

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE – UFCSPA
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA**



Giovana Tavares dos Santos

**Câncer de mama e derrame pleural
neoplásico: características
morfológicas e marcadores tumorais**

UFCSPA
**Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre**

**Porto Alegre
2016**

Giovana Tavares dos Santos

Câncer de mama e derrame pleural neoplásico: características morfológicas e marcadores tumorais

Tese submetida ao Programa de
Pós-Graduação em Patologia da
Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre como
requisito para a obtenção do grau de
Doutor

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Claudia Giuliano Bica
Co-orientador: Prof. Dr. João Carlos Prolla
Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Gisele Orlandi Introíni

**Porto Alegre
2016**

Catálogo na Publicação

Santos, Giovana Tavares dos

Câncer de mama e derrame pleural neoplásico:
características morfológicas e marcadores tumorais /
Giovana Tavares dos Santos. -- 2016.

144 f. : il., graf., tab. ; 30 cm.

Tese (doutorado) -- Universidade Federal de Ciências
da Saúde de Porto Alegre, Programa de Pós-Graduação em
Patologia, 2016.

Orientador(a): Claudia Giuliano Bica ;
coorientador(a): João Carlos Prolla, Gisele Orlandi
Introini.

1. Câncer de mama. 2. Derrame pleural neoplásico. 3.
Marcadores tumorais. I. Título.

Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da UFCSPA com os dados
fornecidos pelo(a) autor(a).

Sumário

I. Agradecimentos	VI
II. Lista de abreviaturas	XI
<i>EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico ou Epidermal Growth Factor Receptor</i>	XI
III. Lista de figuras.....	XII
IV Lista de tabelas e quadros	XIII
IV. Resumo da Tese	XIV
1. INTRODUÇÃO.....	16
1.1 <i>Epidemiologia do câncer de mama</i>	16
1.2 <i>Câncer de mama</i>	18
1.2.1 <i>Classificação histopatológica do câncer de mama</i>	19
1.2.2 <i>Estadiamento</i>	21
1.3 <i>Marcadores tumorais</i>	22
1.4 <i>Marcadores tumorais imuno-histoquímicos</i>	24
1.4.1 <i>Receptores hormonais</i>	25
1.4.2 <i>Oncogene C-erb-B2/ Her-2</i>	27
1.4.3 <i>Índice de proliferação celular</i>	29
1.4.4 <i>Prognóstico</i>	32
1.5 <i>Câncer de mama metastático</i>	33
1.6 <i>Componentes celulares encontrados em uma efusão pleural</i>	36
1.6.1 <i>Derrame pleural neoplásico</i>	40
1.7 <i>Justificativa</i>	45
1.8 <i>Referências Bibliográficas</i>	46
2. OBJETIVOS	54
2.1 <i>Objetivo geral</i>	54
2.2 <i>Objetivos específicos</i>	54
3. ARTIGOS CIENTÍFICOS	55
3.1: <i>Artigo Científico I: Impact of Her-2 overexpressed on survival of patients with metastatic breast cancer</i>	56
3.2 <i>Artigo Científico II: Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer</i>	79
3.3 <i>Artigo Científico III: Fishbone technique: Quality of the cytological distension with impact on diagnosis</i>	88
4. CONSIDERAÇÕES FINAIS	96
5. APÊNDICES	104
5.1 <i>Apêndice 1: Microscopia eletrônica e criação de ilustrações tridimensionais de células neoplásicas encontradas em derrames pleurais obtidos de pacientes com histórico de câncer de mama</i>	105
5.2 <i>Apêndice 2: Apresentações parciais resultantes do projeto em estudo.</i>	112
5.2.1 <i>Resumo apresentado ao: 17º World Congress on the Breast Diseases</i>	113
5.2.2 <i>Resumo apresentado ao: Salão de Pós-Graduação da UFRGS</i>	116

5.2.3	<i>Resumo apresentado ao: XII Congresso Sul Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia.....</i>	<i>119</i>
5.2.4	<i>Resumo apresentado ao: XII Congresso Sul Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia.....</i>	<i>122</i>
5.2.5	<i>Resumo apresentado ao: Goiânia Breast Cancer Symposium.....</i>	<i>125</i>
6.	ANEXOS.....	127
6.1	Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA	128
6.2	Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA	131
1.3	Anexo 3: Normas da Revista Científica Biomarkers.....	134
6.4	Anexo 4: Normas da Revista Científica BioTechniques.	142

Dedicatória

Por todo tempo dedicado a esta pesquisa, ofereço esta conquista com todo carinho a minha amada família, meus queridos pais Nádia Nara e Neri Copetti, meus irmãos Franciele e Giordani e a meu querido noivo Leandro Zago. A todos, pelo imprescindível apoio e estímulo, carinho e compreensão. E às pacientes que passaram por esta triste neoplasia.

I. Agradecimentos

Os momentos difíceis e exaustivos reportam ao limite de nossa força, porém após os obstáculos, percebemos o quanto conseguimos superar a nós mesmos.

E por viver em sociedade, as dificuldades passam a se diluir em um abraço, um café, um momento de atenção. Após anos de intensa dedicação, os agradecimentos são inúmeros...

À CAPES pelo apoio financeiro.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Patologia Geral e Experimental, em especial **Adriana Roehe, Marilda da Cruz Fernandes, Claudio Galeano Zettler, Paulo Zen** pela atenção sempre dispensada. Às queridas secretárias **Maristela Pasin e Luciane Spencer**, sempre atendendo aos nossos anseios, com muito carinho e dedicação, e às queridas Técnicas do Laboratório de Pesquisa em Patologia **Rosalva Thereza Meurer, Terezinha Stein e Keli Cristine Reiter**, pela indispensável atenção e dedicação e apoio as nossas pesquisas, agradeço também pela oportunidade de aprendizagem. Afirmo que sem cada um de vocês, este trabalho não seria executado com tamanho afinco. Querida **Rosalva**, com certeza a especial “massagem no ego” para ter coragem de enfrentar a batalha, foi diferencial nesta trajetória.

Preciso agradecer também a alguns departamentos da Instituição, os quais sempre nos acolheram à **Assessoria de Comunicação**, à **NUPEAQ** com a consultoria estatística, e o pessoal do **Laboratório de Genética**.

Falando em Laboratório, não posso deixar de mencionar as eternas “**Crazy Princess**”, pelo abraço diário, companheirismo e motivação. Além de algumas pessoas especiais, com as quais compartilhamos “desesperos” na atualidade e planos futuros, as queridas **Luiza Géa, Taiana Haag, Maiquidieli Dal Berto, Aniúscia Vieira e Sandra Armando**.

Agradeço as discussões científicas e o apoio do “grupo da mama”, às colegas **Jaqueline Lessa, Grazielle Fardin, Ana Paula Thiesen**. Aos meus indispensáveis bolsistas de Iniciação Científica e grandes amigos **Natália D. Camillo, Cássia Braz Cáurio** e aos Jovens Talentos, mesmo pelo curto tempo

que juntos trabalhamos, **Diogo B. Rocha, Tales Vicente Scheide, Yuri Machado, Daniel Andreolli**, valeu a pena conhecer pessoas tão dedicadas.

Agradeço ao Dr. **Rogério Grossmann** pela oportunidade e parceria de trabalho, abrindo as portas do Ambulatório de Mastologia da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA).

À Prof^a. Dr^a. **Ivana B. Mânica da Cruz**, por sempre nos acolher tão bem, e dedicar seu precioso tempo, às nossas infinitas análises estatísticas. E a querida Prof^a. Dr^a. **Jacqueline Piccoli**, pelo exemplo de profissional, pela excelência no seu trabalho, e pelo grande incentivo que me deste, desde o período da graduação.

Muitas pessoas foram fundamentais para a execução deste trabalho, em diversos setores da ISCMPA, em especial, menciono **Rosicler Luzia Brackmann, Paulo André Sampaio, Rafael Cavaleiro Fernandes, Altemar Acunha**. A querida **Rosane Hennika** e sua impecável organização no Arquivo. As sempre atenciosas recepcionistas **Francine Paz, Patrícia Bassani, Luciana Nascimento, Fernanda Lombardo**. A importante troca de experiência com as biólogas **Greyce Rodrigues, Judite Fagundes e Shala Martins**, e a querida futura Patologista **Pétala Rigon**. As meninas da Micologia, **Cecília Severo e Jaqueline**, e a enfermeira **Grace Porto**. Meu muito obrigado! Preciso reforçar o agradecimento a **Rosicler Brackmann, ao Paulo André Sampaio, Rafael Cavaleiro Fernandes e a Greyce**, por me acolherem, me ensinarem e sempre estarem dispostos a me auxiliar nesta incansável busca pelo conhecimento, amostras e técnicas.

Agradeço a oportunidade e o acolhimento da minha querida orientadora Prof^a. Dr^a. **Claudia G. Bica**, que sempre me ofereceu seu “concorrido e precioso” tempo. Sempre estendeu sua mão, orientando desde nossas pesquisas científicas à construção de nossa vida profissional. Levarei comigo muita lição, do sorriso diário, à persistência e motivação, visão ética e crítica, típicas da sua pessoa. Preocupação, inclusive, com nosso bem-estar, com o contato com nossa família, e se a bolsa estava sendo suficiente para nos mantermos... Enfim, preocupação de mãe, querida “profinha” te afirmo que acima de todo conhecimento científico que me proporcionou, foste fundamental no meu crescimento pessoal e profissional. Um grande obrigado!!!

Meu querido Co-orientador, Prof. Dr. **João Carlos Prolla**, agradeço imensamente a oportunidade de aprender com o senhor. Sua incrível sabedoria nos motiva a sempre querer mais. Agradeço muito o aprendizado, a parceria e a amizade.

Posso afirmar que fui agraciada com a brilhante oportunidade de me inserir em outros grupos de trabalho. A experiência em trabalhar com as professoras e Morfologistas foi especial, nesta trajetória. Queridas professoras **Gisele Orlandi Introíni** e **Marilda da Cruz Fernandes**, o acolhimento, o carinho, a experiência profissional tornaram-se um diferencial em minha pesquisa e em minha vida. Muito obrigada seria pouco!!! Juntamente agradeço a oportunidade em trabalhar com seus alunos, bolsistas de Iniciação Científica, as queridas **Mariana Simões** e **Naiane Carlesso Bassani**, meninas, muito obrigada pela parceria de trabalho e amizade!

Agradeço imensamente a minha família que sempre me ofertou o suporte financeiro e muito apoio moral necessário para seguir sempre em busca de meus objetivos. Meus pais **Nádia Nara Tavares dos Santos** e **Neri Olívio Copetti dos Santos**, que são fonte da minha motivação, meu porto seguro, meu motivo para não desistir nesta longa jornada. Sempre ofertando o conselho quando necessário, ou mesmo o puxão de orelha para ver que nem tudo estava perdido, e claro, o abraço acolhedor que só pai e mãe sabem ofertar! Sempre busquei colocar em prática seus exemplos de garra, determinação e bondade, pois assim consegui chegar mais longe, com passos largos e sólidos. Mais um passo à frente que hoje estou dando, agradeço a vocês!

Meus queridos irmãos **Giordani Tavares dos Santos** e **Franciele Tavares dos Santos de Abreu**, e minha sobrinha **Giana Carolina** que me proporcionaram momentos especiais de descontração e motivação, sempre incentivando emocionalmente e financeiramente. Sem essas pessoas especiais, eu não teria persistência para alcançar meus objetivos e contribuir com a comunidade científica. Estendo este agradecimento aos meus queridos cunhados **Betina Anklan** e **Paulo Abreu** e a meus tios, em especial ao tio Jovani Tavares, os quais sempre se preocuparam com meus estudos.

Ao meu querido noivo **Leandro Zago**, um companheiro para todas as horas, sempre incentivando nesta trajetória, que exige muita dedicação. Sempre contei com seu indispensável amor, carinho, apoio e compreensão. Quanto ao

apoio, reforço que este foi no mínimo em dois âmbitos: moral e financeiro. Seu carinho em me amparar durante longas tardes/noites do nosso dia a dia, seu apoio, motivação foram fundamentais, querido! Estendo o agradecimento a toda sua família, em especial a sua mãe, **Verena Garlet**, que sempre confiaram em nossas escolhas de trabalho e de vida.

A nossa família amada agradeço por tudo e peço desculpas pela ausência, pois o tempo tornou-se “escasso”, mesmo sempre tentando me fazer presente.

Agradeço ainda aos amigos de longas datas, mesmo distantes, a palavra que sempre vem ao telefone é de descontração e incentivo, **Alice Karkow** e **Rudimar Verona**, **Lilian Rauzer** e **Mateus Belinaso**, **Josieli Zilli** e **Juliano Schropfer**, **Maria Amélia Tavares Borin** e **João Roberto Borin**, **Luis Aquiles** e **Carin Gomes**.

Agradeço ainda às pacientes, pela colaboração e consentimento em participar desta pesquisa.

MUITO OBRIGADA A TODOS!

Mulher que estuda e labuta,
que sustenta nos ombros a responsabilidade,
E no ventre, as vidas a carregar...
No peito, acalenta a quem tem necessidade.
e grandiosamente ainda lhe sobra tempo para amar...
Este peito traiçoeiro,
seu sonho pode atrapalhar,
mas esta mulher guerreira,
sempre irá lutar.

Giovana Tavares dos Santos

II. Lista de abreviaturas

ANACITO: Associação Nacional de Citologia

BRCA1: *Breast Cancer 1*

BRCA2: *Breast Cancer 2*

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CK: Citoqueratina

CTC: células tumorais circulantes

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidérmico ou *Epidermal Growth Factor Receptor*

Her-2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 ou *Human Epidermal Growth Factor Receptor 2*

IARC: Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer

INCA: Instituto Nacional do Câncer

ISCMPA: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre

Ki-67: Antígeno nuclear utilizado como marcador de proliferação celular

ML: Microscopia de Luz

OMS: Organização Mundial da Saúde

Pronon: Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica

SOE: Sem outra especificação

III. Lista de figuras

Figura 1: Incidência para novos casos de câncer de mama no Rio Grande do Sul e na capital Porto Alegre	17
Figura 2: Identificação de biomarcadores através de técnicas distintas	24
Figura 3: Carcinoma ductal infiltrante e derrame pleural neoplásico positivos para receptor de estrógeno	27
Figura 4: Carcinoma ductal infiltrante e derrame pleural neoplásico positivos para receptor de progesterona	27
Figura 5: Carcinoma ductal infiltrante e derrame pleural neoplásico positivos para Her-2	28
Figura 6: Super-expressão de Her-2 no derrame pleural neoplásico	35
Figura 7: Célula mesotelial típica	38
Figura 8: Predomínio de macrófagos	39
Figura 9: Predomínio de macrófagos e linfócitos	39

IV Lista de tabelas e quadros

Tabela 1: Tumores epiteliais da mama segundo OMS (2012)	19
Tabela 2: Tumores epiteliais raros da mama segundo OMS (2012).....	20
Tabela 3: Estadiamento dos tumores	21
Quadro 1: Classificação dos subtipos de câncer de mama	30
Quadro 2: Alguns critérios utilizados para diferenciação entre efusões do tipo transudato ou exsudato	37
Tabela 4: Principais diferenças morfológicas entre células normais e cancerígenas	40

IV. Resumo da Tese

Introdução: Cerca de 20% das pacientes com câncer de mama, mesmo em estágio inicial, desenvolverão a doença metastática e 90% das mortes por essa neoplasia decorrem de complicações oriundas de sua disseminação. Dessa forma, identificar características biológicas relacionadas à agressividade do câncer de mama metastático e ao prognóstico das pacientes faz-se necessário.

Objetivos: Investigar marcadores tumorais no derrame pleural neoplásico de pacientes com câncer de mama metastático, relacionando ao prognóstico das pacientes.

Metodologia: estudo de coorte histórica, onde foram inseridos pacientes com derrame pleural neoplásico e história de câncer de mama. Para cada um dos 4 trabalhos realizados (Artigos I, II, III e Apêndice 1), foi necessário recorrer a metodologias que envolveram a análise morfológica e a expressão de marcadores tumorais.

Resultados: No Artigo I, intitulado “Impact of Her-2 overexpressed on survival of patients with metastatic breast cancer”, evidenciamos alteração na expressão do painel imuno-histoquímico do câncer de mama metastático, quando comparado ao tumor primário, e que a super-expressão de Her-2 na metástase pleural representa mau prognóstico para as pacientes com câncer de mama avançado. No Artigo II, intitulado “*Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer*”, verificamos que o derrame pleural neoplásico com células isoladas está associado a prognóstico desfavorável. No Artigo III, descrevemos uma técnica de distensão citológica, que apresenta como vantagem, uma melhor distribuição das células com interesse diagnóstico. No apêndice 1, apresentamos a descrição do padrão esferoide, através da microscopia

eletrônica de transmissão. **Conclusão:** A heterogeneidade intra-tumoral, conforme observamos nos tumores estudados, referente à forma de organização celular, a proliferação, capacidade de metastatizar, sensibilidade a drogas, dependência de sinais de crescimento, são características importantes nas neoplasias, além da forma de interação de subclones geneticamente distintos durante esta evolução desse tumor, sugerindo uma grande importância em conhecer as características biológicas da metástase, permitindo sua aplicação na medicina personalizada.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia que mais acomete as mulheres em todo o mundo, tanto em países desenvolvidos quanto em desenvolvimento. Foram estimados para 2015, 1.790.861 novos casos de câncer de mama em todo o mundo (IARC, 2015).

A taxa de mortalidade mundial foi de 521.817, em 2012. A incidência para os próximos cinco anos no mundo é elevada, projetando 6.255.391 novos diagnósticos (IARC, 2015).

A incidência varia entre as diferentes regiões do mundo. Em 2012, as maiores taxas foram na Europa Ocidental (96 para cada 100 mil habitantes) e as menores taxas na África Central e na Ásia Oriental (27 para cada 100 mil habitantes) (INCA, 2016).

Segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) são estimados para o Brasil, em 2016, 57.960 casos novos de câncer de mama, com um risco estimado de 56,20 casos, a cada 100 mil habitantes. Desconsiderando os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais frequente nas mulheres nas regiões, Sul, Sudeste, Centro-Oeste e Nordeste, com taxas respectivamente de 74/100 mil, 68/100 mil, 55/100 mil, 38/100 mil. Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (22/100 mil) (INCA, 2016).

Avaliando exclusivamente o estado do Rio Grande do Sul, estimam-se 5.210 novos casos, representando um risco de 90,20 para cada 100 mil habitantes, e para a capital, Porto Alegre, as taxas são maiores ainda,

representando 130 casos para cada 100 mil habitantes. Na figura 1, destacamos o câncer de mama, como a neoplasia que mais afeta as mulheres, apresentando-se superior, inclusive, aos casos de câncer de pele não melanoma, tanto para o Estado do Rio Grande do Sul, quanto para a capital, Porto Alegre (INCA, 2016), no entanto destacamos aqui, que em geral, as capitais sediam centros de referência em tratamento, onde muitos pacientes do interior são direcionados aos referidos centros.

Localização Primária Neoplasia Maligna	Estimativa dos Casos Novos							
	Homens				Mulheres			
	Estado		Capital		Estado		Capital	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Próstata	6.000	109,59	870	126,85	-	-	-	-
Mama Feminina	-	-	-	-	5.210	90,20	1.040	130,99
Colo do Útero	-	-	-	-	870	15,14	150	19,47
Traqueia, Brônquio e Pulmão	2.640	48,16	350	50,89	1.600	27,67	300	38,13
Cólon e Reto	1.510	27,56	290	42,67	1.680	29,13	370	46,66
Estômago	830	15,17	110	16,48	510	8,86	90	10,95
Cavidade Oral	900	16,45	130	19,00	210	3,63	40	4,99
Laringe	660	12,03	80	12,10	90	1,57	**	1,49
Bexiga	600	10,90	110	16,67	250	4,34	50	6,05
Esôfago	1.100	20,13	100	14,26	400	6,98	40	5,48
Ovário	-	-	-	-	460	7,96	110	13,28
Linfoma de Hodgkin	200	3,66	30	4,58	100	1,68	20	1,97
Linfoma não Hodgkin	540	9,83	90	13,34	480	8,35	120	15,04
Glândula Tireoide	150	2,82	30	5,15	310	5,34	50	6,39
Sistema Nervoso Central	630	11,45	70	9,97	540	9,29	80	9,98
Leucemias	540	9,81	80	11,51	440	7,61	80	9,79
Corpo do Útero	-	-	-	-	350	6,02	110	14,52
Pele Melanoma	440	8,02	60	9,41	410	7,06	60	7,45
Outras Localizações	7.720	141,02	1.180	171,38	6.530	112,98	1.050	132,48
Subtotal	24.460	446,59	3.000	436,07	20.440	353,89	3.770	474,18
Pele não Melanoma	7.770	141,81	650	94,22	5.660	97,97	550	69,56
Todas as Neoplasias	32.230	588,45	3.650	530,56	26.100	451,89	4.320	543,36

*Números arredondados para múltiplos de 10. / **Número de casos menor que 15.

Figura 1: Incidência para novos casos de câncer de mama no Rio Grande do Sul e na capital, Porto Alegre. Fonte: INCA, 2016

Em relação à mortalidade, no ano de 2013, no Brasil, foram registrados 14.388 óbitos ocasionados pelo câncer de mama. Apesar dessa neoplasia apresentar bom prognóstico quando diagnosticada e tratada rapidamente, as taxas de mortalidade permanecem elevadas no Brasil. Acredita-se

sumariamente que essas taxas se apresentam altas devido ao diagnóstico ainda ser tardio (INCA, 2016).

1.2 Câncer de mama

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea, com subtipos biológicos distintos (Yersal e Barutca, 2014), e devido à incidência e mortalidade é considerado um grave problema de saúde pública (Cadoo, Fornier e Morris, 2013).

Para essa neoplasia, alguns fatores de risco associados ao seu desenvolvimento estão bem estabelecidos na literatura, e podem ser divididos em três grandes grupos: hormonais, genéticos e ambientais (Ban e Godellas, 2014), conforme abaixo relacionados:

- a) Hormonais: a idade é um dos fatores mais importantes, a qual está relacionada à participação hormonal na etiologia dessa neoplasia e ainda à vida reprodutiva da mulher;
- b) Genéticos: compreendidos pela história familiar de câncer de mama, associada a alterações especialmente nos genes supressores de tumor BRCA1 (*Breast Cancer 1*) e BRCA2 (*Breast Cancer 2*);
- c) Ambientais: englobam hábitos de vida como consumo de álcool, sedentarismo (Zhou, Zhao e Peng, 2015), excesso de peso, exposição à radiação ionizante, entre outros (INCA, 2016).

Em contraposição aos fatores de risco, são apresentados alguns fatores associados a um menor risco para desenvolver essa neoplasia, tais como, a prática de atividade física, alimentação saudável e manutenção do

peso corporal, o que reduz em 30% o risco de desenvolver câncer de mama (INCA, 2016).

Dessa forma, as lesões podem ser classificadas através da histopatologia, conforme descritas no item a seguir.

1.2.1 Classificação histopatológica do câncer de mama

A nova classificação, segundo “*Classification of Tumours of the Breast, Fourth Edition*” da Organização Mundial da Saúde de 2012, editado pela Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), contou com a *expertise* de patologistas, geneticistas, biólogos moleculares, clínicos, cirurgiões entre outros. A ação sinérgica de profissionais de diferentes áreas do conhecimento oferece a comunidade médica e científica internacional uma classificação que impacta na oncologia moderna (Gobbi, 2012).

Dessa forma, a nova classificação histológica dos tumores epiteliais adotada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) está apresentada na Tabela 1, e a classificação dos tumores epiteliais raros, na Tabela 2, subsequente:

Tabela 1: Tumores epiteliais da mama segundo OMS (2012).

Tipos de tumores epiteliais segundo a 4ª edição da Classificação Histológica de Tumores da Mama da OMS	Observações
Carcinoma microinvasivo	
Carcinoma mamário invasivo	
Carcinoma ductal invasivo, sem outra especificação (SOE)	
Carcinoma tipo misto	
Carcinoma pleomórfico	
Carcinoma com células gigantes tipo osteoclasto	
Carcinoma com elementos coriocarcinomatosos	
Carcinoma com elementos melanóticos	

Carcinoma lobular invasivo	
Carcinoma lobular clássico	
Carcinoma lobular sólido	
Carcinoma lobular alveolar	
Carcinoma lobular pleomórfico	
Carcinoma túbulo-lobular	
Carcinoma lobular misto	
Carcinoma tubular	
Carcinoma cribriforme invasivo	
Carcinoma com elementos medulares	Estudos mais recentes mostram que os carcinomas medulares são, em sua maioria, triplo-negativos, e de fenótipo basal. Expressam de forma variada citoqueratina (CK) de alto peso molecular (CK5, CK 5/6 e CK14), actina de músculo liso, receptor do fator de crescimento epidérmico 1 (EGFR), p53 e caveolina
Carcinoma medular	
Carcinoma medular atípico	
Carcinoma invasivo SOE com elementos medulares	
Carcinoma mucinoso	
Carcinoma com diferenciação em células em anel de sinete	
Carcinoma micropapilar invasivo	
Carcinoma com diferenciação apócrina	*Estudo imuno-histoquímico para CK, especialmente as de alto peso molecular (34β E-12, CK-5 ou CK-5/6), e p63 auxilia no diagnóstico diferencial e cora positivamente as células fusiformes tumorais, para o subtipo fibromatose-símile
Carcinoma metaplásico sem tipo especial	
Carcinoma adenoescamoso de baixo grau	
Carcinoma metaplásico fibromatose-símile*	
Carcinoma de células escamosas	
Carcinoma de células fusiformes	
Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimal	
Diferenciação condroide	
Diferenciação óssea	
Diferenciação em outros tipos mesenquimais	
Carcinoma metaplásico misto	
Carcinoma mioepitelial	

Fonte: Gobbi, 2012.

Tabela 2: Tumores epiteliais raros da mama segundo OMS (2012).

