2008). Epidemiology of basal-like breast cancer. **Breast Cancer Res. Treat.** 109(1): 123-39.

Moinfar, F.; Okcu, M.; Tsybrovsky, O.; Regitnig, P.; Lax, S.F.; Weybora, W.; Ratschek, M.; Tavassoli, F.A.; Denk, H. (2003). Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies. **Cancer.** 98(4): 703-711.

Molino, A.; Micciolo, R.; Turazza, M.; Bonetti, F.; Piubello, Q.; Bonetti, A.; Nortilli, R.; Pelosi, G.; Cetto, G.L. (1997). Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: association with clinical and pathological variables and prognosis. **Int. J. Cancer.** 74(4): 433-7.

Moore, N.L.; Buchanan, G.; Harris, J.M.; Selth, L.A.; Bianco-Miotto, T.; Hanson, A.R.; Birrell, S.N.; Butler, L.M.; Hickey, T.E.; Tilley, W.D. (2012). An androgen receptor mutation in the MDA-MB-453 cell line model of molecular apocrine breast cancer compromises receptor activity. **Endocr. Relat. Cancer.** 22(4):599-613.

Naderi A, Chia KM, Liu J. (2011). Synergy between inhibitors of androgen receptor and MEK has therapeutic implications in estrogen receptor-negative breast cancer. **Breast Cancer Res.** 13(2): R36.

Narayanan, R.; Ahn, S.; Cheney, M.D.; Yepuru, M.; Miller, D.D.; Steiner, M.S.; Dalton, J.T. (2014). Selective Androgen Receptor Modulators (SARMs) Negatively Regulate Triple-Negative Breast Cancer Growth and Epithelial Mesenchymal Stem Cell Signaling. **PLoS ONE** 9(7): e103202.

Nielsen, T.O.; Hsu, F.D.; Jensen, K.; Cheang, M.; Karaca, G.; Hu, Z.; Hernandez-Boussard, T.; Livasy, C.; Cowan, D.; Dressler, L.; Akslen, L.A.; Ragaz, J.; Gown, A.M.; Gilks, C.B.; van de Rijn, M.; Perou, C.M. (2004). Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Clin. Cancer Res.** 10(16):5367-74.

Nishimura, R.; Arima, N. (2008). Is triple negative a prognostic factor in breast cancer? **Breast Cancer**. 15(4): 303-8, 2008

Novita, G.; Millen, E.; Brenelli, F.; Frasson, A. (2011). **Cirurgia Conservadora da Mama**. In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências**. Editora Atheneu. pp 203-206.

Obr, A.E.; Edwards, D.P. (2012). The biology of progesterone receptor in the normal mammary gland and in breast cancer. **Mol. Cell. Endocrinol**. 357(1-4): 4-17.

Oliveira Filho, H.R.; Berrettini Jr, A.; Zerwes, F.; Millen, E. (2011). **Câncer de Mama em Mulheres Jovens**. In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências**. Editora Atheneu. pp 311-316.

Owens, M.A.; Horten, B.C.; Da Silva, M.M. (2004). HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. **Clin. Breast Cancer**. 5(1):63-9.

Pace, B.; Santos, G.R.; Millen, E.; Frasson, A. (2011). Radioterapia no Câncer de Mama. In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências**. Editora Atheneu. pp 195-202.

Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, Baehner FL, Walker MG, Watson D, Park T, Hiller, W.; Fisher, E.R.; Wickerham, D.L.; Bryant, J.; Wolmark, N. (2004). A multigene assay to predict recurrence of tamoxifentreated, node-negative breast câncer. **N. Engl. J. Med**. 351(27): 2817–26.

Palma, G.; Frasci, G.; Chirico, A.; Esposito, E.; Siani, C.; Saturnino, C.; Arra, C.; Ciliberto, G.; Giordano, A.; D'Aiuto, M.(2015).Triple negative breast cancer: looking for the missing link between biology and treatments. **Oncotarget**. 6(29):26560-74.

Park, S.; Koo, J.; Park, H.S.; Kim, J.H.; Choi, S.Y.; Lee, J.H.; Park, B.W.; Lee, K.S. (2010). Expression of androgen receptors in primary breast cancer. **Ann. Oncol**. 21(3): 488-92.

Park, S.; Koo, J.; Park, H.S.; Kim, J.H.; Choi, S.Y.; Lee, J.H.; Park, B.W.; Lee, K.S. (2010). Expression of androgen receptors in primary breast cancer. **Ann. Oncol**. 21(3): 488-92.