Tipos tumorais epiteliais raros segundo a 4ª edição da Classificação Histológica de Tumores da Mama da OMS (2012)*

Carcinoma com elementos neuroendócrinos	
Tumor neuroendócrino bem diferenciado	
Carcinoma neuroendócrino pouco diferenciado (carcinoma de pequenas células)	
Carcinoma com diferenciação neuroendócrina	
Carcinoma secretor	
Carcinoma papilar invasivo	
Carcinoma de células acinares	
Carcinoma mucoepidermoide	
Carcinoma oncocítico	
Carcinoma rico em lípidos	
Carcinoma de células claras rico em glicogênio	
Carcinoma sebáceo	
Tumores tipo glândula salivar/anexos cutâneos	
Cilindroma	
Hidroadenoma de células claras	

Fonte: Gobbi, 2012.

Essas recomendações promovem a reprodutibilidade diagnóstica e prognóstica, de forma concisa, com critérios padronizados e aceitos consensualmente (Gobbi, 2012).

Apesar dos tumores apresentarem diversas classificações, cerca de 80% dos cânceres de mama são ductais, e em menor parcela, lobulares (INCA, 2016).

1.2.2 Estadiamento

Além da classificação histológica, faz-se necessário quantificar a agressividade da neoplasia e verificar sua extensão e disseminação para exatidão do prognóstico e subsequente tratamento (Stricker e Kumar, 2010).

Para tanto, um dos métodos utilizados é o estadiamento, baseado na metodologia TNM. Pela qual T se relaciona ao tamanho do tumor, N ao comprometimento de linfonodos e M quanto à ocorrência de metástases. Abaixo estão descritas as características que norteiam o estadiamento (AJCC, 2009):

Tabela 3: Estadiamento dos tumores.

Fator T	Tumor
Tx	Tumor primário (não avaliado)
T0	Sem evidências de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> : carcinoma intraductal ou carcinoma lobular <i>in situ</i> , ou doença de Paget do mamilo, sem tumor
T1	Tumor < ou igual a 2cm em sua maior dimensão T1mic – Carcinoma microinvasor T1a – Tu > 0,1cm e ≤ 0,5cm T1b – Tu > 0,5 cm e ≤ 1 cm T1c – Tu > 1 cm e ≤ 2cm
T2	Tumores > 2 cm e < 5 cm
T3	Tumor > 5 cm
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para T4a - Parede torácica T4b - Edema ou ulceração de pele

Nota:	T4c - 4 ^a + 4b T4d - Carcinomas inflamatórios Parede torácica inclui arcos costais, músculos intercostais e músculo serrátil anterior, mas não músculo peitoral. A doença de Paget associada ao tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor.
Fator N	Gânglios linfáticos
Nx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Sem metástases aos gânglios linfáticos regionais
N1	Metástases para linfonodos axilares ipsilaterais móveis
N2	N2a - Metástases para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes; N2b - Metástases clinicamente aparente para linfonodo infraclavicular N3b - Metástases para linfonodos da mama interna e axilar N3c - Metástases para linfonodo supraclavicular
Fator M	Metástase à distância
Mx	Metástases à distância não podem ser avaliadas
M0	Ausência de metástases à distância
M1	Presença de metástases à distância

Fonte: AJCC, 2009.

1.3 Marcadores tumorais

O processo da carcinogênese mamária não é totalmente esclarecido. Sabe-se que esse é dividido em três fases: iniciação, promoção e progressão. A iniciação é caracterizada pelo envolvimento de eventos genéticos e desencadeada por fatores carcinogênicos, como a radiação ionizante, por exemplo. A etapa que compete à promoção ocorre quando incidem estímulos específicos para que ocorra o crescimento tumoral, por exemplo, a partir da ação hormonal, reações inflamatórias ou fatores de crescimento. E a fase que corresponde à progressão refere-se à capacidade potencial de invasão e sua consequente metastatização a partir de um tumor primário (Menke e cols., 2006).

Avanços tecnológicos estão sendo inseridos na área da oncologia, possibilitando a melhor compreensão das bases moleculares e celulares do processo de iniciação e progressão do câncer de mama. Novos anticorpos e metodologias [imuno-histoquímica, microdissecção a laser, microarranjos de

ácido desoxirribonucléico (DNA), sequenciamento de última geração] estão permitindo estratificar e classificar o câncer de mama de acordo com a expressão proteica e genômica. Estabelecendo assim assinaturas genéticas tanto preditivas quanto em relação à possibilidade de resposta a terapia (Gobbi, 2012).

Dessa forma, os biomarcadores fornecem informações para caracterizar as assinaturas do câncer, as quais são importantes para um tratamento personalizado. A medicina personalizada baseada na compreensão da carcinogênese molecular, farmacogenômica, e as diferenças genéticas individuais que determinam a resposta a quimioterápicos (Grüllich e Von Kalle, 2012; Kalia, 2015).

Os marcadores tumorais podem ser divididos em: diagnóstico, prognóstico, tratamento e subgrupos de prevenção (Nalejska, Mączyńska e Lewandowska, 2014; Kalia, 2015), sendo que, os marcadores de diagnóstico, também chamados de preditivos, são alvos de intervenção, identificados por caracterizar mutações-chave e vias moleculares envolvidas no desenvolvimento e proliferação do tumor (Nalejska, Mączyńska e Lewandowska, 2014; Kalia, 2015).

Na figura abaixo (figura 2), são apresentados exemplos de marcadores prognósticos e preditivos em tipos específicos de tumor através da determinação da ocorrência de polimorfismo, mutação ou metilação de DNA, a expressão gênica, detecção da presença de moléculas de microRNA (miRNA) ou ainda células tumorais circulantes (CTC), que são marcadores específicos no sangue periférico. Um bom biomarcador é caracterizado pela especificidade a um tipo de tumor, um nível apropriado de sensibilidade, e ainda deve refletir a

fase da doença ou resposta à terapia (Nalejska, Mączyńska e Lewandowska, 2014).

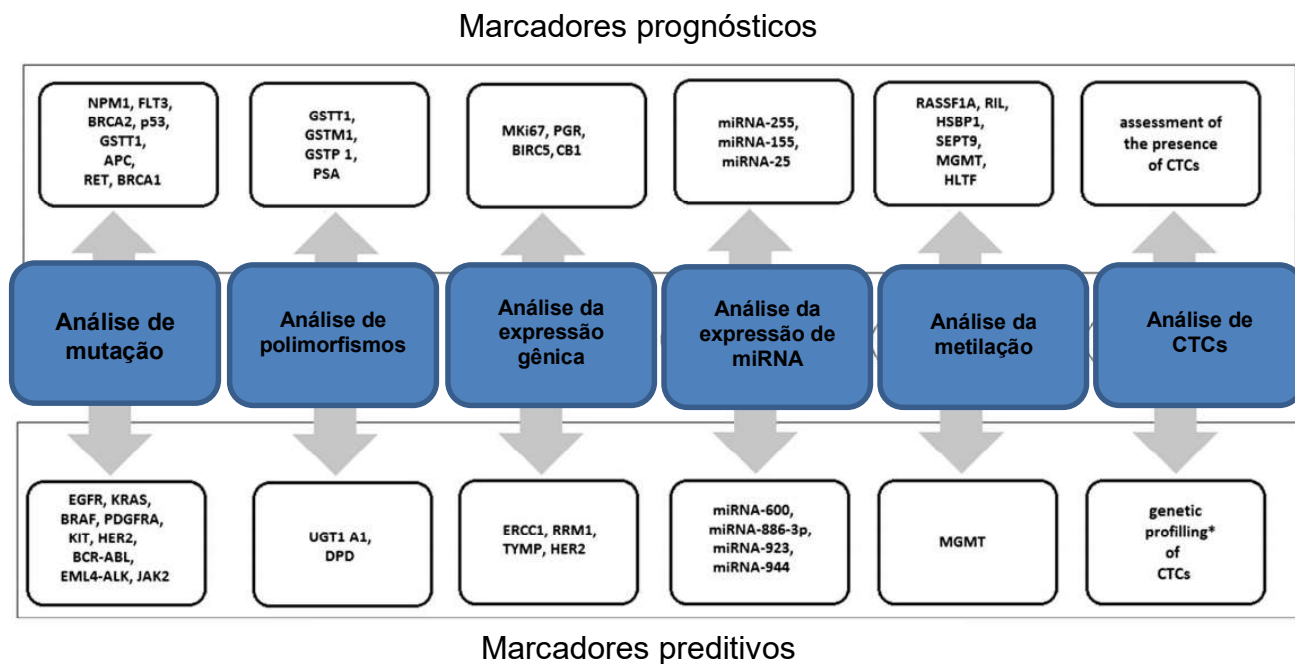


Figura 2: Identificação de biomarcadores através de técnicas distintas (* estudos em curso). Adaptado de: Nalejska, Mączyńska e Lewandowska, 2014.

1.4 Marcadores tumorais imuno-histoquímicos

Na prática clínica, utilizam-se marcadores imuno-histoquímicos, onde o princípio dessa técnica ocorre através da identificação de proteínas intracelulares ou de superfície, em todos os tecidos. Dentre a sua aplicabilidade, consta a caracterização de diferentes subtipos de tumores, a confirmação de sítio primário (no caso de tumor metastático), além de prever o prognóstico e a terapia ao paciente oncológico. E existe uma grande variedade de anticorpos que contribuem para as mais diversas investigações patológicas (Zaha, 2014).

Os tumores usualmente são classificados de acordo com suas características biológicas, servindo como base para a classificação molecular

do câncer de mama, utilizada no cuidado e gestão de pacientes oncológicos (Yersal e Barutca, 2014; Chikarmane e cols., 2015) e conforme relatado por Perou e cols. (2000), o subtipo molecular do câncer de mama determina o padrão de desenvolvimento e a doença metastática (Perou e cols., 2000).

Dessa forma, apresentaremos as características em relação aos marcadores tumorais elencados neste estudo, concomitantemente associando ao prognóstico e a terapia.

1.4.1 Receptores hormonais

Os receptores de estrogênio e progesterona pertencem à superfamília dos receptores hormonais que, além de incluir diversos receptores hormonais esteróides, incluem também, receptores de hormônio da tireóide, da vitamina D e de ácido retinóico. Essas proteínas funcionam como fatores de transcrição, quando conectadas a seus respectivos ligantes. Quando estão expressos os receptores de estrógeno nas células neoplásicas, essas são bem diferenciadas e semelhantes às células normais dos ductos, sendo passíveis de sofrer influência hormonal (Silveira, Pessini e Silveira, 2012).

Aproximadamente 75% dos tumores da mama expressam receptores de estrógeno e 55% expressam receptores de progesterona. A expressão desses marcadores implica em recorrência e prognóstico, prevendo ainda resposta a terapia endócrina (Cadoo, Fornier e Morris, 2013).

Em relação ao receptor de progesterona, a sua expressão prevê resposta ao tamoxifeno em mulheres na pré-menopausa (Stendahl e cols., 2006), em contrapartida, a sua não expressão foi inferida por Purdie e cols.

(2014) e Bogina e cols. (2015) como indicativo de mau prognóstico, associada a recidiva loco-regional, em câncer de mama positivo para estrógeno (Purdie e cols., 2014; Bogina e cols., 2015).

Tumores positivos para estrógeno, geralmente são menores, linfonodo negativo e baixo grau, quando comparados aos tumores estrógeno negativos (Cadoo, Fournier e Morris, 2013).

Em relação à sobrevida, pacientes que apresentam células neoplásicas positivas para estrógeno, em geral, apresentam uma melhor tendência de sobrevida, quando tratadas com terapia hormonal (Van Galen e cols., 2010). Apresentam também, maiores intervalos de tempo livre de doença, com baixo índice de proliferação e metastatizam com menor frequência para o cérebro. De forma global, tumores que apresentam elevados níveis de receptores de estrógeno, apresentam melhor prognóstico, quando comparados com aqueles que expressam níveis intermediários ou sem receptores (Silveira, Pessini e Silveira, 2012).

Frente à resposta a terapia, o “*Cancer Study Group International*”, dividiu o câncer de mama em três grupos de acordo com o percentual de células positivas para receptores hormonais. Sendo que 0% foi considerado não responsivo, de 1 a 9%, com resposta incerta e acima de 10% foram considerados responsivos (Zaha, 2014).

Abaixo apresentamos as figuras 3 (a e b), apresentando positividade para receptor de estrógeno e 4 (a e b) para receptor de progesterona.

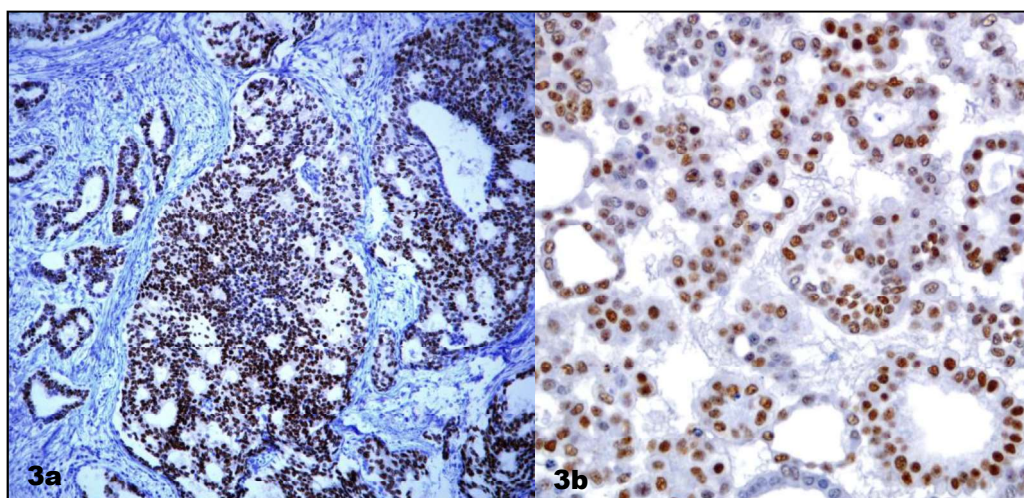


Figura 3: 3a: Carcinoma ductal infiltrante (100X) e 3b derrame pleural neoplásico, positivos para receptor de estrógeno (200X). Fonte: autores.

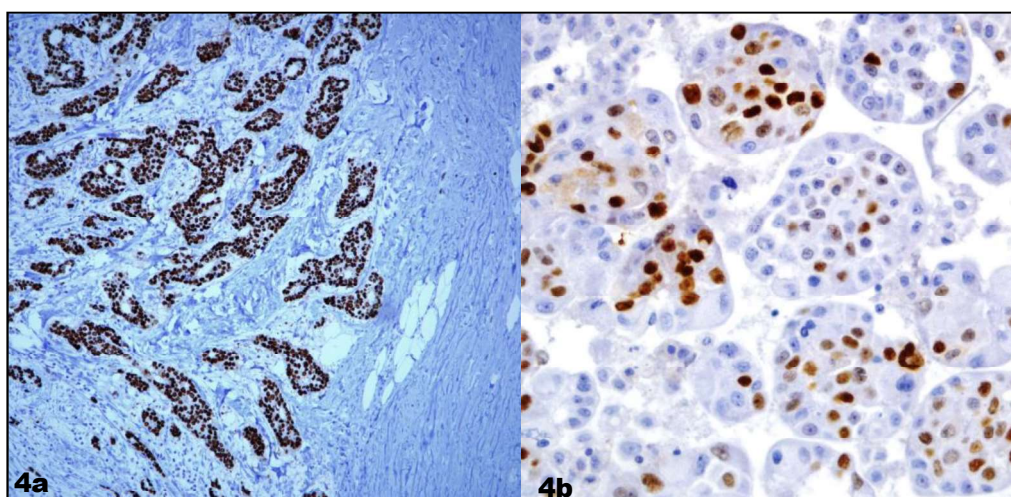


Figura 4: 4a: Carcinoma ductal infiltrante (100X) e 4b derrame pleural neoplásico, positivos para receptor de progesterona (200X). Fonte: autores.

1.4.2 Oncogene C-erb-B2/ Her-2

Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (Her-2) é um receptor glicoproteico transmembrana, codificado pelo proto-oncogene erbB-2, localizado no cromossomo 17 q21 (Veiga e cols., 2009), e pertence a uma classe de antígenos tumorais, codificado por genes super-expressos nos tumores (Silveira, Pessini e Silveira, 2012).

Os tumores que apresentam super-expressão de Her-2, são estreitamente relacionados à ausência de receptores hormonais, normalmente mais agressivos, portanto representa um mau prognóstico clínico (Mamani-Cancino e cols., 2014; Zaha, 2014).

A super-expressão de Her-2 é identificada em 10 a 25% dos casos de câncer de mama invasivos, e sua expressão evidencia sensibilidade ao tratamento com Herceptin® (trastuzumab). A terapia específica para Her-2 mostra uma mudança na história natural da doença e sobrevida global dos pacientes. Porém, no câncer de mama avançado, verificou-se que apenas 10 a 34% dos pacientes respondem a esta terapia, portanto a resistência ao trastuzumab está associada ao maior risco de progressão ou morte por câncer (Slamon e cols., 2011; Zaha, 2014; Adamczyk e cols., 2015).

Abaixo, apresentamos a figura 5, onde 5a representa a expressão imuno-histoquímica de Her-2 em carcinoma ductal infiltrante e 5b, Her-2 em derrame pleural neoplásico.

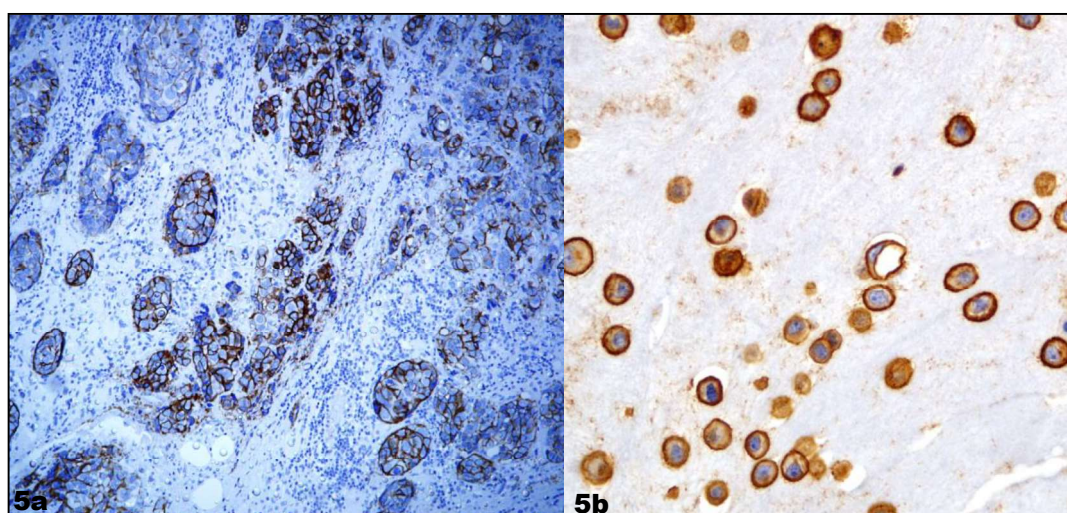


Figura 5: 5a Carcinoma ductal infiltrante (100x) e 5b derrame pleural neoplásico (200X), positivos para Her-2. Fonte: autores.

O câncer de mama triplo-negativo é definido pela ausência detectável de receptor de estrogênio, receptor de progesterona e Her-2 (Dent e cols., 2007; Lehmann e Pietenpol, 2014). Este subtipo, em geral, apresenta-se mais agressivo no curso da doença, afetando mulheres com idade inferior a 35 anos, e tumores com grau 3, histologia invasiva, nível elevado de proliferação celular verificado por Ki-67 (marcador de proliferação celular, antígeno nuclear) e rápido desenvolvimento da doença (Zhukova, 2015).

Este fenótipo constitui cerca de 15% de todos os cânceres de mama invasivos. Tumores basal ou “*basal-like*” são associados com características agressivas histológicas (Livasy e cols., 2006), portadores da mutação BRCA (Foulkes e cols., 2003; Livasy e cols., 2006) e mau prognóstico (Livasy e cols., 2006; Stead e cols., 2009; Anestis e cols., 2015).

Pacientes triplo-negativo têm pior sobrevida global em cinco anos (73,6 + 3,6%) e sobrevida livre de doença de cinco anos (70,6 + 3,5%), o que é significativamente mais baixa do que a sobrevivência comparável de pacientes com outros subtipos de câncer de mama (Zhukova, 2015).

1.4.3 Índice de proliferação celular

O marcador de proliferação celular Ki-67 é importante na segregação dos pacientes com receptores hormonais positivos, para acrescentar quimioterapia à terapia endócrina. Os dados do Registro Clínico de Câncer de Regensburg (Baviera/Alemanha) mostraram que a expressão de Ki-67 apresentou-se como um parâmetro prognóstico independente adicional para

sobrevida livre de doença e sobrevida global em pacientes com câncer de mama (Inwald e cols., 2013; Zaha, 2014).

A expressão elevada de Ki-67 está relacionada aos subtipos triplo-negativo e Her-2 super-expresso, neste contexto, subtipos de prognóstico desfavorável (Shokouh, Ezatollah e Barand, 2015).

Na tentativa de padronizar as informações, ocorreu a formulação de um painel imuno-histoquímico para individualização dos tumores na “12ª *Breast International Conference Cancer*”, realizada em St Gallen (Suíça) em 2011, onde os especialistas identificaram quatro subtipos de câncer de mama, classificados de acordo com a expressão dos receptores de estrógeno e progesterona, a super-expressão e/ou amplificação do Her-2 (Zaha, 2014).

Apesar de ainda existirem divergências sobre a classificação dos tumores da mama, a referida categorização proposta por Goldhirsch (2011), foi referenciada no estudo de revisão de Yersal e Barutca (2014), por consenso, como a mais utilizada. Nela são identificados quatro tipos, denominados: luminal A, luminal B (com suas variantes), Her-2 super-expresso e “*basal-like*” (triplo-negativo). No quadro 1, apresentamos resumidamente suas características:

Quadro 1: Classificação dos subtipos de câncer de mama

Subtipo	Fenótipo	Caracterização
Luminal A	Receptores hormonais+, Her-2-, Ki-67 baixo (um nível de <14% foi correlacionado para definição de luminal A, e para receptor de progesterona >20%).	Pacientes com subtipo luminal-A tem bom prognóstico, a taxa de recidiva é significativamente menor do que em outros subtipos. Apresenta comumente recidiva óssea, enquanto que no sistema nervoso central, hepática e a pulmonar, ocorrerem em menos de 10% dos pacientes. O

		tratamento baseia-se principalmente na terapia hormonal.
Luminal B	Luminal B-like (Her-2 negativo): Receptores hormonais positivos, Her-2 negativo, Ki-67 alto	Compreendem 15% a 20% dos cânceres de mama. Têm um fenótipo mais agressivo, maior grau histológico, índice proliferativo alto e um pior prognóstico. Taxa de recorrência maior e menor sobrevida, quando comparado com o subtipo luminal-A.
	Luminal-B (Her-2 positivo): Receptor de estrógeno e/ou progesterona positivo, Her-2 super-expresso ou amplificado, Ki-67 de qualquer índice	
Her-2 super-expresso	Her-2 super-expresso ou amplificado, Receptores hormonais negativos	Ocorrem em 15 a 20%. Conferem um comportamento mais agressivo. São caracterizados por uma elevada expressão do gene Her-2. Morfologicamente estes tumores são altamente proliferativos, 75% têm elevado grau histológico e nuclear, e mais de 40% têm mutação em p53.
Basal	Receptor de estrógeno e progesterona negativos, Her-2 negativo	São associados com alto grau histológico e nuclear, presença de zonas de necrose ou fibrose centrais, elevado índice proliferativo e mitótico. A maioria destes tumores são ductais infiltrante com padrão de crescimento sólido, comportamento clínico agressivo e elevada taxa de metástases pulmonar e cerebral.

Adaptado de: Goldhirsch e cols., 2011; Yersal e Barutca, 2014.

Dentre esses quatro subtipos de câncer de mama, o luminal-B tem a menor taxa de metástases cerebrais, enquanto que o subtipo Her-2 super-expresso foi associado a maior taxa de metástase pulmonar. Além disso, luminal-B apresentou maior sobrevida livre de doença e maior sobrevida total, quando comparado ao subtipo “*basal-like*” (Yin e cols., 2015).

O mesmo grupo de especialistas reunidos em St Gallen (Suíça/2011) descreveu recomendações de tratamento sistêmico para os subtipos, incluindo terapia endócrina para luminal A, terapia endócrina $\pm$ citotóxica para luminal B (Her-2 negativo), terapia anti-Her-2 + terapia endócrina para luminal B (Her-2 positivo), citotóxicos anti-Her-2 positivo para Her-2 (não luminal) e citotóxicos para triplo-negativo (Zaha, 2014).

O câncer de mama, pertencente a um mesmo subtipo molecular, apresenta vias distintas de mutação ou super-expressão que determinam diferentes prognósticos (Cancer Genome Atlas Network, 2012).

Dessa forma, tumores com apresentações clínicas e patológicas semelhantes, podem ter comportamentos distintos, portanto, para auxiliar na caracterização dos tumores, pesquisas têm se concentrado na definição de características biológicas específicas (Goldhirsch cols., 2009; Yersal e Barutca, 2014), conforme apresentamos no Artigo I desta Tese (página 57).

1.4.4 Prognóstico

O câncer de mama apresenta prognóstico relativamente bom, quando diagnosticado e tratado precocemente. No entanto, as taxas de mortalidade por câncer de mama permanecem elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Em países desenvolvidos como a Inglaterra, a sobrevida em cinco anos, é de 85%, enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece entre 60% (INCA, 2016).

É a segunda principal causa de morte por câncer em mulheres na Europa e países ocidentais, precedida apenas por câncer de pulmão (American Cancer Society, 2014; Shokouh, Ezatollah e Barand, 2015).

O subtipo luminal A é mais propenso a co-expressão de receptor de estrógeno e progesterona e está associado a um melhor desfecho quando comparado ao subtipo luminal B (Cadoo, Fournier e Morris, 2013). O fenótipo triplo-negativo está relacionado à prevalência na ocorrência de metástases viscerais (Gao e cols., 2009; Koo, Jung e Jeong, 2010).

A heterogeneidade intra-tumoral, referente à morfologia celular, taxa de proliferação, capacidade de metastatizar, sensibilidade a drogas, dependência de sinais de crescimento e iniciação do tumor, estão sendo reconhecidas como uma importante característica da maioria dos tumores malignos (Condeelis e Pollard, 2006; Kalluri e Zeisberg, 2006; Calbo e cols., 2011). Estudos recentes estão gerando questionamentos sobre a forma de interação de subclones geneticamente distintos durante a evolução do tumor (Calbo e cols., 2011; Mcgranahan e Swanton, 2015).

Observando então a heterogeneidade dos tumores, a medicina personalizada procura otimizar o resultado do tratamento (Kaufman e cols., 2009; Jerusalem e cols., 2015).

1.5 Câncer de mama metastático

A locomoção celular e a invasão a outros tecidos estão associadas à morfologia dinâmica da célula, especialmente ao citoesqueleto e as estruturas

de adesão. A ocorrência de metástases depende do sucesso entre as células tumorais e o microambiente do órgão específico (Guimarães e Rosa, 2008).

No entanto, alguns desses processos que envolvem o mecanismo de disseminação celular maligna, tais como: a invasão, sobrevivência no sistema linfático, sanguíneo e o sucesso da colonização em outros órgãos, por não ser completamente elucidados, são focos de pesquisas (Guimarães e Rosa, 2008). Apesar dos avanços terapêuticos, em torno de 20 a 30% das pacientes (estatísticas americanas) com câncer de mama desenvolverão a doença metastática (Kennecke e cols., 2010) pela formação de tumores secundários em órgãos distantes como pulmões, fígado, cérebro e ossos, e 90% das mortes por esta neoplasia decorrem de complicações oriundas da disseminação metastática (Eckhardt e cols., 2012; Cadoo, Fornier e Morris, 2013).

A metástase é considerada um processo complexo, envolvendo células tumorais e o suporte através de recursos que lhe ofereçam condições para desenvolver novos focos da doença. Dentre essas características estão a ruptura da membrana basal, a perda de diferentes junções intercelulares e a capacidade migratória do local do tumor primário. No entanto, os mecanismos que desencadeiam essa capacidade migratória e os fatores que regulam esses processos ainda não são totalmente compreendidos (Ribelles e cols., 2014).

Os locais habituais de metástases à distância do câncer de mama são o pulmão, cérebro, fígado, e ossos (Koo, Jung e Jeong, 2010). Em relação ao câncer de mama metastático, este é considerado uma doença incurável, porém atualmente os tratamentos são capazes de retardar a progressão da doença, prolongar a sobrevida, aliviar os sintomas, oferecendo uma melhor qualidade de vida. No entanto, esta terapia requer a identificação de biomarcadores

preditivos de resposta ao tratamento (Mustacchi e cols., 2015; Swain e cols., 2015).

É importante ressaltar, que conforme Kaufman e cols. (2009), é importante tratar a metástase como uma nova entidade tumoral, identificando novamente seus biomarcadores para nortear o tratamento (Kaufman e cols., 2009).

Referente à expressão de biomarcadores no tumor primário e na metástase, Koo, Jung e Jeong (2010) mostraram que houve 100% de concordância com a expressão de Her-2 no câncer de mama e nas respectivas metástases, porém Vincent-Salomon e cols. (2002) mostraram alteração no padrão de expressão de Her-2, após a quimioterapia pré-operatória (Vincent-Salomon e cols., 2002; Koo, Jung e Jeong, 2010).

No estudo de Vincent-Salomon e cols. (2002), não foram identificados tumores com super-expressão de Her-2, apenas na metástase (Vincent-Salomon e cols., 2002). Entretanto no estudo de Santos e cols. (dados não publicados) verificou-se a super-expressão exclusivamente no derrame pleural (figura 6).

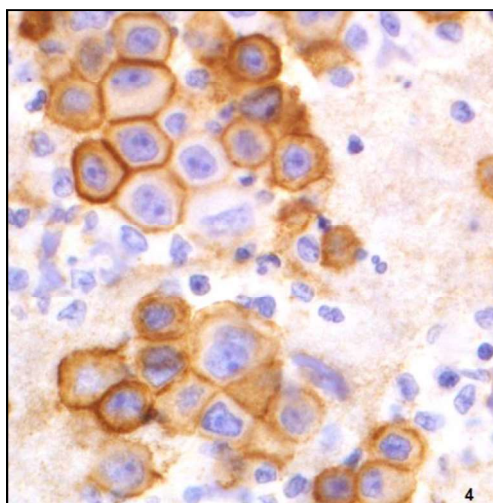


Figura 6: MDDS, 66 anos. Super-expressão de Her-2 no derrame pleural neoplásico (400X). Fonte: autores.

1.6 Componentes celulares encontrados em uma efusão pleural

O pulmão apresenta as pleuras como seu revestimento, sendo a pleural visceral fortemente aderida à superfície pulmonar, que é formada por um epitélio do tipo simples pavimentoso, chamado de mesotélio. A pleura parietal reveste a cavidade intratorácica, e entre elas, existe um filme líquido, muito fino, facilitando o deslizamento suave entre essas camadas (Kierszenbaum, 2008).

Esse líquido interpleural é derivado do plasma, a partir dos capilares da pleura parietal, o qual é produzido continuamente, e reabsorvido por meio de vasos linfáticos e vênulas da pleura visceral, mantendo o equilíbrio hidrodinâmico, sendo que o seu acúmulo é denominado efusão. As efusões são divididas em transudativas e exsudativas, de acordo com a origem do estímulo que levou ao desequilíbrio na quantidade desse líquido, e parâmetros bioquímicos foram propostos objetivando classificar as efusões (Smith e Kjeldsberg, 2008).

As condições mais comuns que causam derrames pleurais são a insuficiência cardíaca, doença maligna, pneumonia, tuberculose e embolia pulmonar. Dessa forma, derrames pleurais transudativos podem ser de origem sistêmica não-inflamatória, tais como insuficiência cardíaca e cirrose. E efusões exsudativas são causadas por doença inflamatória ou processo maligno, sendo as causas comuns, pneumonia, câncer, tuberculose e embolia pulmonar, levando ao aumento da permeabilidade capilar e acúmulo de líquido (Porcel e Light, 2006; Kopcinovic e Culej, 2014).

Para diferenciação das efusões, na rotina clínica, podem ser utilizados exames bioquímicos, bacteriológicos, citológicos (diferencial e oncótico) ou ainda biópsia pleural. Abaixo apresentamos alguns dos critérios que podem ser utilizados para auxiliar na classificação dessas efusões (Torres, 2005):

Quadro 2: Alguns critérios utilizados para diferenciação entre efusões do tipo transudato ou exsudato.

Transudato	Exsudato
Leucócitos: não costuma ultrapassar 1.000/mm ³	Leucócitos: superior a 10.000/mm ³ , sugerindo infecção
—	Bilirrubina: líquido pleural/ soro > 0,6
—	Colesterol > 45mg/dL
Albumina: ≥ 1,2 g/dL	Albumina: ≤ 1,2 g/dL
Razão da proteína do líquido pleural/ soro < 0.5	Razão da proteína do líquido pleural/ soro > 0.5
Relação de lactato desidrogenase no fluido pleural/ soro < 0.6	Relação de lactato desidrogenase no fluido pleural/ soro > 0.6

Adaptado de: Torres, 2005; Smith e Kjeldsberg, 2008; Kopcinovic e Culej, 2014.

A glicose é importante em quadro infeccioso bacteriano e de origem por artrite reumatoide, com valores que podem estar diminuídos em caso de origem neoplásica ou tuberculose pleural. Outros parâmetros bioquímicos ainda podem ser testados, por exemplo, a amilase, a qual em condições normais deve apresentar valores inferiores aos níveis séricos. Em níveis elevados pode sugerir pancreatite ou câncer por exemplo. O valor de pH geralmente é avaliado de forma conjunta com a glicose e lactato desidrogenase, portanto quando valores de pH inferior a 7.0, glicose inferior a 60mg/dL e lactato desidrogenase maior que 1.000 U/L, geralmente em

derrames parapneumônicos, sugere empiema, com indicação de drenagem torácica (Torres, 2005).

Em relação à celularidade, a predominância de neutrófilos pode estar associada a processos agudos, como empiema, parapneumonia ou pós-embolia na fase inicial. Já a predominância de linfócitos pode estar associada ao processo tardio da tuberculose, embolia pulmonar, neoplasia, entre outras causas mais raras. E a citologia oncológica é importante para o diagnóstico neoplásico (Torres, 2005).

Referente a essa celularidade, nas efusões benignas, são identificadas células mesoteliais, as quais apresentam citoplasma abundante, translúcido e núcleo central ou excêntrico, com limite marcante, permitindo a visualização de nucléolo, conforme evidenciado na figura 7. Quando as células mesoteliais apresentam-se reativas podem apresentar binucleações, aumento nuclear e nucléolo evidente (Shidham e Atkinson, 2007).

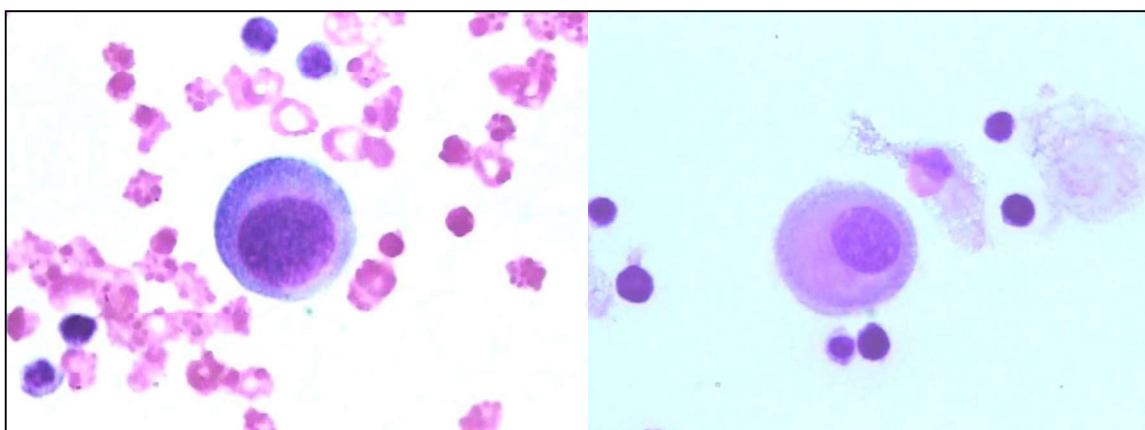


Figura 7: Célula mesotelial típica. Ao centro das imagens, uma célula mesotelial típica. Pode-se observar a região citoplasmática, núcleo geralmente central, ou excêntrico, como na imagem da direita. Coloração de May-Grunwald-Giemsa. Aumento de 1000X. Fonte: autores.

Além das células mesoteliais, macrófagos podem ser encontrados nas efusões, e podem apresentar-se de tamanhos variados, exibindo núcleo ovóide

ou reniforme, nucléolo visível e citoplasma abundante, delicado e esponjoso (Mcckee, 2001), conforme a figura 8.

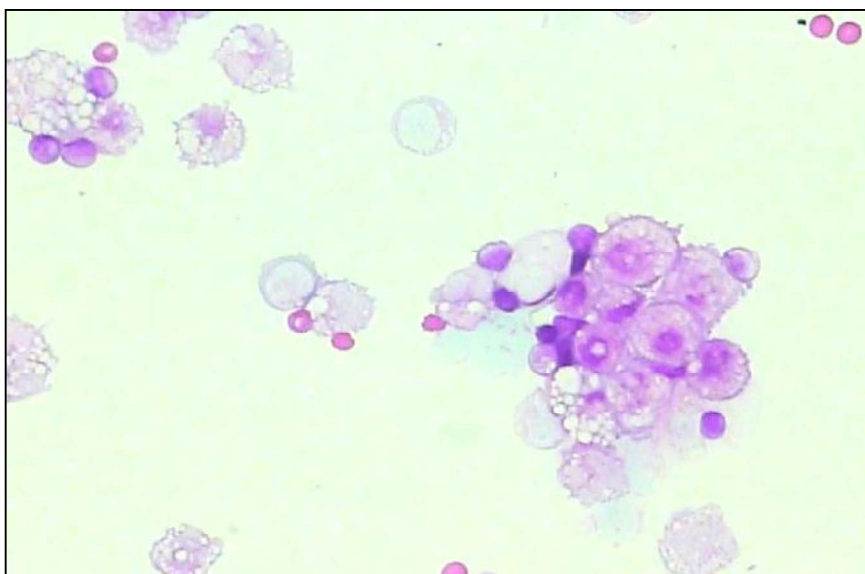


Figura 8: Predomínio de macrófagos. Coloração de May-Grunwald-Giemsa. Aumento de 400X. Fonte: próprios autores.

Na figura 9 apresentamos características celulares normais, com predomínio de macrófagos e linfócitos.

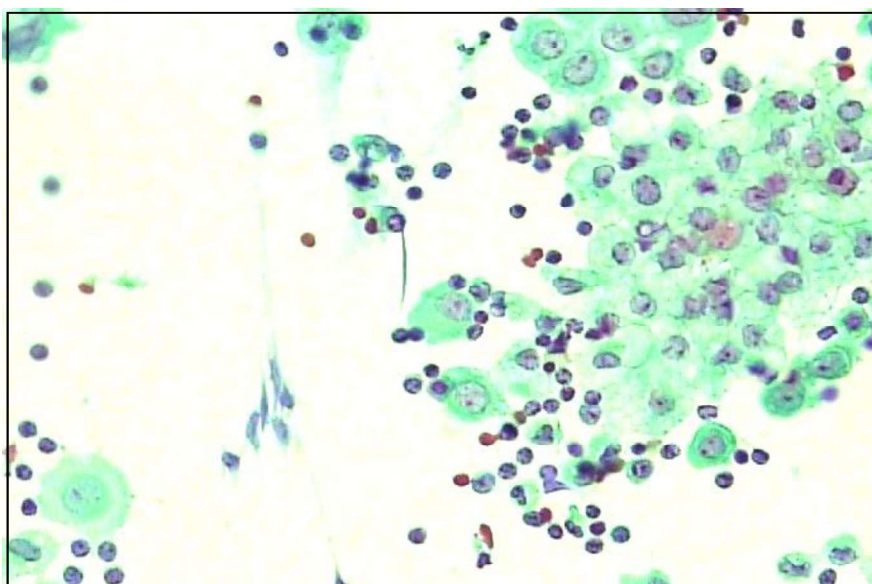


Figura 9: Predomínio de macrófagos e linfócitos, com características celulares normais. Coloração de Papanicolaou. Aumento de 400X. Fonte: próprios autores.

Koss (2005) reporta características celulares que permitem a diferenciação entre células benignas e cancerígenas (Koss, 2005), onde as principais dessas características estão apresentadas na Tabela 4:

Tabela 4: Principais diferenças morfológicas entre células normais e células cancerígenas.

	Células benignas	Células cancerígenas
O tamanho	Variáveis dentro dos limites fisiológicos	Variável além dos limites fisiológicos
A forma	Variáveis dentro dos limites fisiológicos dependendo do tipo de tecido	Frequentemente forma anormal
Tamanho nuclear	Variável dentro dos limites do ciclo celular	Variabilidade significativa
Relação núcleo citoplasma	Variável dentro dos limites fisiológicos	Comumente alterado em favor do núcleo
Forma do núcleo	Geralmente esférico, oval ou em forma de rim	Aberrações na forma e configuração
Textura da cromatina	Textura finamente granular, transparente	Textura grosseiramente granular (opaca)
Hipercromasia	Rara	Comum
Multinucleação	Não característico	Não característico
Nucléolo	Pequeno, regular em forma, limitado em número	Alargado e vários tamanhos
Junções celulares	De acordo com o topo celular	Evidência não conclusiva de anormalidades
Taxa mitótica	Necessárias para substituição	Elevado
Mitose	Bipolar*	Formas aberrantes

Adaptado de: Koss, Leopold (2005, p. 157).

1.6.1 Derrame pleural neoplásico

O diagnóstico de um derrame pleural neoplásico é caracterizado pela citologia positiva para células malignas e pelo aspecto sero-hemorrágico, em geral, com rápida recidiva após o esvaziamento (Guimarães e Rosa, 2008). A ocorrência de um derrame pleural neoplásico mostra que houve a disseminação sistêmica do tumor e, portanto, sugere que a doença não poderá ser curada por cirurgia (Silva e Moreira, 2012).

Em estágios avançados, muitos tumores malignos podem afetar a pleura, ocasionando a carcinomatose pleural. O câncer de pulmão é o mais comum em causar um derrame pleural maligno (40% dos casos). A segunda causa mais frequente, representando 25% dos casos, é o câncer de mama metastático, seguido do linfoma, em 10% dos casos (Ried e Hofmann, 2013; Demirhan, Ordu e Toker, 2014).

O mecanismo de formação do derrame pleural de origem neoplásica não é totalmente esclarecido. A infiltração neoplásica dos vasos linfáticos até então, era considerada o principal mecanismo, entretanto, observam-se alguns casos em que, após a drenagem ocorre o reacúmulo de grande quantidade de líquido. Observou-se então que a neoplasia estimula a formação de um fator de crescimento vascular endotelial, potente agente responsável pela permeabilidade capilar, o que corrobora a ideia de que o acúmulo de líquido ocorre a partir do aumento da permeabilidade pleural (Camargo e Perin, 2012).

O mecanismo geral da metástase tumoral é composto por interações recíprocas entre as células tumorais e tecidos hospedeiros, que incluem alterações na adesão, proteólise, invasão e angiogênese (Woodhouse, Chuaqui e Liotta, 1997; Koo, Jung e Jeong, 2010).

A identificação de células malignas no líquido pleural ou na pleura ocorre aproximadamente em 50% dos pacientes com tumores malignos. Aproximadamente 80% dos pacientes com recidiva pleural desenvolvem derrame pleural maligno nos primeiros cinco anos pós-cirurgia primária do câncer de mama (Demirhan, Ordu e Toker, 2014).

Derrames pleurais ocorrem com certa frequência em pacientes com câncer de mama (Fentiman e cols., 1981; Pokieser e cols., 2004) e esse

quadro clínico, está associado a mau prognóstico (Van Galen e cols., 2010; Yhim e cols., 2010).

O prognóstico está diretamente associado à resposta ao tratamento da doença de base (Guimarães e Rosa, 2008), bem como, ao tratamento sistêmico, sendo geralmente limitado, apresentando uma sobrevida média de quatro a dezenove meses (Raju e Kardinal, 1981; Santos e cols., 2012). Os pacientes acometidos têm a qualidade de vida reduzida e frequentemente são submetidos a muitas intervenções médicas, pelos decorrentes episódios de derrames pleurais. Geralmente o tratamento visa cuidados paliativos, reduzindo queixas clínicas, apresentando-se na forma de tratamento conservador a partir do monitoramento de curto prazo para a intervenção cirúrgica ou drenagem do derrame pleural (Ried e Hofmann, 2013).

É importante ainda, ressaltar que tumores com apresentações clínicas e patológicas semelhantes, podem ter comportamentos diferentes (Rakha e Ellis, 2011; Yersal e Barutca, 2014), por isso, estudos recentes têm se concentrado na definição de características biológicas mais detalhadas para melhorar a estratificação de risco do paciente, possibilitando oferecer maior chance de benefício e menor toxicidade, através de uma modalidade de tratamento específico (Rakha e Ellis, 2011; Yersal e Barutca, 2014).

Atualmente observamos mudanças tanto na modalidade de tratamento do câncer de mama metastático, quanto nas terapias disponíveis. Essas terapias contribuem para melhorias nas taxas de sobrevida e qualidade de vida das pacientes, enfatizando a importância da melhor compreensão na biologia do câncer de mama, oportunizando tratamento característico contra subconjuntos moleculares específicos (Senkus, Cardoso e Pagani, 2014).

O surgimento do carcinoma metastático da mama em efusões pode apresentar-se de formas distintas, sugerindo um papel importante para a citomorfologia dos fluidos (Danner e Gmelich, 1975). Estudos de Danner e Gmelich (1975), Wiley e Von Roenn (1990), Dieterich e cols. (1994) e Camillo e cols. (2014) apresentaram resultados discrepantes relacionando à forma de organização das células neoplásicas, frente ao prognóstico das pacientes (Danner e Gmelich, 1975; Towers e Melamed, 1979; Wiley e Von Roenn, 1990; Dieterich e cols., 1994; Camillo e cols., 2014).

Danner e Gmelich (1975) investigaram a forma de organização das células no fluido pleural, relacionando ao tipo histológico do câncer de mama. Os carcinomas ductais metastáticos formavam esferas ocas ou esferoides, as quais foram interpretadas como uma tentativa das células a formar carcinomas ductais (Danner e Gmelich, 1975).

Towers e Melamed (1978) relacionaram o prognóstico com a celularidade tumoral, frequência de mitoses, quantidade de leucócitos do líquido pleural e organização das células em *cluster*. Sendo que o mau prognóstico foi independente desses padrões (Towers e Melamed, 1979).

Wiley e Von Roenn (1990) avaliaram pacientes com carcinomas da mama e derrame pleural, investigando o prognóstico das pacientes de acordo com a expressão de estrógeno e a organização celular (células isoladas ou aglomeradas) (Wiley e Von Roenn, 1990).

Dieterich e cols. (1994) avaliaram o arranjo de células tumorais em esferoides, a atipia nuclear e taxa de mitose, relacionando a sobrevida das pacientes. As mulheres cujas células tumorais organizavam-se em esferoides, tiveram 24,5 meses de mediana de sobrevida, e 4 meses para as mulheres

com todos os outros padrões de organização celular, verificando ainda que a leve atipia nuclear e baixa taxa de mitose estão associadas à formação esferoidal (Dieterich e cols., 1994).

Mais recentemente, Camillo e cols. (2014) avaliaram as características em relação à forma de organização celular, classificando a amostra em padrões predominantemente isolados ou predominantemente esféricos. Sendo considerado como prognóstico desfavorável, o padrão isolado, resultado este independente de outras variáveis analisadas (Camillo e cols., 2014).

Sabendo que as células são pequenas e complexas, fator este que dificulta a observação de suas estruturas e composição macromolecular (Taboga e Vilamaior, 2013), torna-se necessário recorrer a distintas técnicas para elucidar algumas das características dessas células neoplásicas.

Dessa forma, buscando conhecer características órgão-específicas do câncer de mama metastático, bem como a compreender as diferenças do arranjo celular das células neoplásicas no líquido pleural, dois trabalhos dessa Tese (Artigo II, página 79, e apêndice 1, página 106), exibem resultados em relação à morfologia das células neoplásicas do derrame pleural.

Para a elaboração do Artigo II, foram resgatadas as lâminas confeccionadas para diagnóstico citológico no Laboratório de Patologia do Hospital de referência, e as mesmas foram analisadas e classificadas de acordo com a organização celular das células neoplásicas do derrame pleural.

Em relação à forma de organização destas células, para descrevermos suas características ultra-estruturais, recorreremos a Microscopia Eletrônica de Transmissão, apresentando as imagens e respectiva descrição no apêndice 1 desta Tese (página 106).

1.7 Justificativa

Frente ao exposto, em função dos elevados índices de morbidez e mortalidade ocasionados pelo câncer de mama e às consequências geradas a partir do quadro metastático, nos propomos a aprofundar os conhecimentos diante do quadro de derrame pleural maligno, uma vez que tumores com apresentações clínicas e patológicas semelhantes podem ter comportamentos diferentes. Dessa forma, com o intuito de buscar um maior conhecimento sobre as características biológicas específicas e a agressividade do câncer de mama metastático, relacionando ao prognóstico dessas pacientes, esperamos contribuir pelos seguintes estudos:

a) Artigo I: *“Impact of Her-2 overexpressed on survival of patients with metastatic breast cancer”*, visando avaliar a expressão dos marcadores tumorais do câncer de mama no derrame pleural neoplásico, relacionando ao prognóstico, para compreender as características específicas do sítio metastático.

b) Artigo II: *“Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in survival of patients with Breast Cancer”*, visando investigar a sobrevida dos pacientes com câncer de mama, pela análise citológica do derrame pleural, buscando conhecer o padrão das células tumorais e biomarcadores na história natural do câncer.

c) Artigo III: ao estudar os padrões de arranjos celulares, durante o desenvolvimento do Artigo II, observamos que a técnica citológica de distensão

dos líquidos pleurais ainda não havia sido descrita na literatura, onde nos propomos a descrevê-la.

d) Apêndice 1: visando descrever morfologicamente o padrão esferoidal, pela microscopia eletrônica de transmissão, buscando compreender as diferenças do arranjo celular das células neoplásicas no líquido pleural.

1.8 Referências Bibliográficas

Adamczyk A, Niemiec J, Janecka A, Harazin-Lechowska A, Ambicka A, Grela-Wojewoda A, *et al.* Prognostic value of PIK3CA mutation status, PTEN and androgen receptor expression for metastasis-free survival in HER2-positive breast cancer patients treated with trastuzumab in adjuvant setting. **Pol J Pathol**, v. 66, n. 2, p. 133-41, Jun 2015. ISSN 1233-9687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26247526> >.

AJCC. **American Joint Committee on Cancer**. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FR, Trotti A *et al*: Springer 2009.

American Cancer Society. **Cancer Facts & Figures 2014**. Atlanta, 2014.

Anestis A, Karamouzis MV, Dalagiorgou G, Papavassiliou AG. Is androgen receptor targeting an emerging treatment strategy for triple negative breast cancer? **Cancer Treat Rev**, v. 41, n. 6, p. 547-53, Jun 2015. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25944485> >.

Ban KA, Godellas CV. Epidemiology of breast cancer. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 23, n. 3, p. 409-22, Jul 2014. ISSN 1558-5042. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24882341> >.

Bogina G, Lunardi G, Coati F, Zamboni G, Gori S, Bortesi L *et al.* Progesterone receptor status and clinical outcome in breast cancer patients with estrogen receptor-positive locoregional recurrence. **Tumori**, v. 101, n. 4, p. 398-403, 2015 Jul-Aug 2015. ISSN 2038-2529. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26045108> >.

Cadoo KA, Fornier MN, Morris PG. Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. **Q J Nucl Med Mol Imaging**, v. 57, n. 4, p. 312-21, Dec 2013. ISSN 1824-4785. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24322788> >.

Calbo J, Van Montfort E, Proost N, Van Drunen E, Beverloo HB, Meuwissen R *et al.* A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small

cell lung cancer. **Cancer Cell**, v. 19, n. 2, p. 244-56, Feb 2011. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21316603> >.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 490, n. 7418, p. 61-70, Oct 2012. ISSN 1476-4687. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23000897> >.