Pathology Reporting of Breast Disease: A Joint Document Incorporating the Third Edition of the NHS Breast Screening Programme's Guidelines for pathology Reporting in Breast Câncer Screening and the Second Edition of The Royal College of Pathologists' Minimum Dataset for Breast Cancer Histopathology. Sheffield; NHS Cancer Screening Programmes and The Royal College of Pathologists; January 2005.

Perou, C.M.; Sorlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslen, L.A.; Fluge, O.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Zhu, S.X.; Lonning, P.E.; Borresen-Dale, A.L.; Brown, P.O.; Botstein, D. (2000). Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**. 406(6797):747-52.

Phipps, A.I.; Buist, D.S.; Malone, K.E.; Barlow, W.E.; Porter, P.L.; Kerlikowske, K., Li, C.I. (2011). Reproductive history and risk of three breast cancersubtypes defined by three biomarkers. **Cancer Causes Control**. 22(3): 399–405.

Phipps, A.I.; Chlebowski, R.T.; Prentice, R.; McTiernan, A.;Stefanick, M.L.; Wactawski-Wende, J.; Kuller, L.H.; Adams-Campbell, L.L.; Lane, D.; Vitolins, M.; Kabat, G.C.; Rohan.; T.E.; Li , C.I. (2011). Body size, physical activity, and risk of triple negativeand estrogen receptor-positive breast cancer. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev**. 20(3): 454–463.

Pistelli, M.; Caramanti, M.; Biscotti, T.; Santinelli, A.; Pagliacci, A.; De Lisa, M.; Ballatore, Z.; Ridolfi, F.; Maccaroni, E.; Bracci, R.; Berardi, R., Battelli, N.; Cascinu, S. (2014). Androgen receptor expression in early triple-negative breast câncer: clinical significance and prognostic associations. **Cancers**. 6(3): 1351-1362.

Prat, A.; Perou, C.M. (2011). Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. **Mol. Oncol**. 5(1):5–23.

Qi, J.P.; Yang, Y.L.; Zhu, H.; Wang, J.; Jia, Y.; Liu, N.; Song, Y.J.; Zan, L.K.; Zhang, X.; Zhou, M.; Gu, Y.H.; Liu, T.; Hicks, D.G.; Tang, P. (2012). Expression of the androgen receptor and its correlation with molecular subtypes in 980 chinese breast cancer patients. **Breast Cancer**. 6:1-8.

Quaglia, A.; Tavilla, A.; Shack, L.; Brenner, H.; Janssen-Heijnen, M.; Allemani, C.; Colonna, M.; Grande, E.; Grosclaude, P.; Vercelli, M. (2009). EURO CARE Working Group. The cancer survival gap between elderly and middle-aged patients in Europe is widening. **Eur. J Cancer**. 45:1006-1016.

Rakha, E.A.; El-Sayed, M.E.; Lee, A.H.; Elston, C.W.; Grainge, M.J.; Hodi, Z.; Blamey, R.W.; Ellis, I.O. (2008). Prognostic significance of nottingham histologic grade in invasive breast carcinoma. **J. Clin. Oncol**. 26(19): 3153-8.

Rakha, E.A.; Reis-Filho, J.S.; Baehner, F.; Dabbs, D.J.; Decker, T.; Eusebi, V.; Fox, S.B.; Ichihara, S.; Jacquemier, J.; Lakhani, S.R.; Palacios, J.; Richardson, A.L.; Schnitt, S.J.; Schmitt, F.C.; Tan, P.H.; Tse, G.M.; Badve, S.; Ellis, I.O. (2010). Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res.** 12(4):207.

Romero, Q.; Bendahl, P.O.; Fernö, M.; Grabau, D.; Borgquist, S. (2014). A novel model for Ki-67 assessment in breast cancer. **Diagn. Pathol.** 9:118.

Romond, E.H.; Perez, E.A.; Bryant, J.; Suman, V.J.; Geyer, C.E. Jr.; Davidson, N.E.; Tan-Chiu, E.; Martino, S.; Paik, S.; Kaufman, P.A.; Swain, S.M.; Pisansky, T.M.; Fehrenbacher, L.; Kutteh, L.A.; Vogel, V.G.; Visscher, D.W.; Yothers, G.; Jenkins, R.B.; Brown, A.M.; Dakhil, S.R.; Mamounas, E.P.; Lingle, W.L.; Klein, P.M.; Ingle, J.N.; Wolmark, N. (2005). Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER-2-positive breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 353(16): 1673-84.

Safarpour, D.; Pakneshan, S.; Tavassoli FA. (2014). Androgen receptor (AR) expression in 400 breast carcinomas: is routine AR assessment justified? **Am. J. Cancer Res.** 4(4):353-68.