Camargo SM, Perin AF. Tratamento Cirúrgico do Derrame Pleural Neoplásico. In: SILVA, L. C. C. D.; HETZEL, J. L., *et al* (Ed.). **Pneumologia: Princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.1002 p. ISBN 9788536326757.

Camillo ND, Dos Santos GT, Prolla JC, Flôres ER, Introíni GO, Brackmann RL *et al*. Impact of cell arrangement of pleural effusion in survival of patients with breast cancer. **Acta Cytol**, v. 58, n. 5, p. 446-52, 2014. ISSN 0001-5547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25377597> >.

Chikarmane SA, Tirumani SH, Howard SA, Jagannathan JP, Dipiro PJ. Metastatic patterns of breast cancer subtypes: what radiologists should know in the era of personalized cancer medicine. **Clin Radiol**, v. 70, n. 1, p. 1-10, Jan 2015. ISSN 1365-229X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25300558> >.

Condeelis J, Pollard JW. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. **Cell**, v. 124, n. 2, p. 263-6, Jan 2006. ISSN 0092-8674. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16439202> >.

Danner DE, Gmelich JT. A comparative study of tumor cells from metastatic carcinoma of the breast in effusions. **Acta Cytol**, v. 19, n. 6, p. 509-18, 1975 Nov-Dec. ISSN 0001-5547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/55031> >.

Demirhan O, Ordu C, Toke A. Prolonged pleural catheters in the management of pleural effusions due to breast cancer. **J Thorac Dis**, v. 6, n. 2, p. 74-8, Feb 2014. ISSN 2072-1439. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24605219> >.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, *et al*. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. **Clin Cancer Res**, v. 13, n. 15 Pt 1, p. 4429-34, Aug 2007. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17671126> >.

Dieterich M, Goodman SN, Rojas-corona RR, Emralino AB, Jimenez-Joseph D, Sherman ME. Multivariate analysis of prognostic features in malignant pleural effusions from breast cancer patients. **Acta Cytol**, v. 38, n. 6, p. 945-52, 1994 Nov-Dec. ISSN 0001-5547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7992584> >.

Eckhardt BL, Francis PA, Parker BS, Anderson RL. Strategies for the discovery and development of therapies for metastatic breast cancer. **Nat Rev Drug**

Discov, v. 11, n. 6, p. 479-97, Jun 2012. ISSN 1474-1784. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22653217> >.

Fentiman IS, Millis R, Sexton S, Hayward JL. Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. **Cancer**, v. 47, n. 8, p. 2087-92, Apr 1981. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261936> >.

Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Bégin LR, Goffin JR, Wong N. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 95, n. 19, p. 1482-5, Oct 2003. ISSN 1460-2105. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14519755> >.

Gao D, Du J, Cong L, Liu Q. Risk factors for initial lung metastasis from breast invasive ductal carcinoma in stages I-III of operable patients. **Jpn J Clin Oncol**, v. 39, n. 2, p. 97-104, Feb 2009. ISSN 1465-3621. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19052036> >.

Gobbi H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol Med Lab**, v. 48, p. 463-474, 2012.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. **Ann Oncol**, v. 20, n. 8, p. 1319-29, Aug 2009. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19535820> >.

_____. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**, v. 22, n. 8, p. 1736-47, Aug 2011. ISSN 1569-8041. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21709140> >.

Grülich C, Von Kalle C. Recent developments and future perspectives of personalized oncology. **Onkologie**, v. 35 Suppl 1, p. 4-7, 2012. ISSN 1423-0240. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22286581> >.

Guimarães JLM, Rosa DD. **Rotinas em Oncologia**. Porto Alegre: 2008. 942 ISBN 9788536311685.

IARC. Globocan 2012: Estimated Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer, 2015. Disponível em: < http://globocan.iarc.fr/Pages/fact_sheets_cancer.aspx >.

INCA. **Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: INCA 2016.

Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer M. Ki-67 is a prognostic parameter in breast cancer patients: results of a large population-based cohort of a cancer registry. **Breast Cancer**

Res Treat, v. 139, n. 2, p. 539-52, Jun 2013. ISSN 1573-7217. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23674192> >.

Jerusalem G, Collignon J, Josse C, Schroeder H, Rorive A, Frères P. Breast cancer: from target therapy to precision medicine. **Rev Med Liege**, v. 70, n. 5-6, p. 269-76, 2015 May-Jun 2015. ISSN 0370-629X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26285451> >.

Kalia M. Biomarkers for personalized oncology: recent advances and future challenges. **Metabolism**, v. 64, n. 3 Suppl 1, p. S16-21, Mar 2015. ISSN 1532-8600. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25468140> >.

Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 6, n. 5, p. 392-401, May 2006. ISSN 1474-175X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16572188> >.

Kaufman B, Mackey JR, Clemens MR, Bapsy PP, Vaid A, Wardley A. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 33, p. 5529-37, Nov 2009. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19786670> >.

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MCU, Voduc D, Speers CH *et al*. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3271-7, Jul 2010. ISSN 1527-7755. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20498394> >.

Kierszenbaum AL. **Histologia e biologia celular: uma introdução a patologia**. 2 ed. Elsevier, 2008.

Koo JS, Jung W, Jeong J. Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. **Tumori**, v. 96, n. 3, p. 424-32, 2010 May-Jun 2010. ISSN 0300-8916. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20845803> >.

Kopcinovic LM, Culej J. Pleural, peritoneal and pericardial effusions - a biochemical approach. **Biochem Med (Zagreb)**, v. 24, n. 1, p. 123-37, 2014. ISSN 1330-0962. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24627721> >.

Koss LG. **Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases**. 5 ed. 2005. ISBN 9780781719285.

Lehmann BD, Pietenpol JA. Identification and use of biomarkers in treatment strategies for triple-negative breast cancer subtypes. **J Pathol**, v. 232, n. 2, p. 142-50, Jan 2014. ISSN 1096-9896. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24114677> >.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. **Mod Pathol**, v. 19, n. 2, p. 264-71, Feb 2006. ISSN 0893-3952. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16341146> >.

Mamani-Cancino AD, Veloz-Martnez MG, Casasola-Busteros I, Moctezuma-Meza C, García-Cebada JM. Frecuencia de sobreexpresión del factor Her-2/neu en pacientes con cáncer de mama. **Ginecol Obstet**, v. 82, p. 369-376, 2014.

McCkee G. **Citopatologia**. São Paulo: 2001. 190p ISBN 0723424497.

Mcgranahan N, Swanton C. Biological and therapeutic impact of intratumor heterogeneity in cancer evolution. **Cancer Cell**, v. 27, n. 1, p. 15-26, Jan 2015. ISSN 1878-3686. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25584892> >.

Menke CH, Biazús JV, Xavier NL, Cavalheiro JA, Rabin EG, Bittelbtunn A. **Rotinas em Mastologia**. 2006. 270 ISBN 9788536307343.

Mustacchi G, Biganzoli L, Pronzato P, Montemurro F, Dambrosio M, Minelli M, *et al.* HER2-positive metastatic breast cancer: a changing scenario. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 95, n. 1, p. 78-87, Jul 2015. ISSN 1879-0461. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25748080> >.

Nalejska E, Mączyńska E, Lewandowska M. A. Prognostic and predictive biomarkers: tools in personalized oncology. **Mol Diagn Ther**, v. 18, n. 3, p. 273-84, Jun 2014. ISSN 1179-2000. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24385403> >.

Perou CM, Sørli T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 2000. ISSN 0028-0836. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10963602> >.

Pokieser W, Cassik P, Fischer G, Vesely M, Ulrich W, Peters-Engl C. Malignant pleural and pericardial effusion in invasive breast cancer: impact of the site of the primary tumor. **Breast Cancer Res Treat**, v. 83, n. 2, p. 139-42, Jan 2004. ISSN 0167-6806. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14997044> >.

Porcel JM, Light RW. Diagnostic approach to pleural effusion in adults. **Am Fam Physician**, v. 73, n. 7, p. 1211-20, Apr 2006. ISSN 0002-838X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16623208> >.

Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB, Ashfield A, Ogston S, Dewar JA, *et al.* Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. **Br J Cancer**, v. 110, n. 3, p. 565-72, Feb 2014. ISSN 1532-1827. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24300977> >.

Raju RN, Kardinal CG. Pleural effusion in breast carcinoma: analysis of 122 cases. **Cancer**, v. 48, n. 11, p. 2524-7, Dec 1981. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6170424> >.

Rakha EA, Ellis IO. Modern classification of breast cancer: should we stick with morphology or convert to molecular profile characteristics. **Adv Anat Pathol**, v. 18, n. 4, p. 255-67, Jul 2011. ISSN 1533-4031. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21654357> >.

Ribelles N, Santonja A, Pajares B, Llácer C, Alba E. The seed and soil hypothesis revisited: current state of knowledge of inherited genes on prognosis in breast cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 2, p. 293-9, Mar 2014. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24112814> >.

Ried M, Hofmann HS. The treatment of pleural carcinosis with malignant pleural effusion. **Dtsch Arztebl Int**, v. 110, n. 18, p. 313-8, May 2013. ISSN 1866-0452. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23720697> >.

Santos GT, Prolla JC, Camillo ND, Zavalhia LS, Ranzi AD, Bica CG. Clinical and pathological factors influencing the survival of breast cancer patients with malignant pleural effusion. **J Bras Pneumol**, v. 38, n. 4, p. 487-93, 2012 Jul-Aug 2012. ISSN 1806-3756. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22964933> >.

Senkus E, Cardoso F, Pagani O. Time for more optimism in metastatic breast cancer? **Cancer Treat Rev**, v. 40, n. 2, p. 220-8, Mar 2014. ISSN 1532-1967. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24126121> >.

Shidham VB, Atkinson BF. **Cytopathologic diagnosis of serous fluids**. . 1 ed. Philadelphia, USA: 2007.

Shokouh TZ, Ezatollah A, Barand P. Interrelationships Between Ki67, HER2/neu, p53, ER, and PR Status and Their Associations With Tumor Grade and Lymph Node Involvement in Breast Carcinoma Subtypes: Retrospective-Observational Analytical Study. **Medicine (Baltimore)**, v. 94, n. 32, p. e1359, Aug 2015. ISSN 1536-5964. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26266392> >.

Silva LCCD, Moreira JDS. Derrame pleural. In: Silva LCCD, Hetzel JL., *et al* (1 Ed.). **Pneumologia: Princípios e práticas**. Porto Alegre: Artmed, 2012. p.1002 p. ISBN 9788536326757.

Silveira GPGD, Pessini AS, Silveira GGGD. **Ginecologia baseada em evidências**. 3ª. São Paulo: Atheneu, 2012. ISBN 9788538803072.

Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M, *et al*. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. **N Engl J Med**, v. 365, n. 14, p. 1273-83, Oct 2011. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21991949> >.

Smith GP, Kjeldsberg CR. Líquido Cerebrospinal, Sinovial e Seroso. In: HENRY, J. B. (Ed.). **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20 ed. Barueri, SP: Manole, 2008. cap. 19, p.471-495.

Stead LA, Lash TL, Sobieraj JE, Chi DD, Westrup JL, Charlot M, *et al.* Triple-negative breast cancers are increased in black women regardless of age or body mass index. **Breast Cancer Res**, v. 11, n. 2, p. R18, 2009. ISSN 1465-542X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19320967> >.

Stendahl M, Rydén L, Nordenskjöld B, Jönsson PE, Landberg G, Jirstrom K. High progesterone receptor expression correlates to the effect of adjuvant tamoxifen in premenopausal breast cancer patients. **Clin Cancer Res**, v. 12, n. 15, p. 4614-8, Aug 2006. ISSN 1078-0432. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16899609> >.

Stricker TP, Kumar V. **Bases Patológicas das doenças**. 8th ed. Rio de Janeiro: 2010.

Swain SM, Baselga J, Kim SB, Ro J, Semiglazov V, Campone M, *et al.* Pertuzumab, trastuzumab, and docetaxel in HER2-positive metastatic breast cancer. **N Engl J Med**, v. 372, n. 8, p. 724-34, Feb 2015. ISSN 1533-4406. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25693012> >.

Taboga SR, Vilamaior PSL. Microscopias. In: CARVALHO, H. F. e RECCO-PIMENTEL, S. M. (Ed.). **A célula**. 3ª ed. São Paulo, 2013. p.45-54.

Torres BS. **Pneumologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

Towers KJ, Melamed MR. Absence of prognostic features in the cytology of effusions due to mammary cancer. **Acta Cytol**, v. 23, n. 1, p. 30-4, 1979 Jan-Feb 1979. ISSN 0001-5547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/285549> >.

Van Galen KP, Visser HP, Van der Ploeg T, Smorenburg CH. Prognostic factors in patients with breast cancer and malignant pleural effusion. **Breast J**, v. 16, n. 6, p. 675-7, 2010 Nov-Dec 2010. ISSN 1524-4741. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21070453> >.

Veiga RKDA, Melo-Júnior MRd, Filho JLSA, Lins CAB, Teles N. Avaliação digital comparativa da expressão tecidual da proteína cerbB-2 em mulheres portadoras de doenças tumorais da mama. **J Bras Patol Med Lab**, v. 45, p. 131-137, 2009.

Vincent-Salomon A, Jouve M, Genin P, Fréneaux P, Sigal-Zafrani B, Caly M, *et al.* HER2 status in patients with breast carcinoma is not modified selectively by preoperative chemotherapy and is stable during the metastatic process. **Cancer**, v. 94, n. 8, p. 2169-73, Apr 2002. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12001113> >.

Wiley EL, Von Roenn J. Metastatic breast carcinoma in pleural fluid. Correlation of morphology with estrogen receptor activity and morphology of the primary carcinoma. **Acta Cytol**, v. 34, n. 2, p. 169-74, 1990 Mar-Apr 1990. ISSN 0001-5547. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2321450> >.

Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA. General mechanisms of metastasis. **Cancer**, v. 80, n. 8 Suppl, p. 1529-37, Oct 1997. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9362419> >.

Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 3, p. 412-24, Aug 2014. ISSN 2218-4333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25114856> >.

Yhim HY, Han SW, Oh DY, Han W, Im SA, Kim TY, *et al.* Prognostic factors for recurrent breast cancer patients with an isolated, limited number of lung metastases and implications for pulmonary metastasectomy. **Cancer**, v. 116, n. 12, p. 2890-901, Jun 2010. ISSN 0008-543X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20564396> >.

Yin, D, Wang YL, Wang YF, Yang L, Zhang L, Tang C, *et al.* Correlation between clinical pathology of luminal b breast cancer and determination of estrogen receptor, progesterone receptor and her2 expression combined with nuclear morphology. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 29, n. 3, p. 579-87, 2015 Jul-Sep 2015. ISSN 0393-974X. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26403396> >.

Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. **World J Clin Oncol**, v. 5, n. 3, p. 382-92, Aug 2014. ISSN 2218-4333. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25114853> >.

Zhou Y, Zhao H, Peng C. Association of sedentary behavior with the risk of breast cancer in women: update meta-analysis of observational studies. **Ann Epidemiol**, v. 25, n. 9, p. 687-97, Sep 2015. ISSN 1873-2585. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26099193> >.

Zhukova LG. Breast cancer with triple-negative phenotype in the Russian patient population. Clinical and morphologic features. **Vopr Onkol**, v. 61, n. 2, p. 189-94, 2015. ISSN 0507-3758. Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26087596> >.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Investigarr marcadores tumorais no derrame pleural neoplásico de pacientes com histórico de câncer de mama, relacionando-os ao prognóstico e sobrevida.

2.2 Objetivos específicos

- a) Verificar a expressão dos marcadores tumorais do painel do câncer de mama no derrame pleural neoplásico;
- b) Estudar o arranjo das células do derrame pleural neoplásico, associando à sobrevida e à expressão de marcadores tumorais.
- c) Descrever as características morfológicas das células neoplásicas do derrame pleural, através da microscopia eletrônica de transmissão.

3. ARTIGOS CIENTÍFICOS

3.1: Artigo Científico I: Impact of Her-2 overexpressed on survival of patients with metastatic breast cancer

Submetido à revista Biomarkers

Título: Impact of Her-2 overexpressed on survival of patients with metastatic breast cancer

Authors: Giovana Tavares dos Santos^{a*}; Natália Dressler. D. Camillo^{b*}; Cássia Ferreira Braz Cáurio^c; Tales Vicente Scheide^c; Rosalva Thereza Meurer^a; João Carlos Prolla^d; Ivana Beatrice Mânica da Cruz^e; Rosicler Luzia Brackmann^f; Adriana Vial Roehe^g; Claudia Giuliano Bica^h.

*These authors contributed equally this study.

Title: Impact of Her-2 overexpressed on survival of patients with metastatic breast cancer

Authors:

Giovana Tavares dos Santos^a; Natália Dressler Camillo^{b*}; Cássia Ferreira Braz Cáurio^c; Tales Vicente Scheide^d; Rosalva Thereza Meurer^e; João Carlos Prolla^f; Ivana Beatrice Mânica da Cruz^g; Rosicler Luzia Brackmann^h; Adriana Vial Roeheⁱ; Claudia Giuliano Bica^j.

a. Msc. Research Laboratory of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: santos.giovanat@gmail.com

b Bachelor of Medicine. Resident in Neurology, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: natalia.camillo@hotmail.com

c. Biomedical student, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: cassiacaurio@hotmail.com

d. Medical student, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: talesvicente826@hotmail.com

e. Msc. Research Laboratory of Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: rosalvameurer@hotmail.com

f. M.D. Laboratory of Pathology, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: jcprolla@yahoo.com

g. PhD. Biogenômica laboratory, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul. Email address: ibmcruz@hotmail.com

h. Msc. Laboratory of Pathology, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: rosiclerm@yahoo.com

i. PhD. Department of Pathology and Forensic Medicine, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: aroehe@gmail.com

j. PhD. Department of Basic Health Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Email address: claudia@ufcspa.edu.br

*These authors contributed equally to this study.

Corresponding author: Claudia Giuliano Bica,

Address: Department of Basic Health Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. Sarmento Leite Street, 245, 304.

E-mail: claudia@ufcspa.edu.br

Phone: 55 (51)3303-8760

Fax: 55 (51) 3303-8810

Abstract

Introduction: Tumours with similar clinical and pathological presentations may have different behaviours, so it is important to understand their specific biological characteristics. **Objective:** To investigate tumour markers of their primary tumours in pleural metastasis to identify organ-specific characteristics of metastatic breast cancer. **Methods:** historical cohort study. Immunohistochemistry was performed on the cell block of neoplastic pleural effusion. **Results:** The median survival time in Her-2 overexpression in malignant pleural effusion was 2.2 months, however, patients without overexpression survived, on average, for seven months ($p = 0.02$). **Conclusions:** We demonstrated that the Her-2 overexpression in metastatic pleural cancer reflects a worse prognosis.

Keywords: Tumour Metastasis; Neoplastic pleural effusion; Metastatic breast cancer; Her-2; prognosis.

INTRODUCTION

Breast cancer is complex and heterogeneous (Rivenbark et al., 2013) and considered a public health problem (Viale, 2012, Siegel et al., 2013) affecting more females than males (Senkus et al., 2014). In Brazil, 57,120 new cases of breast cancer are estimated to emerge in 2015 (Jungk, 2015). Regarding metastatic breast cancer, estimates diverge, and despite advances in diagnosis and therapy, approximately 20–30% of patients with breast cancer, even early stage, will develop distant metastatic disease (Kennecke et al., 2010, Cadoo et al., 2013).

Pleural effusions often occur in patients with breast cancer (Fentiman et al., 1981, Pokieser et al., 2004), and this clinical condition is associated with poor prognosis (van Galen et al., 2010, Yhim et al., 2010, Santos et al., 2012).

Tumours with similar clinical and pathological presentations may have different biological behaviours, therefore to assist in the characterisation of tumours, researchers have focused on the definition of specific biological characteristics (Goldhirsch et al., 2009, Yersal and Barutca, 2014).

Thus, this study aims to evaluate the expression of tumour markers on invasive breast cancer and malignant pleural effusion (MPE), correlating them with prognosis and survival, helping to understand the specific characteristics of the metastatic site.

MATERIAL AND METHODS

Patient selection

This is a historical cohort study consisting of patients previously diagnosed with breast cancer and an episode of MPE between 2008 and 2014. All cytological samples of pleural effusion were analysed by a senior cytopathologist (JCP). MPE samples diagnosed at the teaching hospital reference in the State of Rio Grande do Sul, whose patients only had breast tumours were included. Regarding losses, cases with no information about the results of histology and immunohistochemistry of breast tumours and the ones with no or poor cellularity sediment formation in the cell block were no included.

Data collection

The primary breast tumour information was retrieved from medical records. The variables investigated were the date of diagnosis, pathological classification (staging and histology), immunohistochemical panel of breast cancer (hormone receptors oestrogen and progesterone, Ki-67 and Her-2), time until pulmonary progression, outcome, and biochemical information of the pleural effusion such as lactate dehydrogenase (LDH), glucose and total protein. Data were analysed using SPSS® version 18.0, and significance was set at $p < 0.05$ with a 95% confidence interval (CI). The survival analysis was performed using log-rank and Kaplan-Meier curves.

Sample processing: Cell block

Pleural effusion (10 ml) was centrifuged (10 min at 1300 rpm), the supernatant was discarded, and then the pellet was fixed for 24 h in a formaldehyde solution (ethanol 99% [85 ml], formaldehyde [10 ml], acetic acid [5 ml]). After removal from the test tube, it was processed histologically and embedded in paraffin, thus creating a pleural liquid paraffin block (Shabaik et al., 2011).

From the cell block, fine cuts on the microtome (4 μ) were performed, which were histologically stained with HE (hematoxylin-eosin) to identify neoplastic cells.

To confirm primary breast cancer, IHC (immunohistochemistry) for CK5 /6 markers, calretinin, Gata-3 (Shield et al., 2014), TTF1 and CK7 were held, in addition to immunohistochemistry.

Cell block immunohistochemical of MPE

We used oestrogen receptor (ER) (Mouse Monoclonal Antibody Anti-Human, Clone 6F11, Newcastle UK, 1: 100 Control: neoplastic breast), progesterone receptor (PR) (Mouse Monoclonal Antibody Anti-Human, Clone 16, Newcastle UK, 1: 100 control: neoplastic breast), Ki-67 (Mouse Monoclonal Antibody anti-human, 1: 100 control: palatine tonsil) and Her-2 (Polyclonal Rabbit Antibody anti-human polyclonal, Dako/USA, 1: 2000 control: neoplastic breast) to classify breast tumours. These same tumour markers were performed in the pleural effusion.

Tissue sections were heated (60°C, 30 min), deparaffinised (two washes in xylenes), and rehydrated by successive washes in absolute ethanol

and deionised water according to laboratory protocol. For immunohistochemical staining, antigen retrieval was performed at 98°C for 40 min in pH 9.0 TRIS-EDTA. After heating and cooling for 20 min, endogenous peroxidase activity was blocked by immersing the slide in hydrogen peroxide 5% in H₂O (3 × 10 min). The slides were washed twice with phosphate-buffered saline (PBS) and incubated in a solution to block non-specific binding (bovine serum albumin to 1% for 1 h).

A negative control (bovine serum albumin 1%) was substituted for the primary antibody. All primary antibodies and controls were incubated for 1 h at room temperature and then submitted to temperatures of 4°C overnight. Next, the blades were kept at room temperature for 1 h, in sequence, and were washed thrice with PBS.

The sections were incubated with the DAKO Advance™ link HRP for 40 min, then washed again with PBS and incubated with DAKO Advance™ enzyme HRP for 40 min.

Staining was completed by incubating the specimens with 3,3'-diaminobenzidine+ substrate-chromogen for 5 min. Finally, tissue sections were washed twice with water, and cell nuclei were stained for 20 seconds with hematoxylin-harris.

Sections were washed in deionised water and sequentially immersed for 1 min in 75% ethanol, 90% ethanol, absolute ethanol, and thrice in xylene. Then, slides were mounted in a non-aqueous medium (entelan). Immunohistochemistry slides were photographed under brightfield microscopy using a digital camera (Olympus ® DP2-BSW) and software DP2-BSW.

Technical analysis

The results of the immunohistochemistry of the MPE were submitted to digital image capture in three hotspots (point of maximum concentration of labelled cells) (Swiderska et al., 2015).

The cases were evaluated by two researchers to determine the presence (+) or absence (-) (Tab. 1) of immunostaining. In Her-2 ratings, the indeterminate cases (++) were included in the non-expression group; therefore, the evaluation was qualitative (positive or negative). Additionally, 30% of cases were checked by two experienced pathologists in the area. Cases were considered absent if no reaction was observed in the IHC.

RESULTS

We identified 52 patients with the clinical condition, but nine did not have the necessary information in their medical records or there was no cellularity in the cell block. Therefore, 43 patients with MPE that occurred from 2008–2014 were included in the analysis.

Patients were aged between 27 and 81 years. The average age in each event (diagnosis of breast cancer, pleural effusion and death) is presented in table 2 (Table 2).

Ductal histology represented 88.4%, totalling 38 cases. There was a predominance of grade 3 in 21 (48.8%) cases. Regarding staging, T2 prevailed, represented by 13 patients (30.2%), and regarding lymph node characteristics,

only six (14%) were N0. The clinical and pathological characteristics are shown in Table 2.

Pleural effusion and the tumour markers investigated were ER, PR, Ki-67 and Her-2 on the primary tumour (Table 2).

In relation to hormone receptors, eight (80%) patients did not express ER in the primary tumour and continued the inexpression in metastasis, and only two (20%) who did not express ER began to express it in MPE. Although 19 (57.6%) remained without expression, 14 (42.4%) who expressed ER in breast cancer did not express it in metastasis ($p = 0.069$).

Regarding Her-2 rating, the indeterminate cases (++) were included in the non-expression group. We observed that a substantial change occurred in nine cases: 8 patients that expressed Her-2 in breast cancer did not express it in metastasis, and one patient who did not express it in the primary tumour expressed it in pleural effusion ($p = 0.003$) (Table 3).

Among the 43 patients, 36 (84%) died. Regarding the patients with overexpression of Her-2 in MPE, the average survival time was 2.2 months (95% CI = 1.103–3.230), in contrast to patients without overexpression, whose median survival time was seven months (95% CI = 5.676–9.676) ($p = 0.02$) (Figure 1).

The classification of subtypes of breast cancer and pleural effusions, are shown in table 2 (table 2).

In the study, 24 (55.8%) patients changed their classification from the primary site compared to the metastatic site. Faced with this change, we found that 22 (61.1%) patients who were luminal A and luminal B changed their

classification in metastasis ($p = 0.1$). We demonstrate the individual characteristics of this cohort in the supplementary material.

The biochemical parameters of pleural effusion did not show statistically significant differences against the outcome (death) when analysed with Levene's Test, which assesses the equivalence between the variances. There was a loss of data for glucose (15 results), LDH (12 results) and total protein (16 results).

The mean glucose pleural effusion of patients who progressed to death (23 patients) was 163 mg/dL and in patients who did not die (five patients) was 115.52 mg/dl ($p = 0.47$). For the LDH parameter, in patients who progressed to death (26 patients), the average was 438 U/L and in patients who did not progress to death (five patients), it was 324.60 U/L ($p = 0.55$). For total protein, in patients who progressed to death (23 patients), the average was 4.1 g/dL and in patients who did not progress to death (four patients), it was 4.20 g/dL ($p = 0.88$).

DISCUSSION

The metastatic condition, in particular, pleural metastasis, gives a poor prognosis for patients, as it reflects short life expectancy depending on the type and primary tumour stage (Antunes et al., 2003, Shaw and Agarwal, 2004, Ozyurtkan et al., 2010, Santos et al., 2012).

It is here emphasised that the cohort of patients had a mean interval of four years between the diagnosis of breast cancer and the occurrence of an episode of MPE, and as previously discussed (van Galen et al., 2010), minor

interval primary breast cancer and the occurrence of MPE suggests a poor prognosis, reflecting a more aggressive disease or treatment failure.

The biochemical parameters in pleural effusion (glucose, LDH and protein) in our study showed no difference in the prognosis of patients. This is in agreement with other studies (van Galen et al., 2010); however, it is contrary to one study (Ozyurtkan et al., 2010), which found differences in biochemical patterns (lower glucose values, LDH and total protein showed poorer prognosis of patients regarding three-month survival). The results showed that the association between pH, glucose and survival time occurred due to an accumulation of the final products of glycolysis in the pleural space caused by extensive tumour deposits.

We showed a change in Her-2 expression in nine cases, unlike what was previously observed (Koo et al., 2010), in which 100% agreement with the expression of this marker in breast cancer and its metastases was expressed. The study by Vincent-Salomon et al., (2002) also showed a change/no Her-2 expression after performing preoperative chemotherapy, in which nine of 11 tumours maintained the Her-2 overexpression in metastases and, in the other two patients, in which the primary tumour had low levels of Her-2 expression, staining was not observed in the secondary tumour (one lung and one liver tumour). In the same study, the authors did not identify tumours with Her-2 overexpressing only in metastasis, diverging from this study, which showed overexpression exclusively in pleural effusion (Vincent-Salomon et al., 2002). Four cases had a mean survival of 2.2 months, representing patients with a worse prognosis ($p = 0.02$), corroborating previous (Rasbridge et al., 1994) data, in which, after treatment with chemotherapy, there was a modification of

the Her-2 status (17% overexpressed and 8% did not express). Treatment cannot be evaluated in our study, due to its retrospective nature.

Although studies (Masood and Bui, 2000, Niehans et al., 1993, Barnes et al., 1988) have suggested that Her-2 expression remains at the metastatic site, surveys have shown that there is a change in this expression. We agree with previous authors (Vincent-Salomon et al., 2002) who have supposed a transient change in cell metabolism related to treatment, or even cells that acquire the ability to invade the lymph system and may be biologically different, including by acquiring vascular invasion capacity and growing far from the site of origin.

This hypothesis confirmed the importance of performing biopsies on the metastatic site to target specific therapies according to the new tumour entity. According to the study Kaufman et al. (2009) proposed a targeted therapy for patients with advanced breast cancer considering the Her-2 expression in the metastatic site, and showed that patients with specific targeted therapy survived longer (Kaufman et al., 2009).

The review of Mustacchi et al. (2015) showed that target specific therapy for Her-2 overexpression improved survival time in both the early phase and metastatic breast cancer. However, some patients who responded well to treatment, relapsed, which could be explained by different molecular mechanisms that contribute to drug resistance (Nahta et al., 2006, Mustacchi et al., 2015), which may be related to intratumoural heterogeneity, referring to cell morphology, proliferation rate, metastatic ability, drug sensitivity, dependence signs of growth, tumour initiation, which are recognised as an important

characteristic of most malignant tumours (Condeelis and Pollard, 2006, Kalluri and Zeisberg, 2006, Calbo et al., 2011).

We emphasise that metastases can behave independently of the primary tumour, therefore, despite knowing that the treatment of breast cancer metastatic focuses on prolonging the progression-free survival and improving the quality of life, this work show that new targeted therapeutic agents increase survival in metastatic breast cancer. Where we demonstrated that the Her-2 overexpression in metastatic pleural cancer reflects a worse prognosis.

ACKNOWLEDGEMENTS

We appreciate the contribution of the laboratory technicians Terezinha Stein, André Paulo Sampaio and Rafael Cavaleiro Fernandes in assisting in the laboratory stage.

Ethical aspects

This work was in accordance with the Declaration of Helsinki, respecting the ethical and legal aspects, and was approved by the Committees for Research Ethics in the reference Institutions (ISCMPA and UFCSPA) under the opinions 193.243/2013 and 252.516/2013, as recommended by the National Resolution CNS 466/2012.

AUTHORS' CONTRIBUTIONS

1. Have made substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data: GTS, NDC, CFBC, JCP, IBMC, RLB, AVR, CGB. 2. Have been involved in drafting the manuscript

or revising it critically for important intellectual content: GTS, NDC, JCP, IBMC, AVR, CGB. 3. Have given final approval of the version to be published: GTS, NDC, CFBC, JCP, IBMC, RLB, AVR, CGB. 4. Agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved: GTS, NDC, JCP, IBMC, AVR, CGB.

REFERENCES

- ANTUNES, G., NEVILLE, E., DUFFY, J. & ALI, N. 2003. BTS guidelines for the management of malignant pleural effusions. *Thorax*, 58 Suppl 2, ii29-38.
- BARNES, D. M., LAMMIE, G. A., MILLIS, R. R., GULLICK, W. L., ALLEN, D. S. & ALTMAN, D. G. 1988. An immunohistochemical evaluation of c-erbB-2 expression in human breast carcinoma. *Br J Cancer*, 58, 448-52.
- CADDOO, K. A., FORNIER, M. N. & MORRIS, P. G. 2013. Biological subtypes of breast cancer: current concepts and implications for recurrence patterns. *Q J Nucl Med Mol Imaging*, 57, 312-21.
- CALBO, J., VAN MONTFORT, E., PROOST, N., VAN DRUNEN, E., BEVERLOO, H. B., MEUWISSEN, R. & BERNIS, A. 2011. A functional role for tumor cell heterogeneity in a mouse model of small cell lung cancer. *Cancer Cell*, 19, 244-56.
- CONDEELIS, J. & POLLARD, J. W. 2006. Macrophages: obligate partners for tumor cell migration, invasion, and metastasis. *Cell*, 124, 263-6.
- FENTIMAN, I. S., MILLIS, R., SEXTON, S. & HAYWARD, J. L. 1981. Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. *Cancer*, 47, 2087-92.
- GOLDHIRSCH, A., INGLE, J. N., GELBER, R. D., COATES, A. S., THURLIMANN, B. & SENN, H. J. 2009. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol*, 20, 1319-29.
- JUNGK, C. 2015. [Analgesia, sedation and delir-Treatment of patients in the neuro intensive care unit]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*, 50, 704-711.
- KALLURI, R. & ZEISBERG, M. 2006. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*, 6, 392-401.

- KAUFMAN, B., MACKEY, J. R., CLEMENS, M. R., BAPSY, P. P., VAID, A., WARDLEY, A., TJULANDIN, S., JAHN, M., LEHLE, M., FEYEREISLOVA, A., REVIL, C. & JONES, A. 2009. Trastuzumab plus anastrozole versus anastrozole alone for the treatment of postmenopausal women with human epidermal growth factor receptor 2-positive, hormone receptor-positive metastatic breast cancer: results from the randomized phase III TAnDEM study. *J Clin Oncol*, 27, 5529-37.
- KENNECKE, H., YERUSHALMI, R., WOODS, R., CHEANG, M. C., VODUC, D., SPEERS, C. H., NIELSEN, T. O. & GELMON, K. 2010. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*, 28, 3271-7.
- KOO, J. S., JUNG, W. & JEONG, J. 2010. Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. *Tumori*, 96, 424-32.
- MASOOD, S. & BUI, M. M. 2000. Assessment of Her-2/neu overexpression in primary breast cancers and their metastatic lesions: an immunohistochemical study. *Ann Clin Lab Sci*, 30, 259-65.
- MUSTACCHI, G., BIGANZOLI, L., PRONZATO, P., MONTEMURRO, F., DAMBROSIO, M., MINELLI, M., MOLTENI, L. & SCALTRITI, L. 2015. HER2-positive metastatic breast cancer: a changing scenario. *Crit Rev Oncol Hematol*, 95, 78-87.
- NAHTA, R., YU, D., HUNG, M. C., HORTOBAGYI, G. N. & ESTEVA, F. J. 2006. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*, 3, 269-80.
- NIEHANS, G. A., SINGLETON, T. P., DYKOSKI, D. & KIANG, D. T. 1993. Stability of HER-2/neu expression over time and at multiple metastatic sites. *J Natl Cancer Inst*, 85, 1230-5.
- OZYURTKAN, M. O., BALCI, A. E. & CAKMAK, M. 2010. Predictors of mortality within three months in the patients with malignant pleural effusion. *Eur J Intern Med*, 21, 30-4.
- POKIESER, W., CASSIK, P., FISCHER, G., VESELY, M., ULRICH, W. & PETERS-ENGL, C. 2004. Malignant pleural and pericardial effusion in invasive breast cancer: impact of the site of the primary tumor. *Breast Cancer Res Treat*, 83, 139-42.
- RASBRIDGE, S. A., GILLETT, C. E., SEYMOUR, A. M., PATEL, K., RICHARDS, M. A., RUBENS, R. D. & MILLIS, R. R. 1994. The effects of chemotherapy on morphology, cellular proliferation, apoptosis and oncoprotein expression in primary breast carcinoma. *Br J Cancer*, 70, 335-41.
- RIVENBARK, A. G., O'CONNOR, S. M. & COLEMAN, W. B. 2013. Molecular and cellular heterogeneity in breast cancer: challenges for personalized medicine. *Am J Pathol*, 183, 1113-24.

SANTOS, G. T., PROLLA, J. C., CAMILLO, N. D., ZAVALHIA, L. S., RANZI, A. D. & BICA, C. G. 2012. Clinical and pathological factors influencing the survival of breast cancer patients with malignant pleural effusion. *J Bras Pneumol*, 38, 487-93.

SENKUS, E., CARDOSO, F. & PAGANI, O. 2014. Time for more optimism in metastatic breast cancer? *Cancer Treat Rev*, 40, 220-8.

SHABAIK, A., LIN, G., PETERSON, M., HASTEY, F., TIPPS, A., DATNOW, B. & WEIDNER, N. 2011. Reliability of Her2/neu, estrogen receptor, and progesterone receptor testing by immunohistochemistry on cell block of FNA and serous effusions from patients with primary and metastatic breast carcinoma. *Diagn Cytopathol*, 39, 328-32.

SHAW, P. & AGARWAL, R. 2004. Pleurodesis for malignant pleural effusions. *Cochrane Database Syst Rev*, Cd002916.

SHIELD, P. W., PAPADIMOS, D. J. & WALSH, M. D. 2014. GATA3: a promising marker for metastatic breast carcinoma in serous effusion specimens. *Cancer Cytopathol*, 122, 307-12.

SIEGEL, R., NAISHADHAM, D. & JEMAL, A. 2013. Cancer statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*, 63, 11-30.

SWIDERSKA, Z., KORZYNSKA, A., MARKIEWICZ, T., LORENT, M., ZAK, J., WESOŁOWSKA, A., ROSZKOWIAK, L., SŁODKOWSKA, J. & GRALA, B. 2015. Comparison of the manual, semiautomatic, and automatic selection and leveling of hot spots in whole slide images for Ki-67 quantification in meningiomas. *Anal Cell Pathol (Amst)*, 2015, 498746.

VAN GALEN, K. P., VISSER, H. P., VAN DER PLOEG, T. & SMORENBURG, C. H. 2010. Prognostic factors in patients with breast cancer and malignant pleural effusion. *Breast J*, 16, 675-7.

VIALE, G. 2012. The current state of breast cancer classification. *Ann Oncol*. England.

VINCENT-SALOMON, A., JOUVE, M., GENIN, P., FRENEAUX, P., SIGAL-ZAFRANI, B., CALY, M., BEUZÉBOC, P., POUILLART, P. & SASTRE-GARAU, X. 2002. HER2 status in patients with breast carcinoma is not modified selectively by preoperative chemotherapy and is stable during the metastatic process. *Cancer*, 94, 2169-73.

YERSAL, O. & BARUTCA, S. 2014. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*, 5, 412-24.

YHIM, H. Y., HAN, S. W., OH, D. Y., HAN, W., IM, S. A., KIM, T. Y., KIM, Y. T., NOH, D. Y., CHIE, E. K., HA, S. W., PARK, I. A. & BANG, Y. J. 2010. Prognostic factors for recurrent breast cancer patients with an isolated, limited

number of lung metastases and implications for pulmonary metastasectomy.
Cancer, 116, 2890-901.

Table 1: Immunostaining of the cell.

Variables	ER	PR	Ki-67	Her-2
In the cell	Nuclear	Nuclear	Nuclear	Membrane cellular
Positivity	A least 10%	At least 10%	Up to 14%: low; above 15%: high proliferation	Degree varies according to the amount and intensity (0 to 3)

Table 2: Clinical-pathological characteristics of the study.

	N	Minimum	Maximum	Mean	Std. Deviation
Age at diagnosis of breast cancer	43	27	81	53.17	12
Age at diagnosis of pleural effusion	43	28.3	88.8	57.5	12
Age at death	36	28.5	78.7	57.7	11.2
Parameters	N	(%)			
Histological type					
Ductal	38	88.4			
Lobular	3	7			
Other	2	4.7			
subtypes					
Total	43	100			
Degree	N	(%)			
1	1	2.3			
2	9	20.9			
3	21	48.8			
Missing	12	27.9			
Total	43	100			
Staging T	N	(%)			
1	6	14			
2	13	30.2			
3	6	14			
4	3	7			
Missing	15	34.9			
Total	43	100			
Staging N	N	(%)			
0	6	14			
1	7	16.3			
2	6	14			

3	5	11.6
Missing	19	44.2
Total	43	100

Tumour markers in breast cancer	ER (%)	PR (%)	Ki-67 (%)	Her-2 (%)
0	10 (23.3)	12 (27.9)	8 (19)	29 (67.4)
1	33 (76.7)	31 (72.1)	7 (16.7)	14 (32.6)
2			27 (64.3)	
Total	43 (100)	43 (100)	42 (100)	43 (100)

For ER, PR and Her-2, no expression of tumour markers: 0; expression: 1. For Ki-67, 0: non-expression; 1: 14% of the cells; 2: above 15% of the cells.

Classification of subtypes of breast cancer	N	(%)
1	13	30.2
2	23	53.5
3	1	2.3
4	6	14
Total	43	100

Applying the classification of subtypes of breast cancer in the pleural effusion	N	(%)
1	17	40
2	7	16
3	4	9
4	15	35
Total	43	100

Luminal A (1); Luminal B (2); Her-2 overexpression (3);

Triple-negative (4)

Table 3: Expression of Her-2 on primary lesions and pleural metastases.

HER-2	Effusion Pleural		
	Non-expression	Expression	
	N (%)	N (%)	
Breast cancer	Unexpressed	1 (3.4)	p = 0.003
	Expressed	6 (42.9)	

28 (96.6)	1 (3.4)
8 (57.1)	6 (42.9)

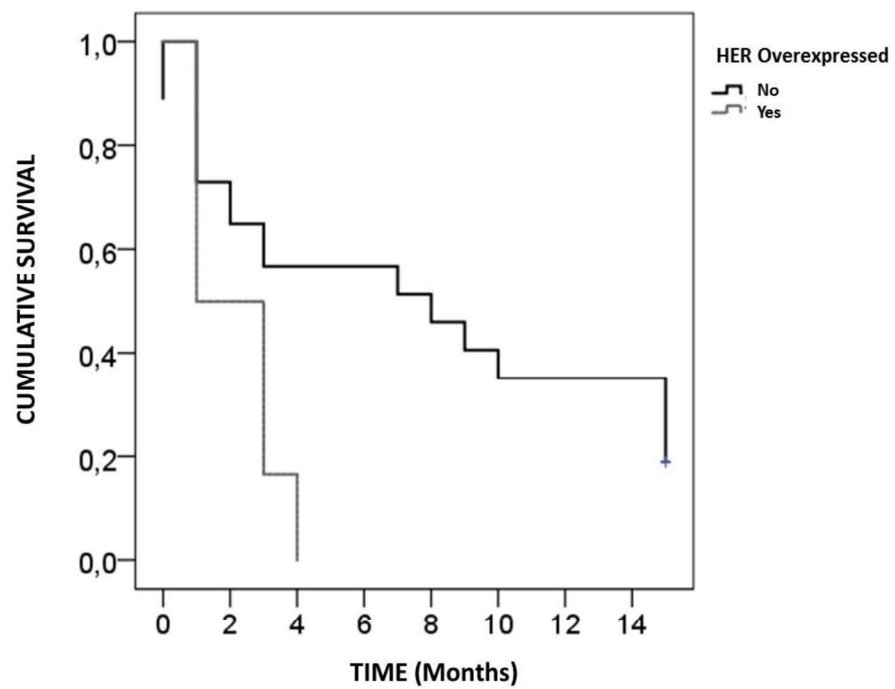


Figure 1: Survival curve of the overexpressed Her-2.

3.2 Artigo Científico II: Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer

Publicado na Revista Acta Cytologica

“Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer”

Running Title: Cell Arrangement of Pleural Effusion and Survival

Authors: Natália Dressler Camillo*, Giovana Tavares dos Santos*, João Carlos Prolla, Eliza Ribas da Silveira Flôres, Gisele Orlandi Introíni, Rosicler Luzia Brackmann, Ivana Beatrice Mânica Cruz, Claudia Giuliano Bica

*These authors contributed equally this study.

Acta Cytologica
58(5) 427–514 (2014)

58 | 5 | 14

print
ISSN 0001–5547

online
e-ISSN 1938–2650

www.karger.com/acy

ACTA CYTOLOGICA

The Journal of Clinical Cytology and Cytopathology



S. Karger
Medical and Scientific Publishers
Basel · Freiburg · Paris ·
London · New York · Chennai ·
New Delhi · Bangkok · Beijing ·
Shanghai · Tokyo · Kuala Lumpur ·
Singapore · Sydney

KARGER



Official Periodical
of the International
Academy of Cytology

Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer

Natália Dressler Camillo^a Giovana Tavares dos Santos^a João Carlos Prolla^b
Eliza Ribas da Silveira Flôres^a Gisele Orlandi Introini^a Rosicler Luzia Brackmann^b
Ivana Beatrice Mânica da Cruz^c Claudia Giuliano Bica^a

^aPostgraduate Program in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, and ^bLaboratory of Pathology, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, and ^cLaboratory of Biogenomics, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brazil

Key Words

Breast cancer · Pleural effusion · Survival · Morphology · Cell arrangement · Isolated cells · Spheroid pattern

Abstract

Objective: This study was performed to evaluate the potential influence of cytological differences between pleural effusions on the survival of women with metastatic breast cancer during 30 months of follow-up. **Study Design:** A hospital-based cohort study was performed. Pleural fluid cytology slides from patients with breast cancer were examined. Cases were grouped according to the pattern of tumor cells (spheroid and isolated), in order to access their prognostic value. **Results:** The study comprised 87 patients. An isolated cell pattern was associated with higher mortality 30 months after the pleural effusion when compared to a spheroid pattern ($p = 0.038$). Patients with an isolated cell pattern showed higher risk of dying than patients with spheroid formations. The relative risk after adjustment of intervening variables was 5.336 (95% CI 1.054–27.020). The presence of a triple-

negative immunohistochemical pattern significantly increased the risk of mortality before 30 months. **Conclusion:** Pleural effusion with isolated malignant cells is associated with worse prognosis after 30 months of follow-up.

© 2014 S. Karger AG, Basel

Introduction

Malignant pleural effusion (MPE) is a common and debilitating complication of advanced malignant diseases, with significant incidence in patients with lung and breast cancer [1–7], and is often associated with poor prognosis [8–16]. Identification of malignant cells in pleural fluid suggests primary disease spread and progression, which leads to a reduced life expectancy of cancer patients [17–19]. However, since there are differences on survival time between some groups of patients [20–

N.D.C. and G.T.d.S. contributed equally to this study.

KARGER

E-Mail karger@karger.com
www.karger.com/acy

© 2014 S. Karger AG, Basel
0001-5547/14/0585-0446\$39.50/0

Correspondence to: Dr. Claudia Giuliano Bica
Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Sarmiento Leite Street, 245/304
Porto Alegre, RS 90050-170 (Brazil)
E-Mail claudia@ufcspa.edu.br



Fig. 1. Isolated neoplastic cells in pleural fluid of a patient with history of breast cancer. Giemsa stain. Original magnification $\times 500$.

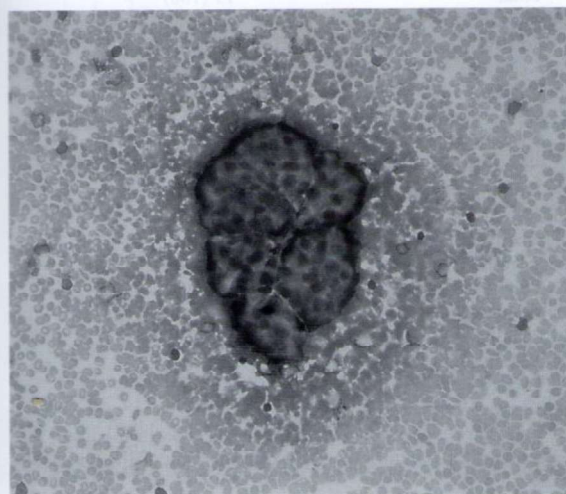


Fig. 2. Spheroid formation in pleural effusion of a patient with history of breast cancer. Giemsa stain. Original magnification $\times 200$.

22], identifying the characteristics of each organ-specific metastatic breast cancer may play a major role in understanding this malignancy [1, 23, 24].

Previous studies have reported that differences in survival time of breast cancer patients are associated with different morphological patterns, as observed through cytological pleural effusion analysis [21, 22]. The aim of

this study is to correlate the survival rate of breast cancer patients with cytological analysis of pleural effusion, seeking results that may help better understand the value of tumor cell patterns and biomarkers in the natural history of breast cancer cases.

Methods

Case Selection

A hospital-based historical cohort study was performed at Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, a reference hospital in cancer treatment located in Porto Alegre, Brazil. From a total of 90 patients, there was a loss of 3 cases which were not included in any statistical analysis because of incomplete clinical information. Therefore, this study is comprised of 87 female patients who had a history of breast cancer and showed positive cytology for malignant cells in pleural effusion from 2006 to 2011. They were also monitored during another year for outcome assessment.

Clinical Data Evaluation

The following clinical and laboratorial variables were considered: age at diagnosis of breast cancer, cytological diagnosis of MPE, outcome, histological type of the primary tumor and the immunohistochemical expression of tumor markers, as represented by the panel formed by the estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), Ki-67, p53 and c-erb-B2. The survival time range was defined from the date of the cytological diagnosis of MPE until the end of follow-up in December 2012.

The sources used for setting search variables were medical records and reports on pathology, cytopathology and immunohistochemistry obtained from the reference laboratory. Since this is a hospital-based study, all reports from laboratory tests provided by the institution were issued by two qualified and experienced professionals on cytopathology and surgical pathology.

Cytology

After collecting the clinical data, the slides of patients with cytological diagnosis of MPE were retrieved from reference laboratories and forwarded for further analysis using light microscopy with Giemsa and Papanicolaou stain. Slides representing the first MPE were obtained from the reference institution and examined. The first screenings and analysis of selected slides were conducted by a single researcher and further reviewed by two senior pathologists. The results observed by the researcher and the specialists matched. Each case consisted of four slides prepared using two different techniques (cytocentrifugation and cell distention) and two staining procedures (Giemsa and Papanicolaou), in accordance with the reference protocol. All slides were fixed by the same preparation techniques in the laboratory of the study. Characterization of malignant cells was performed according to accentuated anaplasia, nuclear and nucleolar atypia, and abnormal mitoses.

The slides were separated into two distinct classifications according to the predominance of isolated neoplastic cells (fig. 1) or predominance of a spheroid pattern (fig. 2). Each classification was deemed predominant when they represented more than 50% of the slide. Other intermediate types of arrangement, such as clusters, were also found, though they did not show prevalence in any case.

Statistical Analysis

Data were tabulated in Microsoft Excel 2007 and analyzed using the Statistical Package for the Social Sciences, version 18.0 (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA). Survival curves were calculated using Cox regression analysis.

Patients were evaluated using percentage analysis and categorized into two survival time groups: <30 and >30 months. This categorization allowed the estimation of relative risk (RR) by calculating its χ^2 value. Next, we analyzed how potential intervening variables could impact the association between cellular pattern of pleural effusion and mortality in 30 months, using multivariate logistic regression (backward Wald method). Accordingly, the primary tumor was verified for the following intervening variables: triple negative, ER, PR, histological type and c-erb-B2.

Ethical Considerations

This work is in accordance with resolution 466/12 of the Brazilian National Health Council, preserves ethical and legal anonymity and confidentiality of information. It was approved by the Ethics Committee of the Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre and Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

Results

Clinical, Histological and Immunohistochemical Variables

Table 1 shows the clinical, histological and immunohistochemical variables considered in this study. From a total of 87 patients with breast cancer and a positive diagnosis for MPE that were included in the evaluation, 62 died. Regarding the histological type, 77 of 85 patients had invasive ductal carcinoma, accounting for 91% of the sample. Concerning the immunohistochemical markers, 12 patients (17%) showed a triple-negative pattern, since there was absence of expression of ER, PR and c-erb-B2 (table 1).