Schippinger, W.; Regitnig, P.; Dandachi, N.; Wernecke, K.D.; Bauernhofer, T.; Samonigg, H.; Moinfar, F. (2006) Evaluation of the prognostic significance of androgen receptor expression in metastatic breast cancer. **Virchows Arch.** 449(1): 24–30

Schneider, B.P.; Winer, E.P.; Foulkes, W.D.; Garber, J.; Perou, C.M.; Richardson, A.; Sledge, G.W.; Carey, L.A. (2008). Triple-negative breast cancer: risk factors to potential targets. **Clin. Cancer Res.** 14(24):8010–8018.

Shimada A, Katz A. (2011). **Hormonioterapia no Câncer de Mama.** In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências.** Editora Atheneu. pp 369-374.

Simon, SD, Armentano DP, Soares A. (2011). **Quimioterapia no Câncer de Mama.** In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências.** Editora Atheneu. pp 375-386.

Simpson, J.F.; Gray, R.; Dressler, L.G.; Cobau, C.D.; Falkson, C.I.; Gilchrist, K.W.; Pandya, K.J.; Page, D.L.; Robert, N.J. (2000). Prognostic value of histologic grade and proliferative activity in axillary node-positive breast cancer: results from the Eastern

Cooperative Oncology Group Companion Study, EST 4189. **J. Clin. Oncol.** 18(10): 2059-69.

Slamon D.J.; Clark, G.M.; Wong, S.G.; Levin, W.J.; Ullrich, A.; McGuire, W.L. (1987). Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**; 235(4785):177-82.

Slamon, D.J.; Godolphin, W.; Jones, L.A.; Holt, J.A.; Wong, S.G.; Keith, D.E.; Levin, W.J.; Stuart, S.G.; Udove, J.; Ullrich, A. et al. (1989). Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**. 244(4905):707-12.

Smith, I.; Procter, M.; Gelber, R.D.; Guillaume, S.; Feyereislova, A.; Dowsett, M.; Goldhirsch, A.; Untch, M.; Mariani, G.; Baselga, J.; Kaufmann, M.; Cameron, D.; Bell, R.; Bergh, J.; Coleman, R.; Wardley, A.; Harbeck, N.; Lopez, R.I.; Mallmann, P.; Gelmon, K.; Wilcken, N.; Wist, E.; Sánchez Rovira, P.; Piccart-Gebhart, M.J. HERA study team. (2007). 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: A randomised controlled trial. **Lancet**. 369(9555): 29-36.

Sorlie, T.; Perou, C.M.; Tibshirani, R.; Aas, T.; Geisler, S.; Johnsen, H.; Hastie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Thorsen, T.; Quist, H.; Matese, J.C.; Brown, P.O.; Botstein, D.; Lonning, P.E.; Borresen-Dale, A.L. (2001). Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 98(19): 10869-74.

Sorlie, T.; Tibshirani, R.; Parker, J.; Hastie, T.; Marron, J.S.; Nobel, A.; Deng, S.; Johnsen, H.; Pesich, R.; Geisler, S.; Demeter, J.; Perou, C.M.; Lonning, P.E.; Brown, P.O.; Borresen-Dale, A.L.; Botstein, D. (2003). Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc. Natl. Acad. Sci.** 100(14): 8418–8423.

Tan, P.H.; Bay, B.H.; Yip, G.; Selvarajan, S.; Tan, P.; Wu, J.; Lee, C.H.; Li, K.B. (2005). Immunohistochemical detection of Ki67 in breast cancer correlates with transcriptional regulation of genes related to apoptosis and cell death. **Mod. Pathol.** 18(3):374-81.

Tavassoli, F.A.; Devilee, P. (2003). **World Health Organization classification of tumours. In Pathology and Genetics Tumours of the Breast and Female Genital Organs.** Lyon: IARC Press. pp 19-23.

Torres-Arzayus, M.I. ; Font de Mora, J. ; Yuan, J. ; Vazquez, F. ; Bronson, R. ; Rue, M. ; Sellers, W.R. ; Brown, M. (2004). High tumor incidence and activation of the PI3K/AKT pathway in transgenic mice define AIB1 as an oncogene. **Cancer Cell.** 6(3):263–74.