Lack of information in the medical records resulted in sample loss for immunohistochemical markers of the primary tumor. The available data allowed for evaluation of 71 patients for ER and PR, 66 for Ki-67, 67 for p53, 68 for c-erb-B2 and 85 for histology (table 1).

The average age of patients by the time of breast cancer, pleural effusion and outcome diagnosis did not have a significant difference in the results. Table 2 shows the average age during each stage.

Correlation of Cytological and Morphological Analysis with Survival

Overall average survival was 20.0 months for patients whose morphological analysis of the pleural fluid was positive for standard cell spheroid, whereas patients with free cells showed a median survival of 17.5 months. There

Table 1. Clinical, histological and immunohistochemical variables

<i>Cytologic evaluation</i>	
Spheroid formation	48 (55)
Isolated cells	39 (45)
Total	87 (100)
<i>Outcome</i>	
Death	62 (71)
Not death	25 (29)
Total	87 (100)
<i>Histologic type of the primary tumor</i>	
Ductal	77 (91)
Lobular	8 (9)
Total	85 (100)
<i>Tumor marker expression of the primary tumor</i>	
ER	
Positive	48 (68)
Negative	23 (32)
Total	71 (100)
PR	
Positive	41 (58)
Negative	30 (42)
Total	71 (100)
c-erb-B2	
Positive	22 (32)
Negative	46 (68)
Total	68 (100)
Ki-67	
Positive	59 (88)
Negative	8 (12)
Total	67 (100)
p53	
Positive	30 (45)
Negative	37 (55)
Total	67 (100)
Triple-negative	
Positive	12 (17)
Negative	58 (83)
Total	70 (100)

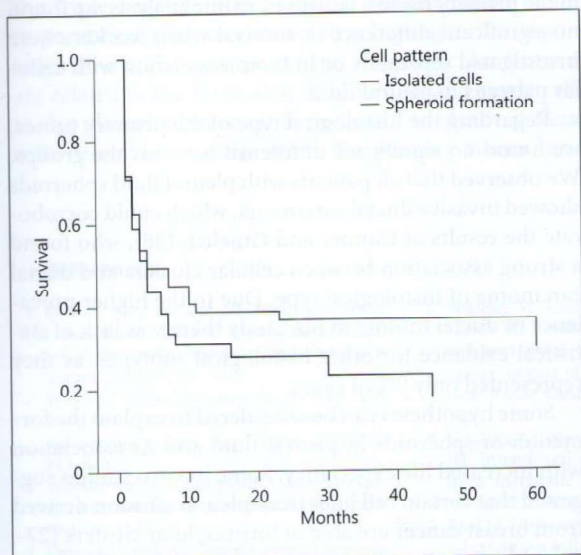
Values are expressed as absolute numbers or the medium, with percentages in parentheses. Not all patients had their variables analyzed.

was no significant difference in overall survival between these two patterns (table 2). Figure 3 shows the survival curve of the patients.

Cox regression for patient stratification according to the outcome (table 3) showed a significant difference between the survival of groups for more than 30 months after the pleural effusion ($p = 0.038$). Higher mortality was observed for patients with an isolated cell pattern, when compared to those with a spheroid pattern. The risk

Table 2. Mean and median age at each event analyzed and survival time after pleural effusion diagnosis

Variables	Isolated cells		Spheroid formation		P
	mean $\pm$ SD	median	mean $\pm$ SD	median	
Age at diagnosis of breast cancer, years	51.4 $\pm$ 12.67	49.0	52.2 $\pm$ 13.69	51.5	0.79
Age at diagnosis of pleural effusion, years	56.9 $\pm$ 12.40	55.0	55.7 $\pm$ 13.17	57.0	0.65
Age at outcome, years	59.2 $\pm$ 12.68	57.0	57.3 $\pm$ 13.79	59.0	0.57
Survival, months	17.5 $\pm$ 23.46	8.0	20.0 $\pm$ 24.60	5.8	0.63
Survival percentiles					
25	1		1		
50	4		4		
75	16		32		

**Fig. 3.** Survival curve obtained by Cox regression analysis of patients with history of breast cancer and neoplastic pleural effusion in the 2006–2011 cohort, differentiated by cell pattern in cytological evaluation.

of dying after 30 months for patients with isolated cells was 3 times higher than patients with a spheroid pattern (RR = 3.091, 95% CI = 1.009–9.471). Table 4 shows the RR of death for patients with isolated cells and a triple-negative phenotype.

When evaluating the effect of possible intervening variables, our study showed that the association between cellular pattern of pleural effusion and survival over 30 months was independent of age and the primary tumor

Table 3. Stratification of patients according to outcome

Outcome	Cell pattern		Total
	isolated cells	spheroid formation	
<30 months	34 (39)	33 (38)	67 (77)
>30 months	5 (6)	15 (17)	20 (23)
Total	39 (45)	48 (55)	87 (100)

Values in parentheses are percentages.

Table 4. Patients with triple-negative immunohistochemical phenotype and outcome

Triple-negative	Death	Not death	Total
Positive	14 (93)	1 (7)	15 (100)
Negative	37 (64)	21 (36)	58 (100)
Total	51 (70)	22 (30)	73 (100)

Values in parentheses are percentages.

variables analyzed (triple-negative, ER, PR, c-erb-B2 and histological type). After the correction of these variables, the RR of dying after 30 months for patients with isolated pattern was five times higher than the RR for patients with spheroid formation (RR = 5.336, 95% CI = 1.054–27.020, $p = 0.043$).

In contrast, the presence of a triple-negative immunohistochemical pattern stood out as the marker associated with the worst prognosis. Patients with the presence of

Table 5. RR of death in patients with isolated cells and triple-negative phenotype

	RR	95% CI		p
		min	max	
Death >30 months and isolated cells	3.091	1.009	9.471	0.038
Death >30 months and isolated cells (adjusting for intervening variables)	5.336	1.054	27.02	0.043
Death <30 months and triple-negative (adjusting for intervening variables)	7.946	0.975	64.774	0.014

this feature were 7 times more likely to die before 30 months than patients without this phenotype (RR = 7.946, 95% CI = 0.975–64.774, $p = 0.014$). Most patients who presented with this characteristic died (table 5). Among these cases, cytologic pattern did not appear to have any prognostic value.

Discussion

The presence of MPE among patients with breast cancer is generally associated with poor prognosis and survival. However, some features may also have a favorable influence on prognosis, as they can improve survival time and assist in the evaluation of these patients. Our results demonstrated that malignant cell spheroids in pleural fluid are associated with a better prognosis after 30 months of disease when compared to patients presenting isolated cells. In our study, patients with isolated cells in cytological analysis were five times more likely to die within 30 months of the occurrence of MPE compared with patients who had spheroid formations, with a significant difference between these groups ($p < 0.05$).

Some previous studies have discussed the relation between spheroid formation and increased survival [21, 22]. Dietrich et al. [21] showed a better prognosis due to the presence of spheroids in pleural fluid, which was also associated with a low mitotic rate and slight nuclear atypia. Wiley and von Roenn [22] also reported increased survival for patients with spheroids (morulae) when compared to the association with other cytological patterns. Nevertheless, in our study, survival improvement and its association with spheroids in pleural fluid could not be confirmed before a period of 30 months. Our patients with a triple-negative immunohistochemical phenotype (absence of expression of hormone receptors and HER-2) in the primary tumor had higher mortality ($p < 0.05$), in agreement with the literature [1, 15, 17, 25].

Regarding other immunohistochemical markers, Wiley and von Roenn [22] demonstrated an association between the spheroids (morulae) and the expression of ER in the primary tumor. However, in our analysis, we found no significant difference in survival when markers were investigated separately or in their association with cellular patterns in pleural fluid.

Regarding the histological type of the primary tumor, we found no significant difference between the groups. We observed that all patients with pleural fluid spheroids showed invasive ductal carcinoma, which could corroborate the results of Danner and Gmelich [26], who found a strong association between cellular clusters and ductal carcinoma of histological type. Due to the higher prevalence of ductal tumors in our study there was lack of statistical evidence for other histological subtypes, as they represented only 9% of cases.

Some hypotheses can be considered to explain the formation of spheroids in pleural fluid and its association with increased life expectancy. Some *in vitro* studies suggested that certain cell lines from pleural effusion derived from breast cancer are able to form cellular clusters [27–29], although there is no evidence that these cells are capable of forming a true solid mass in pleural fluid, thus it remains unclear whether these cell aggregates are viable [29]. Other studies conducted with cells from the primary tumor evaluated the role of adhesion proteins and apoptosis pathways in the formation and stabilization of spheroids, which would make it quiescent and lower the proliferation rate [30].

In addition to the sampling losses related to the immunohistochemical panel, there were also some limitations in obtaining information regarding the specific staging and treatment conditions of the patients involved in this study, thus it is not possible to affirm if these elements had an impact on the cellular morphology of pleural effusion. However, this study contributes to elucidating the role of the cellular arrangement in the survival of patients with neoplastic pleural effusion and encourages

further investigation aiming to better define this feature as a prognostic factor.

In summary, patients with a history of breast cancer who presented a spheroid cell pattern in cytological analysis of pleural fluid showed better prognosis after 30 months from the occurrence of pleural effusion compared to patients presenting isolated cells, regardless of age and variables related to the primary tumor. In contrast, standard triple-negative tumor proved to be the main prognostic factor before this period. Other studies have discussed the impact of a cytological pattern of pleural fluid on the survival of patients with breast cancer, but they did not consider important intervening variables which may modify the outcome of these patients, such as the triple-negative phenotype. A demonstration of the impact of variables on survival time highlights the importance of elucidating how genetic and molecular features are related to the formation of spheroids and single cells in the pleural effusion. It is necessary to clarify if these cells resemble or differ from the primary tumor, and

which factors ascertain better prognosis for patients with spheroid formation after 30 months of pleural effusion development. Furthermore, investigations based on transmission electron microscopy will be essential to understand the cytoarchitecture of spheroids and to describe the dynamic interactions between the elements of neoplastic groups of cells.

Acknowledgements

We would like to acknowledge the technical support from Paulo André Sampaio and Rafael Caetano Fernandes (cytopathological laboratory – ISCMPA) and the priceless suggestions from Dr. Marilda da Cruz Fernandes and Dr. Eliane Rabin. We are also particularly grateful for the participation of all patients enrolled in this study.

Disclosure Statement

None.

References

- 1 Koo JS, Jung W, Jeong J: Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. *Tumori* 2010;96:424–432.
- 2 Weil RJ, Palmieri DC, Bronder JL, Stark AM, Steeg PS: Breast cancer metastasis to the central nervous system. *Am J Pathol* 2005;167:913–920.
- 3 Woodhouse EC, Chuaqui RF, Liotta LA: General mechanisms of metastasis. *Cancer* 1997;80:1529–1537.
- 4 Dewis R, Gribbin J: Breast Cancer: Diagnosis and Treatment. Cardiff, National Collaborating Centre for Cancer (UK), 2009, pp 1–46.
- 5 Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group: Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005;365:1687–1717.
- 6 Jung SY, Rosenzweig M, Sereika SM, Linkov F, Brufsky A, Weissfeld JL: Factors associated with mortality after breast cancer metastasis. *Cancer Causes Control* 2012;23:103–112.
- 7 Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, Nielsen TO, Gelmon K: Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010;28:3271–3277.
- 8 Pokieser W, Cassik P, Fischer G, Vesely M, Ulrich W, Peters-Engl C: Malignant pleural and pericardial effusion in invasive breast cancer: impact of the site of the primary tumor. *Breast Cancer Res Treat* 2004;83:139–142.
- 9 Fracchia AA, Knapper WH, Carey JT, Farrow JH: Intrapleural chemotherapy for effusion from metastatic breast carcinoma. *Cancer* 1970;26:626–629.
- 10 Ried M, Hofmann HS: The treatment of pleural carcinosis with malignant pleural effusion. *Dtsch Arztebl Int* 2013;110:313–318.
- 11 Fentiman IS, Millis R, Sexton S, Hayward JL: Pleural effusion in breast cancer: a review of 105 cases. *Cancer* 1981;47:2087–2092.
- 12 Raju RN, Kardinal CG: Pleural effusion in breast carcinoma: analysis of 122 cases. *Cancer* 1981;48:2524–2527.
- 13 Banerjee AK, Willetts I, Robertson JF, Blamey RW: Pleural effusion in breast cancer: a review of the Nottingham experience. *Eur J Surg Oncol* 1994;20:33–36.
- 14 Singer TS, Sulkes A, Biran S: Pleural effusion in breast cancer: influence upon clinical course and survival. *Chemioterapia* 1986;5:66–69.
- 15 van Galen KP, Visser HP, van der Ploeg T, Smorenburg CH: Prognostic factors in patients with breast cancer and malignant pleural effusion. *Breast J* 2010;16:675–677.
- 16 El-Mahdi A, Levene A, Lott S: Observations and management of malignant pleural effusions in breast carcinoma. *Johns Hopkins Med J* 1973;132:44–49.
- 17 Santos GT, Prolla JC, Camillo ND, Zavalhia LS, Ranzi AD, Bica CG: Clinical and pathological factors influencing the survival of breast cancer patients with malignant pleural effusion. *J Bras Pneumol* 2012;38:487–493.
- 18 Konikov N, Bleisch V, Piskie V: Prognostic significance of cytologic diagnoses of effusions. *Acta Cytol* 1966;10:335–339.
- 19 Teixeira LR, Pinto JA, Marchi E: Derrame pleural neoplásico. *J Bras Pneumol* 2006;32(suppl 4):182–189.
- 20 Yamada S, Takeda T, Matsumoto K: Prognostic analysis of malignant pleural and peritoneal effusions. *Cancer* 1983;51:136–140.
- 21 Dietrich M, Goodman SN, Rojas-Corona RR, Emralino AB, Jimenez-Joseph D, Sherman ME: Multivariate analysis of prognostic features in malignant pleural effusions from breast cancer patients. *Acta Cytol* 1994;38:945–952.
- 22 Wiley EL, von Roenn J: Metastatic breast carcinoma in pleural fluid: correlation of morphology with estrogen receptor activity and morphology of the primary carcinoma. *Acta Cytol* 1990;34:169–174.

- 23 Minn AJ, Kang Y, Serganova I, Gupta GP, Giri DD, Doubrovin M, Ponomarev V, Gerald WL, Blasber R, Massagué J: Distinct organ-specific metastatic potential of individual breast cancer cells and primary tumor. *J Clin Invest* 2005;115:44–55.
- 24 Nguyen DX, Bos PD, Massagué J: Metastasis: from dissemination to organ-specific colonization. *Nat Rev Cancer* 2009;9:274–284.
- 25 Pistelli M, Pagliacci A, Battelli N, Santinelli A, Biscotti T, Ballatore Z, Berardi R, Cascinu S: Prognostic factors in early-stage triple-negative breast cancer: lessons and limits from clinical practice. *Anticancer Res* 2013;33:2737–2742.
- 26 Danner DE, Gmelich JT: A comparative study of tumor cells from metastatic carcinoma of the breast in effusions. *Acta Cytol* 1975;19:509–518.
- 27 Russo J, Soule HD, McGrath C, Rich MA: Re-expression of the original tumor pattern by a human breast carcinoma cell line (MCF-7) in sponge culture. *J Natl Cancer Inst* 1976;56:279–282.
- 28 Whitehead RH, Bertoncello I, Webber LM, Pedersen JS: A new human breast carcinoma cell line (PMC42) with stem cell characteristics. I. Morphologic characterization. *J Natl Cancer Inst* 1983;70:649–661.
- 29 Yuhas JM, Tarleton AE, Molzen KB: Multicellular tumor spheroid formation by breast cancer cells isolated from different sites. *Cancer Res* 1978;38:2486–2491.
- 30 Ivancu A, Kubbies M: Diversity of cell-mediated adhesions in breast cancer spheroids. *Int J Oncol* 2007;31:1403–1413.

3.3 Artigo Científico III: Fishbone technique: Quality of the cytological distension with impact on diagnosis

Submetido a revista BioTechniques

Title: Fishbone technique: Quality of the cytological distension with impact on diagnosis

Authors: João Carlos Prolla^{1*}, Giovana Tavares dos Santos^{2*}, Diogo Bolsson de Moraes Rocha³, Paulo André Souza Sampaio⁴, Rafael Cavalheiro Fernandes⁴, Rosicler Luzia Brackmann⁵, Luciano Amaro Junqueira Valério⁶, Claudia Giuliano Bica⁷.

*These authors contributed equally this study.

Title: Fishbone technique: Quality of the cytological distension with impact on diagnosis

Authors: João Carlos Prolla^{1*}, Giovana Tavares dos Santos^{2*}, Diogo Bolsson de Moraes Rocha³, Paulo André Souza Sampaio⁴, Rafael Cavalheiro Fernandes⁵, Rosicler Luzia Brackmann⁶, Luciano Amaro Junqueira Valério⁷, Claudia Giuliano Bica⁸.

1. M.D., PhD. Laboratory of Pathology, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. E-mail address: jcprolla@yahoo.com
2. M.Sc. Ph.D. Post-Graduated in Pathology, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. E-mail address: santos.giovanat@gmail.com
3. Graduation student of the Medicine school, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. CAPES' Jovens Talentos para a Ciência grant recipient. E-mail address: diogo.bmr@uol.com.br.
4. Technician of the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre's cytology laboratory. Email address: pandresampaio@hotmail.com
5. Technician of the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre's cytology laboratory. Email address: rafaelcfernandes@yahoo.com.br
6. M.Sc. Laboratory of Pathology, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul. E-mail address: rosiclerm@yahoo.com
7. M.Sc. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. E-mail address: lucianoavj@ufcspa.edu.br
8. MSc, PhD. Department of Basic Health Sciences, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Rio Grande do Sul. E-mail address: claudia@ufcspa.edu.br.

*These authors contributed equally this study.

Corresponding author: Claudia Giuliano Bica. Address: Street Sarmento Leite, 245, 304c. Telephone number: +55 51 3303-8760

E-mail: claudia@ufcspa.edu.br

Key-words: cytopathology, Smear Layer, cytological distension, Fishbone technique

Abstract Word Count: 101

Manuscript Word Count: 804

ABSTRACT

Although cytological samples may have diverse origins, the technique we describe applies especially to smears derived from serous effusions. It was called “fishbone” due to the shape of distension on slides. First, it is distended on the main axis along the length of the slide. Then, from this main axis, transversal derivations are extended, at an angle of approximately 45°. In this technique, given the volume of the neoplastic cells, they tend to distribute themselves along the smear periphery, resulting in better cell material disposition, allowing better adherence and, consequently, better visualization of these cell aggregates of diagnostic interest and importance.

Keywords: Fishbone technique; cytology; diagnosis.

METHOD SUMMARY

We present an adaptation of Spriggs & Boddington technique (1) of making dry smears for Romanovsky staining methods. The technique also can be used for Papanicolaou or HE (hematoxylin eosin) stainings, with quick wet fixation.

In the field of cytology, it must be recognized that the final quality of the smear is directly dependent on several factors, including the material harvesting, the separation of the sample of interest and also the experience of who prepare the cell smears (2, 3).

Cytological samples have diverse origins and may be derived from body fluids, fine needle aspiration procedures, secretions, cavitory lavage and scraping (4). However, it must be emphasized that the technique we describe here, based on the experience of our group, is applicable especially to serous effusions.

After harvesting the sample, depending on its kind, is subject to distension. The material must then be fixed in order to preserve cell morphology (4).

The cell smears technique consists of placing a drop of the biological material to be analyzed on a slide, followed then by executing the distension of it. The biological fixation, in this context, is an essential step in the sample processing. It promotes the preservation of the morphologic and macromolecular characteristics of the cells, prevents autolysis or bacterial degradation of the biological material, and also facilitates the staining process, since many stains have greater affinity for the fixed substrate. Therefore, it is possible to state the proper analysis of a smear depends on the adequate preservation of biological material (5).

As such, cytological tests and their complexities must be performed remembering that these procedures are an intrinsic part of patient care, and these test results are an essential part of the decision making process, due to the impact on diagnosis and therapeutic choices. In evidence-based cytology, the goal is to devise test

results that are reproducible, of high quality and clinically relevant (6), with clear benefits for the patient.

Considering all this, we report an alternative type of cytological distension adapted by the senior cytopathologist in the Cytopathology service of the Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA), and performed as routine in this service, which to our knowledge has not yet been described in the literature.

Called “fishbone” due to the shape of the distension on the slide, the reported technique starts with the arrival of the biological material derived of effusions to the Pathology Laboratory, where it is set in a falcon tube, preferably one made of glass, and with a conical bottom, for sedimentation with the aid of a centrifuge (for 10 minutes at 1100 rpm). After centrifugation the supernatant must be completely disposed of and the denser material resting at the bottom of the recipient is collected with the use of a platinum loop, which can store approximately 1 µl of material.

The sample collected by the loop must then be set on the extremity of the slide, nearest to its frosted end (Figure 1, panel A). After this step, the material must be distended along the length of the slide (figure 1, panel B). Then, starting from this main axis, derivations are distended towards the edges of the slide, each at an angle of circa 45° (Figure 1, panels C and D).

With the usage of this technique as a routine in our Cytopathology service, we have observed that, the greater the volume of the malignant cells, the more they distribute themselves in the transversal axes' peripheral extremities on the slide, resulting in a sufficiently thin smear for a proper cytological analysis of the effusions. This may be seen in figure 2, which depicts a slide prepared in the Cytology Laboratory of ISCMPA, using the fishbone technique and high power visualization of a sector of this slide.

In summary, one of the greatest advantages of this modality of cytological smears is due to the volume of the malignant cells. This causes aggregates of isolated or groups of neoplastic cells fixing themselves to the preparation extremities, resulting in better adherence and, consequently, better visualization of these cell aggregates of diagnostic interest and importance.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

1. Have made substantial contributions to conception and design, or acquisition of data, or analysis and interpretation of data: JCP, CGB. 2. Have been involved in drafting the manuscript or revising it critically for important intellectual content: JCP, GTS, PASS, RCF, RLB, DBMR, LAJV, CGB. 3. Have given final approval of the version to be published: GTS, CGB, PASS, RCF, RLB, DBMR, JCP. 4. Agree to be accountable for all aspects of the work in ensuring that questions related to the accuracy or integrity of any part of the work are appropriately investigated and resolved: GTS, CGB, JCP.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to thank Dr. Spriggs for the opportunity of learning from him.

COMPETING INTERESTS

The authors declare no competing interests.

REFERENCES

1. **Spriggs, A.I. and M.M. Boddington.** 1968. Appendix on Technical Methods, p. 51-58. In A. I. Spriggs, and M.M. Boddington (Eds.), *The Cytology of Effusions and of Cerebrospinal Fluid*. William Heineman, London, UK.
2. **McGoogan, E., T.J. Colgan, I. Ramzy, B. Cochand-Priollet, D.D. Davey, H.K. Grohs, A.M. Gurley, O.A.N. Husain, et al.** 1998. Cell preparation methods and criteria for sample adequacy. International Academy of Cytology Task Force summary. *Diagnostic Cytology Towards the 21st Century: An International Expert Conference and Tutorial*. *Acta Cytol* 42:25-32.
3. **Shabnam, M., S. Sharma, S. Upreti, R. Bansal, M. Saluja, A. Khare, M. Tripathi, and S. Khanna.** 2013. Comparative Study of Processing of Haemorrhagic Body Fluids by Using Different Techniques. *J Clin Diagn Res* 7:2186-2188.
4. **Caputo, L.F.G, E.M. Mota, and L.B. Gitirana.** 2010. Técnicas Citológicas, p. 189-214. In E.M. Molinaro, L.F.G. Caputo, M.R.R. Amendoeira (Eds.), *Conceitos e métodos para formação de profissionais em laboratórios de saúde Volume 2*. EPSJV, IOC, Fiocruz, Manguinhos, RJ.
5. **Koss, L.** 2005. *Koss' diagnostic cytology and its histopathologic bases*. LWW, 5th ed.
6. **Dey, P.** 2007. Time for evidence-based cytology. *Cytojournal* 4:1.

Figure 1. Step-by-step schematic representation of the biological material distension on the slide. (A) Placement of the sample collected with the loop on the proper end of the slide. (B) Distension of the material along the length of the slide. (C, D) Extension of transversal derivations at a 45° angle.

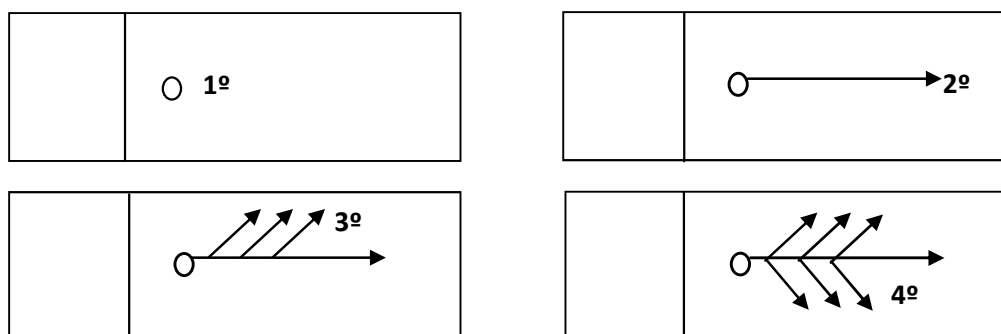
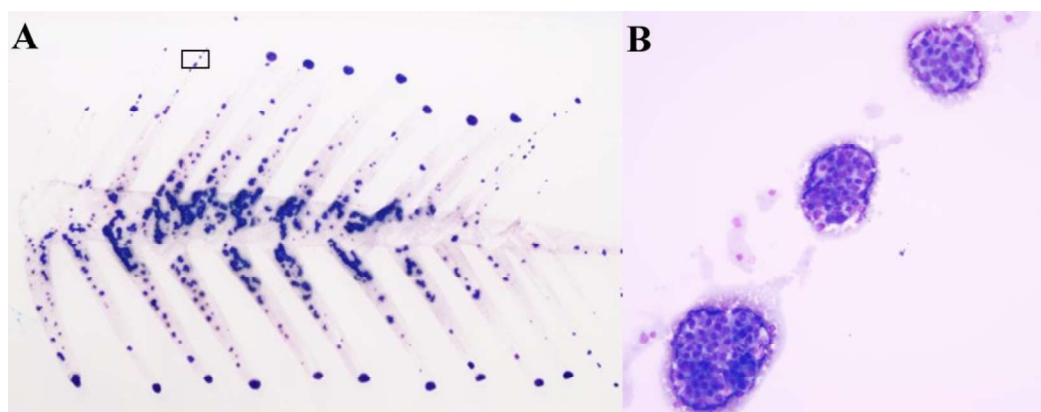


Figure 2. Slide made with the fishbone technique and stained with Giemsa stain. (A) The slide as seen in its entirety. (B) Photograph of the highlighted sector in (A) at a power of 200x. Picture taken with a digital camera attached to the light microscope (model Olympus® DP2-BSW and software DP2-BSW).



4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

a) Da Tese

Os trabalhos aqui apresentados fazem parte de um grande projeto intitulado “**Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama**”, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), com Parecer N° 254.516/12 e ISCMPA com parecer N° 193.243/12. Desse projeto maior estão sendo desenvolvidos trabalhos na modalidade de Iniciação Científica, uma dissertação de Mestrado, a presente Tese de Doutorado, além de outros projetos em andamento.

O Serviço de Mastologia do Hospital Santa Rita da ISCMPA é um centro de referência no tratamento de pacientes com câncer de mama, assim como o serviço de Patologia, na excelência do diagnóstico. Essa parceria, para o desenvolvimento do presente projeto teve início em 2010, no serviço de Patologia, e em 2013 no Serviço de Mastologia, sendo um objetivo comum a ambos os grupos, além do diagnóstico e tratamento, a investigação do quadro metastático e seus distintos padrões de agressividade.

O vínculo entre uma instituição de ensino (UFCSPA), e um hospital que acolhe é extremamente promissor. A partir desse acolhimento, nosso grupo de Pesquisa, propôs aprimorar na linha de marcadores tumorais de diagnóstico e prognóstico, o conhecimento sobre fatores envolvidos entre o processo metastático e o prognóstico das pacientes, necessário para compreender a evolução e/ou agressividade desta neoplasia.

Apresentamos como resultados desta pesquisa, o Artigo I, intitulado “*Neoplastic pleural effusion of primary breast cancer: study of cohort*” no qual evidenciamos uma mudança no padrão imuno-histoquímico da doença metastática quando comparada ao tumor primário e que a super-expressão de Her-2 na metástase pleural reflete um pior prognóstico para as pacientes com câncer de mama avançado.

O Artigo II, intitulado “*Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer*”, mostramos que derrame pleural com células isoladas está associado a pior prognóstico depois de 30 meses de acompanhamento, e no Artigo III, intitulado “*Fishbone technique: Quality of the cytological distension with impact on diagnosis.*”, descrevemos a metodologia de distensão citológica, aperfeiçoada pelo Médico Citopatologista Dr. João Carlos Prolla. Técnica amplamente utilizada na ISCMPA, para distensão de líquidos, a qual até então, não foi descrita na literatura (Artigo III, página 88).

No apêndice 1 desta Tese, apresentamos, parte da descrição morfológica do padrão esferoide, que está sendo desenvolvida através da parceria com a professoras Gisele Orlandi Introíni, e colaboração da professora Marilda da Cruz Fernandes, e da aluna de Iniciação Científica Naiane Carlesso Bassani.

No **Apêndice 2** exibimos os resultados parciais apresentados em eventos durante o desenvolvimento deste trabalho de Doutorado, os quais foram fundamentais na construção deste conhecimento.

b) Do período de doutoramento

A oportunidade de cursar Doutorado nesta Instituição, circundada por uma equipe de professores competentes e atuantes nos três pilares que estruturam a Universidade: ensino-pesquisa-extensão permitiu-nos envolver em diversos trabalhos, os quais abaixo descrevemos:

1) **No âmbito da pesquisa**, através dos artigos e apêndices, apresentamos os resultados deste projeto, e abaixo os projetos aos quais estamos engajados:

a) *Perfil de Pacientes Com Derrame Pleural e História de Câncer de Mama*. Concluído em 2012, com a finalização do Mestrado.

b) *Análise da Morfologia das Células do Derrame Pleural Neoplásico*. Resultantes deste projeto estão apresentadas no **Artigo II**, através do artigo intitulado “*Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer*”.

c) *Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama*. Projeto amplo, o qual oportunizou o desenvolvimento deste trabalho de doutorado, entre outros.

d) *Microscopia eletrônica e criação de ilustrações tridimensionais de células neoplásicas encontradas em derrames pleurais obtidos de pacientes com histórico de câncer de mama*. Projeto em andamento, para realização da descrição morfológica recorrendo a ilustrações tridimensionais das células neoplásicas, através da orientação da professora e Co-orientadora Gisele Orlandi Introíni, colaboração dos professores Marilda da Cruz Fernandes,

Claudia Giuliano Bica e João Carlos Prolla, e da aluna de Iniciação Científica Naiane C. Bassani. Constante no **Apêndice 1**.

e) *Estudo dos marcadores tumorais no câncer de mama*. Em andamento.

f) *O conhecimento de diferentes segmentos da população de Porto Alegre frente aos fatores de risco para o câncer de mama*. Este projeto resultou na validação transcricional de instrumento de coleta para permitir a identificação do conhecimento da população frente aos fatores de risco para o câncer de mama. Trabalho este que foi apresentado como Conclusão de Curso desta Instituição.

g) *Câncer de Colo do Útero: Adesão e Tratamento*. Projeto este que ofereceu subsídio para elaboração de um projeto de extensão “Mulheres em ação”.

Alguns destes projetos foram contemplados com bolsas de Iniciação Científica e Jovens Talentos para a Ciência, desde o ano de 2010 a 2015.

Além de co-orientarmos alunos de Graduação em seus Trabalhos de Conclusão de Curso, intitulados:

a) Avaliação do perfil tumoral e dos fatores de risco em pacientes com câncer de mama e derrame pleural neoplásico (novembro de 2012);

b) Comparação de duas técnicas citopatológicas: citologia de líquidos *versus* “Cell Block” (novembro de 2015), a qual originou um artigo científico, que está em processo de submissão à revista científica;

c) Caracterização das diferentes patologias que levam ao derrame pleural: um estudo de coorte (novembro de 2015).

Além da atividade de co-orientação, participamos como membro avaliador de bancas de Trabalho de Conclusão de Curso, nos anos de 2014 e 2015.

Fomos convidadas a contribuir no Livro Cinema, Ética e Saúde, pelos organizadores: Ana Carolina da Costa Fonseca, Cora Efrom, Isabella Moreira dos Santos, publicado pela Editora Bestiário (2014), no qual escrevemos três capítulos, abaixo descritos:

a) *Coma: confrontando o ensino de anatomia humana e pesquisas*. Da autoria de Giovana Tavares dos Santos, Nádia Nara Tavares dos Santos, Claudia Giuliano Bica.

b) *AIDS, preconceito e tratamento em Clube de compras Dallas*. Da autoria de Alana Ranzi, Giovana Tavares dos Santos, Rosicler L. Brackmann, Claudia G. Bica.

c) *O coração de Jenin: uma história real sobre doação de órgãos para transplante*. Da autoria de Giovana Tavares dos Santos e Claudia G. Bica.

Contribuímos ainda, com capítulo de livro técnico, intitulado Efusões e Sistema Respiratório, editado pela ANACITO (Associação Nacional de Citologia), a ser publicado em março de 2016. Neste contexto, ainda fomos convidados para apresentar os resultados do trabalho que investigamos a morfologia do derrame pleural neoplásico em pacientes com histórico de

câncer de mama. Apresentado no II Congresso Brasileiro de Citologia (outubro de 2015, em Gramado/RS).

De forma a integralizar as etapas que envolveram a execução do trabalho que recorre à microscopia eletrônica de transmissão, tivemos oportunidade de vivenciar parte da técnica na Unicamp (Campinas/SP), para ampliar os conhecimentos nas técnicas realizadas por eles. Intercâmbio este mediado pela Co-orientadora, professora Dra. Gisele O. Introíni.

2) **No âmbito do ensino**, durante o período de novembro de 2013 a setembro de 2014, recebemos a informação de aprovação em um processo seletivo, para professor substituto na Universidade Federal do Pampa – Campus Uruguaiana, na disciplina de Anatomia Humana, atuando na formação acadêmica de alunos de diversos cursos de Graduação (Educação Física, Enfermagem, Fisioterapia e Farmácia), por dois semestres. Desta forma, mostramos o diferencial que este Curso de Pós-Graduação oferece em nossa formação profissional e inserção no mercado de trabalho.

Na Universidade Regional do Noroeste do Estado do Rio Grande do Sul, UNIJUÍ, Brasil, contribuímos no curso de Pós-Graduação em Oncologia, como Professor Visitante ministrando disciplinas de: Oncogênese e Aconselhamento Genético.

Na própria Instituição (UFCSPA) auxiliamos na organização de dois eventos do curso: IX e X Jornadas do Programa de Pós- Graduação em Patologia, nas edições de 2013 e 2015.

Fomos também convidadas para auxiliar na elaboração de um projeto, para concorrer ao Edital do Pronon (Programa Nacional de Apoio à Atenção Oncológica). Este é um programa implantado pelo Ministério da Saúde, para incentivar ações e serviços desenvolvidos por entidades sem fins lucrativos no campo da oncologia, desta forma pessoas físicas e jurídicas podem contribuir com doações para projetos deduzindo 1% de Imposto de Renda. O projeto intitula-se “Aperfeiçoamento no diagnóstico do câncer”, para angariar recursos objetivando implementar o serviço de diagnóstico molecular do câncer no Laboratório de Patologia do Hospital Santa Rita, da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre.

3) **No âmbito da extensão**, mais recentemente, através da colaboração em dois projetos de extensão contemplados no Edital Proext/2016, intitulados: “*Mulheres em ação*”, sob coordenação da professora Dra. Claudia Giuliano Bica, e no projeto “*Criação de ferramentas pedagógicas que promovem a acessibilidade em Biologia Celular e Tecidual recorrendo a softwares de modelagem e impressão 3D*”, sob coordenação da professora Dra. Gisele Orlandi Introíni.

4) Prêmios e destaques:

a) O trabalho intitulado: Impacto Da Morfologia Celular do Derrame Pleural na Sobrevida de Pacientes com Câncer de Mama foi destaque de sessão na Semana Acadêmica - Modalidade Patologia (2013),

b) O trabalho “*Análise da Morfologia das Células do Derrame Pleural Neoplásico*” foi congratulado com Honra ao Mérito no XII Congresso Sul Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia (2014).

c) O artigo “*Impact of Cell Arrangement of Pleural Effusion in Survival of Patients with Breast Cancer*” publicado na revista “*Acta Cytologica*” teve a imagem da célula isolada, cedida pelo Prof. Dr. João Carlos Prolla, selecionada para aparecer com destaque na capa da revista científica.

5. APÊNDICES

5.1 Apêndice 1: Microscopia eletrônica e criação de ilustrações tridimensionais de células neoplásicas encontradas em derrames pleurais obtidos de pacientes com histórico de câncer de mama

Colaboração em andamento.

Título: Microscopia eletrônica e criação de ilustrações tridimensionais de células neoplásicas encontradas em derrames pleurais obtidos de pacientes com histórico de câncer de mama

Autores: Naiane Carlesso Bassani^a Giovana Tavares dos Santos^b; João Carlos Prolla^c; Rosicler Luzia Brackmann^d; Claudia Giuliano Bica^e; Marilda da Cruz Fernandes^e; Gisele Orlandi Introíni^f

a. Bolsista de Iniciação Científica. Estudante de Biomedicina, na Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

b. Msc. Laboratório de Pesquisa em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

c. PhD. Laboratório de Patologia, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

d. Msc. Laboratório de Patologia, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

e. Dr. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

f. PhD. Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

1. Metodologia do trabalho em andamento

a) Primeiramente ocorreu a captura em Microscopia de Luz (ML) das imagens a partir de lâminas elaboradas para diagnóstico no laboratório de referência, com o emprego da técnica de “espinha de peixe” (**Figura 1**), recorrendo ao Programa *Image Pro Plus*®, das células neoplásicas isoladas e agregadas submetidas às colorações de Giemsa e Papanicolaou;

b) Em um segundo momento, à medida que eram identificados os casos de interesse, esses eram separados, e então a amostra biológica, na quantidade de 0,1 - 0,3 mm³ era inserida em um eppendorf contendo a solução tampão (em glutaraldeído 2,5%, em tampão cacodilato de sódio 0,1M, em pH 7,2, acrescido de sacarose 3% e cloreto de cálcio (CaCl²) 5mM, homogeneizado e armazenado sob temperatura ambiente de 12 a 24h;

c) após 19 horas, a amostra foi centrifugada novamente, a 1300rpm por 5 minutos, descartando o sobrenadante, e adicionando ao eppendorf, uma nova alíquota de tampão. O material foi re-suspendido, homogeneizando. Ficando neste meio por 20 minutos;

d) O eppendorf foi centrifugado novamente, repetindo o processo, descartando o sobrenadante e adicionando uma nova alíquota de tampão, homogeneizando a amostra;

e) Após a fixação, o material foi lavado durante três horas com tampão cacodilato, e pós-fixado em tetróxido de ósmio (OsO_4) 1% em tampão cacodilato de sódio;

f) Posteriormente, ocorreu uma desidratação em série crescente de acetona, finalizando com a inclusão em EPON 812.

g) Os cortes ultra-finos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo. Todos os cortes ultra-finos foram observados em um microscópio eletrônico de transmissão (Zeiss, Leo 906), operando a 60 e 80 kV.

h) As células neoplásicas agregadas (**Figura 2**) e, posteriormente, as células neoplásicas isoladas (**Figura 3**), foram observadas para que suas arquiteturas fossem descritas:

2. Apresentação das células neoplásicas através da microscopia de luz:

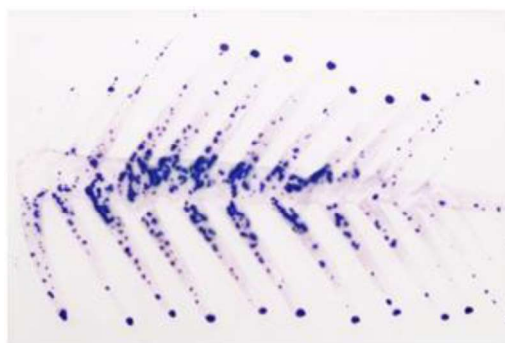


Figura 1: Imagem, obtida com o uso de estereomicroscópio, de lâmina contendo o material obtido por punção aspirativa por agulha fina (PAAF),

disposto em “espinha de peixe”. Técnica adaptada pelo Dr. João Carlos Prolla, conforme apresentada no artigo III desta Tese.

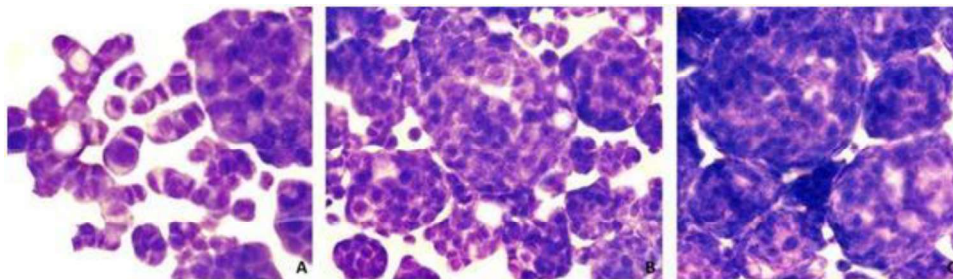


Figura 2: (A-C) Células neoplásicas agregadas (com objetiva de 20x).

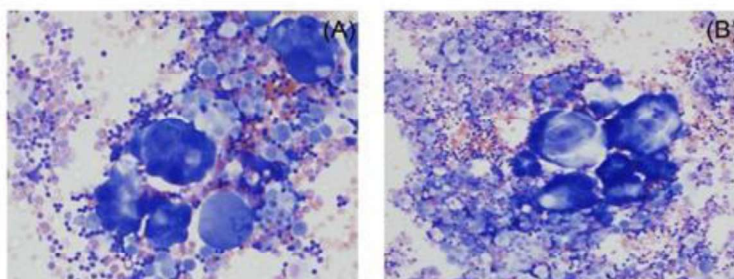
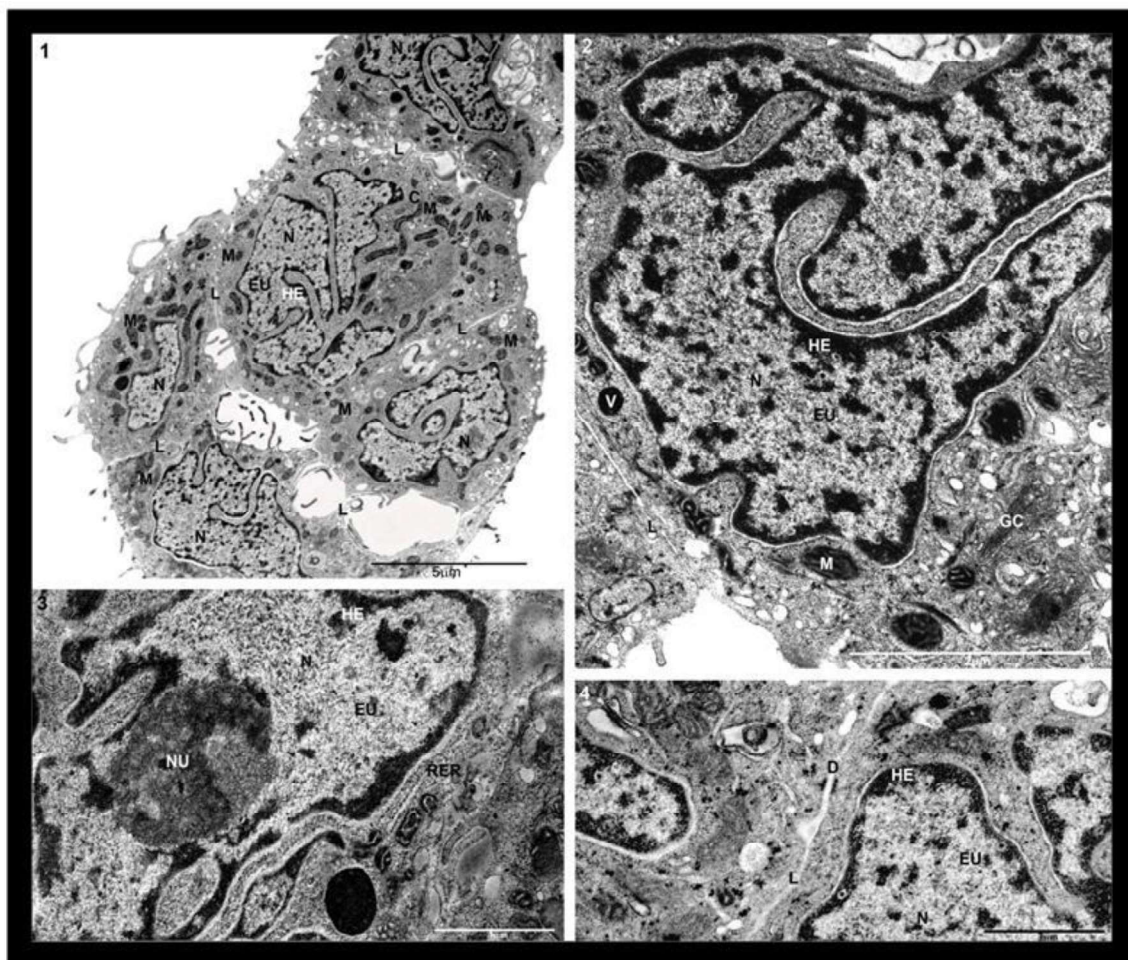


Figura 3: (A-B) Células neoplásicas isoladas (com objetiva de 20x).

3) Descrição das imagens através da microscopia eletrônica de transmissão (Figura 4).



Legenda: GC = Golgi Complex (Complexo de Golgi), D = Desmosome (desmosomo), EU = Eucromatin (eucromatina), HE = Heterochromatin (heterocromatina), M= Mitochondrion (mitocôndria), N = Nucleus (núcleo), NU = nucleolus (nucléolo) RER = Rough Endoplasmic Reticulum (retículo endoplasmático rugoso), L= Cells Limits (limites celulares), C = cytoplasm (citoplasma) e V = Vesicle (vesícula).

Figura 4: Prancha composta por diferentes imagens onde se observa a organização morfológica das células neoplásicas. (1) Imagem panorâmica de células neoplásicas organizadas em *berry-like cluster*. (2) Núcleo com

morfologia atípica exibindo borda irregular. **(3)** Nucléolo evidente sugerindo intensa atividade de transcrição. **(4)** Presença de desmossomo, junção de ancoragem, que desempenha, juntamente com os filamentos intermediários, papel fundamental na manutenção da integridade do *cluster* de células neoplásicas.

4. Discussão

A neoplasia apresenta crescimento excessivo e desordenado em relação aos perfis metabólicos e de desenvolvimento das células e tecidos normais (WILLIS, 2011). Neoplasias possuem características morfológicas específicas que podem ser visualizadas com maior detalhamento pela utilização de técnicas, como a microscopia eletrônica, possibilitando a compreensão das diferenças do arranjo celular das células neoplásicas no líquido pleural.

Na **Figura 4.1**, observa-se a organização das células resultando na formação de um *berry-like cluster*. As margens dos núcleos celulares são irregulares mostrando profundas indentações. Há a presença de inúmeras mitocôndrias, organelas responsáveis pelo processo de respiração celular (Carvalho e Recco-Pimentel, 2007), sugerindo que esse aglomerado apresenta elevada atividade metabólica. As junções celulares de ancoragem (desmossomos) associam-se aos filamentos intermediários desempenhando um papel fundamental na manutenção da integridade estrutural do *cluster*. Há número considerável de vesículas portadoras de material elétron-denso. Essas podem participar do processo de degradação celular, que é representado pelo

envio de elementos do citoplasma aos lisossomos, promovendo a sobrevivência das células neoplásicas (AMARAL, 2010).

Na **Figura 4.2**, visualizam-se a (a) morfologia atípica do núcleo, (b) as vesículas com material elétron-denso, cuja natureza química ainda é desconhecida, (c) as numerosas mitocôndrias e (d) a presença do Complexo de Golgi responsável pelo processamento de proteínas sintetizadas no retículo endoplasmático rugoso.

A **Figura 4.3** apresenta o núcleo com seu nucléolo evidente, sugerindo alta atividade transcricional e conspícuo retículo endoplasmático rugoso demonstrando elevada atividade traducional, modificação e transporte de proteínas. Destaca-se na **Figura 4.4**, além do núcleo com porções heterocromáticas e eucromáticas, (AMARAL, 2010) a presença de desmossomo, uma junção que promove a adesão intercelular possibilitando o arranjo em *clusters*. É importante ressaltar que as células isoladas ainda não foram investigadas recorrendo-se a TEM.

Algumas etapas do projeto foram desenvolvidas, incluindo captura de imagens em ML e TEM, possibilitando em breve a criação de estruturas tridimensionais. Os resultados preliminares ainda não apresentam a robustez necessária para elaboração de manuscritos, mas exibem potencial para futuras publicações.

5. Referências

Amaral JB. Células Mcf-7 como modelo 3d no estudo de câncer de mama humano. 2011. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/42/42134/tde-21072011-134443/>>

Carvalho HF e Recco-Pimentel SM. A célula. 2ª Ed. Barueri, SP. Manole, 2007.

5.2 Apêndice 2: Apresentações parciais resultantes do projeto em estudo.

5.2.1 Resumo apresentado ao: 17º World Congress on the Breast Diseases

Clinical and pathological factors of metastatic breast cancer and neoplastic pleural effusion which suggest negative impact on survival of patients with history of breast cancer.

Santos, G.T.¹; Camillo, N.D.²; Pinheiro, J.L.³; Prolla, J.C.⁴; Brackmann, R.⁵; Sampaio, P.A.⁵; Fernandes, R.C.⁵; Cruz, I.⁶; Bica, C.G.⁷.

1 – Graduate Program in Pathology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.

2 – Scientific Initiation Scholarship, Medical Student of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.

3 – Medical Biologist Student of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.

4 – Cytopathologist, Santa Casa Sisters of Mercy Hospital of Porto Alegre and Hospital Clinics, Porto Alegre/RS – Brazil.

5 – Pathology Laboratory of Santa Casa Sisters of Mercy Hospital of Porto Alegre/RS – Brazil.

6 – Biogenomic Laboratory of Federal University of Santa Maria/RS – Brazil.

7 – Researcher, Graduate Program in Pathology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.

ABSTRACT

Introduction: In recent decades, we have observed an increasing incidence of breast cancer worldwide. In Brazil, the occurrence rate of breast cancer is estimated at 52,689 new cases in 2012. In the state of Rio Grande do Sul, the crude incidence rate of primary breast cancer, is 81,97 every 100 000 inhabitants, representing the Brazilian state with the second highest incidence of breast cancer. This neoplasm is considered a public health problem because of its high incidence, morbidity and mortality, and the high cost of treatment. Complications triggered by distant metastases may affect many patients who have breast cancer. Organs, such as brain, lungs, liver and bones are the main ones to be likely to develop the disease due to breast cancer metastases. Lastly, this study aims to identify clinical and pathological factors that affect the survival of patients with history of breast cancer and pleural effusion neoplastic.

Materials and Methods: A clinical cohort study, in which the exams of patients who had malignant pleural effusion from 2006 to 2010 were analyzed. Throughout these exams, there was a search for the history of breast cancer in medical charts, as well as pathological and cytopathological data related to the

primary tumor and pleural metastasis. Statistical analyses were done using SPSS 18.0, carrying out descriptive analyses, survival curves were estimated by using Kaplan-Meier method and Cox univariate analysis.

Results: Among 145 patients, 87 (60%) were diagnosed as positive for malignant cells in pleural fluid, 119 presented ductal histology. There was a worse prognosis in patients with triple-negative phenotype, showing a sharp decline in the survival curve, and of the 25 patients with triple-negative phenotype, 20 (80%) died. Following up the sample, it was possible to observe an average survival of 6 months for patients who have positive cytological diagnosis for malignant cells in pleural fluid.