Urban, C.; Millen, E.; Novita, G.; Frasson, A. (2011). **Cirurgias Linfonodais**. . In: Frasson, A.; Millen, E.; Novita, G.; Zerwes, F.; Brenelli, F.; Luzzatto, F.; Lima, L.N.B.; Urban, C.; Pace, B.; Bronzatt, E.; Berrettini Jr, A.; Oliveira Filho H.B.; Matthes A.G.Z.; Machado, L.; Santos, G.R.; Ching, A.W.; Vollbrecht, B. (Ed.) **Doenças da Mama. Guia Prático Baseado em Evidências**. Editora Atheneu. pp 207-212.

Valabrega, G.; Montemurro, F.; Aglietta, M. (2007). Trastuzumab: mechanism of action, resistance and future perspectives in HER2-overexpressing breast cancer. **Ann. Oncol.** 18(6):977-84.

van de Vijver, M.J.; He, Y.D.; van't Veer, L.J.; Dai, H.; Hart, A.A.; Voskuil, D.W.; Schreiber, G.J.; Peterse, J.L.; Roberts, C.; Marton, M.J.; Parrish, M.; Atsma, D.; Witteveen, A.; Glas, A.; Delahaye, L.; van der Velde, T.; Bartelink, H.; Rodenhuis, S.; Rutgers, E.T.; Friend, S.H.; Bernards, R. (2002). A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 347(25):1999-2009.

Veronesi, U.; Cascinelli, N.; Mariani, L.; Greco, M.; Saccozzi, R.; Luini, A.; Aguillar, M.; Marubini, E. (2002) Twenty-year follow-up of randomized study comparing breast-conserving surgery with radical mastectomy for early breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 347(16): 1227-1232.

Veronesi, U.; Paganelli, G.; Viale, G.; Luini, A.; Zurrada, S.; Galimberti, V.; Intra, M.; Veronesi, P.; Robertson, C.; Maisonneuve, P.; Renne, G.; De Cicco, C.; De Lucia, F.; Gennari, R. (2003). A randomized comparison of sentinel-node biopsy with routine axillary dissection in breast cancer. **N. Engl. J. Med.** 349: 546-53.

Veronesi, U.; Saccozzi, R.; Del Vecchio, M.; Banfi, A.; Clemente, C.; De Lena, M.; Gallus, G.; Greco, M.; Luini, A.; Marubini, E.; Muscolino, G.; Rilke, F.; Salvadori, B.; Zecchini, A.; Zucali, R. (1981). Comparing radical mastectomy with quadrantectomy, axillary dissection, and radiotherapy in patients with small cancers of the breast. **N. Engl. J. Med.** 305(1):6-11.

Viale, G.; Regan, M.M.; Maiorano, E.; Mastropasqua, M.G.; Dell'Orto, P.; Rasmussen, B.B.; Raffoul, J.; Neven, P.; Orosz, Z.; Braye, S.; Ohlscheger, C.; Thürliman, B.; Gelber, R.D.; Castiglione-Gertsch, M.; Price, K.N., Goldhirsch, A.; Gusteron, B.A.; Coates, A.S. (2007). Prognostic and predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors in a randomized trial comparing letrozole and tamoxifen adjuvant therapy for postmenopausal early breast cancer: BIG 1-98. **J. Clin. Oncol.** 25(25): 3846–52.

Voduc, K.D.; Cheang, M.C.; Tyldesley, S.; Gelmon, K., Nielsen, T.O.; Kennecke, H. (2010). Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. **J. Clin. Oncol.** 28(10):1684-91.

Wang, Y.; Klijn, J.G.; Zhang, Y.; Sieuwerts, A.M.; Look, M.P.; Yang, F.; Talantov, D.; Timmermans, M.; Meijer-van Gelder, M.E.; Yu, J.; Jatkoe, T.; Berns, E.M.; Atkins, D.; Foekens, J.A. (2005). Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph-node-negative primary breast cancer. **Lancet**. 365(9460):671-79.

Witzel, I.; Graeser, M.; Karn, T.; Schmidt, M.; Wirtz, R.; Schütze, D.; Rausch, A.; Jänicke, F.; Milde-Langosch, K.; Müller, V. (2013). Androgen receptor expression is a predictive marker in chemotherapy treated patients with endocrine receptor-positive primary breast cancers. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.** 139(5): 809-16.

Wolff, A.C.; Hammond, M.E.; Hicks, D.G.; Dowsett, M.; McShane, L.M.; Allison, K.H.; Allred, D.C.; Bartlett, J.M.; Bilous, M.; Fitzgibbons, P.; Hanna, W.; Jenkins, R.B.; Mangu, P.B.; Paik, S.; Perez, E.A.; Press, M.F.; Spears, P.A.; Vance, G.H.; Viale, G.; Hayes, D.F. (2013). Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. **J. Clin. Oncol.** 1;31(31):3997-4013.