Discussion: There was worse prognosis in relation to patients classified as triple-negative, confirming the literature data, presenting a more aggressive tumor, a consequent reduction in survival, and higher incidence of metastasis distant, particularly in visceral organs, such as lung. Studies related to neoplastic spread of breast cancer present a longer interval free of pleural metastases as an indicator of worse prognosis, and this reduction may be associated with poor prognosis factors, such as: site of metastasis and positive diagnosis of malignant cells in pleural fluid, the expression of c-erbB-2, the triple-phenotype negative, and ki-67 protein expression.

Conclusions: In our study, we found the triple-negative phenotype identification in the primary tumor as an unfavorable characteristic to patients, associated with the cytological diagnosis of neoplastic cells in pleural fluid, which indicate a worse prognosis, reflecting in reduction of life expectancy.

Keywords: malignant pleural effusion, survival, metastatic breast cancer.

CLINICAL AND PATHOLOGICAL FACTORS OF METASTATIC BREAST CANCER AND NEOPLASTIC PLEURAL EFFUSION WHICH SUGGEST NEGATIVE IMPACT ON SURVIVAL OF PATIENTS WITH HISTORY OF BREAST CANCER.

Santos, G.T.¹; Camillo, N.D.²; Pinheiro, J.L.³; Prolla, J.C.⁴; Brackmann, R.⁵; Sampaio, P.A.⁵; Fernandes, R.C.⁵; Cruz, I.⁶; Bica, C.G.⁷.



1 – Graduate Program in Pathology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.
2 – Scientific Initiation Scholarship, Medical Student of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.
3 – Medical Biologist Student of Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.
4 – Cytopathologist, Santa Casa Sisters of Mercy Hospital of Porto Alegre and Hospital Clinics, Porto Alegre/RS – Brazil.
5 – Pathology Laboratory of Santa Casa Sisters of Mercy Hospital of Porto Alegre/RS – Brazil.
6 – Biogenomic Laboratory of Federal University of Santa Maria/RS – Brazil.
7 – Researcher, Graduate Program in Pathology – Federal University of Health Sciences of Porto Alegre/RS – Brazil.

Introduction

We have observed an increasing incidence of breast cancer worldwide. This neoplasm is considered a public health problem because of its high incidence, morbidity and mortality. Complications triggered by distant metastases may affect many patients who have breast cancer.

This study aims to identify clinical and pathological factors that affect the survival of patients with history of breast cancer and neoplastic pleural effusion.

Material and Methods

A cohort study, in which the exams of patients who had malignant pleural effusion from 2006 to 2010 were analyzed. Throughout these exams, there was a search for the history of breast cancer in medical charts, as well as pathological and cytopathological data related to the primary tumor and pleural metastasis. Statistical analyses were done using SPSS 18.0, survival curves were estimated by using Kaplan-Meier method and Cox univariate analysis.

Results

Below are the demographic characteristics of patients:

Characteristics	Results
Mean age in determining events	
Diagnosis of breast cancer	55, 10 ± 15 years
Diagnosis of neoplastic pleural effusion	57, 4 ± 12 years
Occurrence of death	59, 11 ± 14 years
Death of patients with neoplastic pleural effusion	57, 10 ± 12 years
Histological type of primary tumor	
Ductal	119 (91%)
Lobular	8 (6%)
Other subtypes	4 (3%)
Total	131 (100%)
Triple-Negative	
Patients triple-negative	25 (24%)
Patients not triple-negative	80 (76%)
Total	105 (100%)
Cytopathological evaluation	
Positive Cytology	87 (60%)
Negative Cytology	51 (35%)
Unsatisfactory evaluation	7 (5%)
Total	145 (100%)
Outcome of the study	
Death	91 (65%)
Not death	49 (35%)
Total	140 (100%)

** Values expressed in absolute numbers (%), or mean (sd).

*** Not all patients had the study variables measured or evaluated.

Among 145 patients, 87 (60%) were diagnosed as positive for malignant cells in pleural fluid, 119 presented ductal histology.

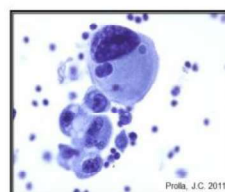


Figure 1: Malignant cells in pleural fluid. 400x.

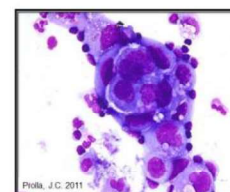


Figure 2: Malignant cells in pleural fluid. 400x.

There was a worse prognosis in patients with triple-negative phenotype, showing a sharp decline in the survival curve. Of the 25 patients with triple-negative phenotype, 20 (80%) died.

It was possible to observe an average survival of 6 months for patients who have positive cytological diagnosis for malignant cells in pleural fluid.

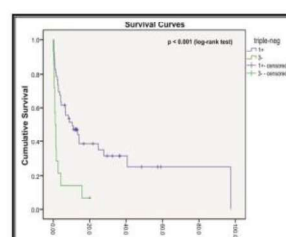


Figure 3: Survival curve from the pleural metastases to death, compared to the identification of triple-negative phenotype in the primary tumor.

In Cox univariate analysis and Kaplan-Meier method, comparing the survival of patients with positive cytological diagnosis for malignant cells in pleural fluid, it is noted that, except for triple-negative, the other analyses were not statistically significant (Table 2).

Table 2:

The result of Cox univariate analysis regarding mortality in relation to possible risk variables			
Variables related to primary tumor	p	IC	Hazard Ratio
Histological type	0.528	0.53; 3.37	1.345
Age	0.123	0.358; 1.132	0.635
Ki-67 expression	0.165	0.561; 29.730	4.084
Triple-negative	0.001*	1.60; 6.08	3.129

In our study, we found the triple-negative phenotype identification in the primary tumor as an unfavorable characteristic to patients, associated with the cytological diagnosis of neoplastic cells in pleural fluid, which indicate a worse prognosis, reflecting in reduction of life expectancy.

Contatc: giovanat@ufcsa.edu.br



5.2.2 Resumo apresentado ao: Salão de Pós-Graduação da UFRGS

Fatores clínicos e anatomopatológicos que sugerem impacto negativo na sobrevida de pacientes com câncer de mama e derrame pleural neoplásico.

Giovana Tavares dos Santos¹, Natália Dressler Camillo², Rosicler Mendes³, João Carlos Prolla⁴, Claudia Bica⁵

1 Ms. Departamento de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

2 Acadêmica de medicina, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

3 Ms. Laboratório de Patologia, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul

4 PhD. Laboratório de Patologia, Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

5 PhD. Departamento de Pós Graduação em Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, Porto Alegre, Rio Grande do Sul.

Resumo

Introdução: O câncer de mama é uma doença de grande morbidez e mortalidade em âmbito mundial, e apresenta complicações mais graves a partir das metástases à distância. O derrame pleural ocorre comumente em pacientes com câncer de mama, e têm sido associados a maus prognósticos.

Objetivo: Este estudo tem por objetivo, verificar possíveis fatores clínicos e anatomopatológicos, que podem interferir no prognóstico de pacientes que apresentaram quadro de derrame pleural neoplásico e histórico de câncer de mama. **Métodos:** Estudo de coorte histórica, onde foram avaliados exames e prontuários das pacientes com diagnóstico de derrame pleural neoplásico, entre 2006 a 2010. Buscou-se nos prontuários médicos o diagnóstico prévio de câncer de mama, dados anatomopatológicos e citopatológicos em relação ao tumor primário e a metástase pleural. Análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SPSS Versão 18.0, realizando análises descritivas, e as curvas de sobrevida foram calculadas segundo o método de Kaplan-Meier e análise univariada de Cox.

Resultados: Das 145 pacientes, 87 (60%) apresentaram diagnóstico citológico positivo para células neoplásicas no líquido pleural, 119 apresentaram tipo histológico ductal. Frente ao quadro de derrame pleural positivo relacionado ao desfecho (óbito), incluímos 84 pacientes, onde 60 (71%) evoluíram a óbito ($p=0,02$). Da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, observou-se pior prognóstico nas pacientes portadoras do fenótipo triplo-negativo no tumor primário, apresentando uma queda acentuada na curva de sobrevida destas pacientes; dentre as 25 pacientes portadoras deste fenótipo, 20 (80%) evoluíram a óbito. No acompanhamento da amostra, verificou-se a média de 6 meses para sobrevida das pacientes com diagnóstico citológico positivo para células neoplásicas no líquido pleural. **Conclusões:** Neste estudo, identificou-se como característica desfavorável às pacientes, a identificação do fenótipo triplo-negativo no tumor primário, associados ao diagnóstico citológico de células neoplásicas no líquido pleural, apontando um pior prognóstico, refletindo na redução da expectativa de vida.

Palavras-chave: Derrame Pleural Neoplásico, Sobrevida, Câncer de Mama Metastático.

ESTUDO RETROSPECTIVO DE PACIENTES COM DERRAME PLEURAL E HISTÓRIA DE CÂNCER DE MAMA

Giovana Santos¹; Natália Camillo²,
João Carlos Prola³; Rosicler Brackmann³;
Claudia Bica¹.

1 – UFCSPA – PPG - Patologia
2 – UFCSPA – Grad. em Medicina
3 – Comp. Hosp. Santa Casa de Porto Alegre/RS – Laboratório de Patologia

Introdução

Altos índices de morbidade e mortalidade relacionados ao câncer de mama, ocorrem em função de metástases. Apesar dos avanços nesta área, 20 a 30% das pacientes com tumor primário na mama, terão doença metastática à distância (Kennecke H. *et al*, 2010). O derrame pleural ocorre comumente em pacientes com câncer de mama, e têm sido associados a maus prognósticos.

Objetivo

Verificar fatores clínicos e anatomopatológicos, que possam interferir no prognóstico de pacientes que apresentaram quadro de derrame pleural neoplásico e histórico de câncer de mama.

Material e Métodos

Estudo de coorte histórica. Foram avaliados exames e prontuários das pacientes com diagnóstico de derrame pleural neoplásico, entre 2006 a 2010. Buscou-se nos prontuários médicos o diagnóstico prévio de câncer de mama, dados anatomopatológicos e citopatológicos em relação ao tumor primário e a metástase pleural. Análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SPSS Versão 18.0, realizando análises descritivas, e as curvas de sobrevida foram calculadas segundo o método de Kaplan-Meier e análise univariada de Cox.

Resultados e Conclusão

Dentre as 145 pacientes alvo deste estudo, 90% apresentaram CDI como tumor primário na mama. Confirmaram-se em 60% das pacientes a presença de células neoplásicas no líquido pleural.

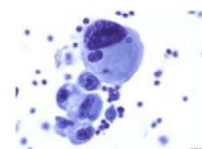


Figura 1: Célula neoplásica no LP. 400x. Prola, JC.

Tabela 1:

Comparação do tempo em meses de intervalo entre os eventos determinantes

Variáveis	Fentimann (1981)	van Galen (2010)	Este estudo (2011)
1	41.5	63.6	20.4
2	15.7	9.3	6

1 - Intervalo de tempo entre o diagnóstico do tumor primário e a metástase pleural

2 - Intervalo de tempo entre o diagnóstico da metástase pleural e o óbito

Observa-se na curva de Kaplan-Meier (fig 2), que o intervalo médio da metástase ao óbito ocorreu em 6 meses. E a expressão IHQ, sugeriu pior prognóstico nas pacientes portadoras do fenótipo triplo-negativo no tumor primário, apresentando uma queda acentuada na curva de sobrevida destas pacientes. Das 25 pacientes triplo-negativo, 20 (80%) evoluíram a óbito.

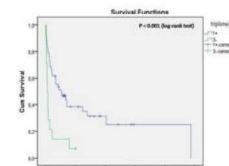


Figura 2: Gráfico de sobrevida, a partir da metástase pleural ao óbito.

Das pacientes com derrame pleural neoplásico frente ao desfecho, incluímos 84, onde 60 (71%) evoluíram a óbito ($p=0,02$).

Este estudo vem confirmando pior prognóstico, a partir da presença de células neoplásicas no derrame pleural, entretanto para melhor compreender essa recidiva tumoral, sugere-se estudos mais aprofundados com o intuito de delinear o perfil das pacientes acometidas por câncer de mama.

Referências Bibliográficas

- Van Galen KP, Visser HP, van der Ploeg T, Smorenburg CH. Prognostic factors in patients with breast cancer and malignant pleural effusion. *The Breast Journal*. 16 (6):675-7. Nov-Dec 2010.
- INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. 2010.
- Pokieser W, Cassik P, Fischer G, Vesely M, Ulrich W, Peters-Engl C. Malignant pleural and pericardial effusion in invasive breast cancer: impact of the site of the primary tumor. *Breast Cancer Research and Treatment*. 83(2): 139-42. Jan 2004.
- Koo JS, Jung W, Jeong J. Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. *Tumori*. 96 (3): 424-32. May-Jun 2010.

5.2.3 Resumo apresentado ao: XII Congresso Sul Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia

Expressão dos marcadores imuno-histoquímicos no derrame pleural neoplásico em pacientes com história de câncer de mama.

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre; Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - Porto Alegre - Rio Grande do Sul

Santos, GT; Fardin, GS; Camillo, ND; Pinheiro, JL; Scheide, TV; Thiesen, A; Perin, Grossmann, R; Brackmann, RL; Cunha, A; Meurer, RT; Stein, T; Prolla, JC; Bica, CG.

INTRODUÇÃO: O câncer de mama é o tumor maligno que mais acomete o sexo feminino. No Brasil, são estimados para 2014, 57.120 novos casos. Apesar dos avanços no tratamento, de 20 a 30% dos pacientes com câncer de mama, mesmo em estágio inicial, apresentarão doença metastática à distância.

OBJETIVOS: comparar a expressão imuno-histoquímica do painel de marcadores tumorais no câncer de mama no derrame pleural neoplásico.

MATERIAIS E MÉTODOS: estudo de coorte histórica, onde foram incluídos pacientes do sexo feminino com derrame pleural neoplásico e história de câncer de mama. Foram realizados testes imuno-histoquímicos a partir do *cell block* do derrame pleural neoplásico, ocorridos entre janeiro de 2008 a dezembro de 2013. As informações quanto ao quadro de câncer de mama e dados anatomopatológicos e citopatológicos em relação ao tumor primário e a metástase pleural, foram resgatadas através dos prontuários médicos. Análises estatísticas foram realizadas no programa estatístico SPSS Versão 18.0.

RESULTADOS E CONCLUSÕES: Foram incluídas neste estudo, 39 pacientes com diagnóstico citológico de DPN. As pacientes investigadas apresentaram idade entre 26 e 85 anos, com média para o diagnóstico do câncer de mama de 54 anos, e a média de sobrevida a partir do diagnóstico do derrame pleural neoplásico foi 4 meses. Dos 39 casos, houve maior prevalência do tipo histológico ductal invasor, representando 86,5% (32) dos casos. Segundo

classificação molecular do câncer de mama, 9 (23%) eram do grupo luminal A, 27 (69%) luminal B e/ou luminal Her-2, 1 (3%) triplo-negativo basal, 2 (5%) triplo-negativo não basal. Em contrapartida no derrame pleural, a expressão foi respectivamente: 11 (28%) eram luminal A, 9 (23%) luminal B e/ou luminal Her-2, 11 (28%) Her-2 super-expresso e 8 (21%) triplo-negativo basal. Pode-se observar a expressão do grupo Her-2 super-expresso no derrame pleural neoplásico, o qual não havia se apresentado no perfil do tumor primário, apresentando uma mudança no perfil de expressão dos marcadores, sendo que este mesmo marcador tumoral, conforme a literatura representa pior prognóstico. Apesar da melhora no diagnóstico da doença metastática e no entendimento do perfil biológico, necessita-se um maior aprofundamento nas pesquisas sobre câncer de mama metastático.

Área de pertinência: Mastologia.

EXPRESSÃO DOS MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS NO DERRAME PLEURAL NEOPLÁSICO EM PACIENTES COM HISTÓRIA DE CÂNCER DE MAMA



Santos GT¹; Fardin GS¹; Camillo ND¹; Pinheiro JL¹; Scheide TV¹; Thiesen A¹; Perin M¹; Grossmann R²; Brackmann RL²; Cunha A²; Meurer RT¹; Stein T¹; Prolla JC²; Bica CG¹.

**1: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA);
2: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA);**

Introdução

O câncer de mama é o tumor maligno que mais acomete o sexo feminino. No Brasil, são estimados para 2014, 57.120 novos casos. Apesar dos avanços no tratamento, de 20 a 30% dos pacientes com câncer de mama, mesmo em estágio inicial, apresentarão doença metastática à distância.

Objetivo

Comparar a expressão imunohistoquímica do painel de marcadores tumorais no câncer de mama no derrame pleural neoplásico.

Material e Métodos

Estudo de coorte histórica. Incluídos pacientes do sexo feminino com história de câncer de mama e DPN de 2000 a 2013.

Abaixo ao metodologia de processamento do material:



Informações quanto aos quadros clínicos foram resgatadas através dos prontuários médicos das pacientes. Análises estatísticas realizadas no programa estatístico SPSS Versão 16.0.

Resultados e Conclusão

Incluídas neste estudo, 39 pacientes com diagnóstico citológico de DPN. As pacientes apresentaram idade entre 26 e 85 anos (M = 54 anos), e a média de sobrevida a partir do diagnóstico do derrame pleural neoplásico foi 4 meses.

Houve prevalência histológica do carcinoma ductal invasor, representando 86,5% (32) dos casos.

Variáveis	Ca de mama (%)	DPN (%)
Luminal A	9 (23)	11 (28)
Luminal B/ luminal Her	27 (69)	9 (23)
Her superexpresso	1 (3)	11 (28)
Tripla-negativo basal	0 (0)	8 (21)
Tripla-negativo não basal	2 (5)	0 (0)

Pode-se observar a expressão do grupo Her-2 superexpresso no DPN, o qual não havia se apresentado no perfil do tumor primário, apresentando uma mudança no perfil de expressão dos marcadores, sendo que este mesmo marcador tumoral, conforme a literatura representa pior prognóstico.

Apesar da melhora no diagnóstico da doença metastática e no entendimento do perfil biológico, necessita-se um maior aprofundamento nas pesquisas sobre câncer de mama metastático.

Contato: giovanat@ufcsa.edu.br

Apoio:



5.2.4 Resumo apresentado ao: XII Congresso Sul Brasileiro de Ginecologia e Obstetrícia

PADRÃO CITOLÓGICO NO DERRAME PLEURAL NEOPLÁSICO E
SOBREVIDA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre
Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – Porto Alegre/Rio Grande do Sul

Autores: Camillo ND; Santos GT; Pinheiro JL; Perin M; Thiesen AP; Grossmann R; Andreoli D; Prolla JC; Brackmann RL; Cruz IBM; Bica CG.

INTRODUÇÃO: o derrame pleural neoplásico é uma ocorrência comum no curso do câncer de mama e tem sido associado a um pior prognóstico. No entanto, alguns grupos de pacientes apresentaram diferenças significativas na estimativa do tempo de sobrevida. Na análise do líquido pleural, foi possível identificar duas características celulares predominantes – formações esferoides e células isoladas. No entanto, questiona-se o quanto estas diferenças morfológicas apresentam significado na prática clínica. **OBJETIVO:** Este estudo foi desenvolvido para avaliar a potencial influência das diferenças citológicas do derrame pleural na sobrevida de mulheres com câncer de mama metastático, durante 30 meses de acompanhamento. **MATERIAL E MÉTODOS:** coorte observacional de base hospitalar. As lâminas do líquido pleural das pacientes foram submetidas à análise citológica por microscopia óptica de luz e foram classificadas em dois grupos - formações esferoides e células isoladas - para posterior análise de sobrevida. **RESULTADOS E CONCLUSÃO:** 87 pacientes foram incluídos no estudo. A maior mortalidade foi associada ao padrão celular isolado 30 meses após o derrame pleural ($p = 0,038$). Pacientes com este padrão apresentaram maior risco de morrer do que os pacientes com formações esferoides. O risco relativo após o ajuste para variáveis intervenientes foi $RR = 5,336$ ($IC\ 95\ \% = 1.054-27,020$). A presença de padrão imuno-histoquímico triplo-negativo aumentou significativamente o risco de

mortalidade antes de 30 meses. A formação citológica no líquido pleural associa-se a uma diferença na sobrevida destas pacientes, uma vez que células isoladas indicam um pior prognóstico após 30 meses de derrame pleural.

Área de pertinência: Mastologia

PADRÃO CITOLÓGICO NO DERRAME PLEURAL NEOPLÁSICO E SOBREVIDA DE PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA



Camillo ND¹; Santos GT¹; Fardin GS¹; Pinheiro JL¹; Perin M¹; Thiesen AP¹; Grossmann R²; Andreoli D¹; Prola JC²; Brackmann RL²; Cruz IBM³; Bica CG¹.

1: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSA);

2: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre (ISCMPA);

3: Universidade Federal de Santa Maria (UFSM)

Introdução

O DPN (derrame pleural neoplásico) ocorre comumente no curso do câncer de mama e tem sido associado a pior prognóstico. Alguns grupos de pacientes apresentaram diferenças significativas na estimativa da sobrevida. Na análise do DPN, foi possível identificar duas características celulares predominantes – formações esferoides e células isoladas. No entanto, questiona-se o quanto estas diferenças morfológicas apresentam significado na prática clínica.

Objetivo

Avaliar a potencial influência das diferenças citológicas do derrame pleural na sobrevida de mulheres com câncer de mama metastático.

Material e Métodos

Coorte observacional de base hospitalar. As lâminas do líquido pleural das pacientes foram submetidas à análise citológica por microscopia de luz e foram classificadas em dois grupos - formações esferoides e células isoladas - para posterior análise de sobrevida.

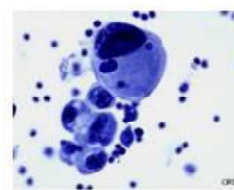
Análises estatísticas realizadas no programa estatístico SPSS Versão 16.0.

Resultados e Conclusão

Foram induídas neste estudo, 87 pacientes. A maior mortalidade foi associada ao padrão celular isolado 30 meses após o derrame pleural ($p = 0,038$). Pacientes com este padrão apresentaram maior risco de morrer do que os pacientes com formações esferoides. O risco relativo após o ajuste para variáveis intervenientes foi $RR = 5,336$ ($IC\ 95\ \% = 1,054-27,020$). A presença de padrão imunoistoquímico triplo-negativo aumentou significativamente o risco de mortalidade antes de 30 meses.



Padrão esferoide. 200x; Camillo, ND



Padrão isolado. 500x; Prola, JC

A formação citológica no líquido pleural associa-se a uma diferença na sobrevida destas pacientes, uma vez que células isoladas indicam um pior prognóstico após 30 meses de derrame pleural.

5.2.5 *Resumo apresentado ao: Goiânia Breast Cancer Symposium*

Malignant pleural effusion: distinct morphological patterns associated with metastatic breast cancer patients' survival.

José L. Pedrini¹, Giovana T. dos Santos², Natália D. Camillo², Tales Vicente Scheide², João C. Prolla³, Rosicler L. Brackmann³, Ivana B. M.⁴, Claudia G. Bica².

1 Grupo Hospitalar Conceição

2 Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

3 Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre – Porto Alegre/Rio Grande do Sul

4 Universidade Federal de Santa Maria

OBJECTIVE: To evaluate morphological differences of malignant pleural effusion comparing the survival of women with metastatic breast cancer for a 30 month follow-up. **METHODOLOGY:** It is an observational cohort hospital database. Cytological slides of pleural effusion were evaluated by light microscopy after this analysis was possible to classify according to the characteristics of this fluid into two distinct groups, namely: predominantly spheroids formations and predominantly single cells. **RESULTS:** 87 patients were included in the survey. It was observed that the group represented by cells with isolated cell pattern had higher mortality 30 months after the pleural effusion ($p = 0.038$), and patients with this respective pattern had higher risk of death compared to the group with spheroid formations. The relative risk after adjustment for intervening variables was $RR = 5.336$ (95% CI = 1054 to 27.020). Due to the immunohistochemical profile of breast cancer, tumors with triple-negative phenotype showed significant increase of the mortality risk before 30 months. **CONCLUSION:** The life expectancy of patients varies by the distinct morphological patterns, the pattern of isolated cells represents a worse prognosis and clinical outcome after 30 months of diagnosis of pleural effusion.

KEYWORDS: metastatic breast cancer, malignant pleural effusion, prognosis

MALIGNANT PLEURAL EFFUSION: DISTINCT MORPHOLOGICAL PATTERNS ASSOCIATED WITH METASTATIC BREAST CANCER PATIENTS' SURVIVAL.



José L. Pedrini, Giovana T. dos Santos², Natália D. Camillo³, Tales V. Scheide³, João Carlos Prolla⁴, Rosicler L. Brackmann⁴, Ivana B. M.⁵, Claudia G. Bica⁶.

1 – Mastologist, Researcher - UFCSPA

2 – Graduate Program in Pathology – UFCSPA.

3 – Medical Student - UFCSPA

4 – Pathology Laboratory - ISCMPA

5 – Biogenomic Laboratory - UFSM

6 – Researcher, Graduate Program in Pathology – UFCSPA

Objective

To evaluate morphological differences of malignant pleural effusion comparing the survival of women with metastatic breast cancer for a 30 month follow-up.

Methodology

It is an observational cohort hospital database. Cytological slides of pleural effusion were evaluated by light microscopy after this analysis was possible to classify according to the characteristics of this fluid into two distinct groups, namely: predominantly spheroids formations and predominantly single cells.

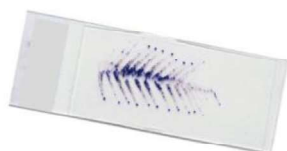


Figure 1: Cytological smear

Results and Conclusion

87 patients were included in the survey. It was observed that the group represented by cells with isolated cell pattern had higher mortality 30 months after the pleural effusion ($p = 0.038$), and patients with this respective pattern had higher risk of death compared to the group with spheroid formations.

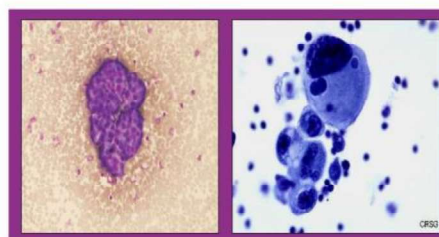


Figure 2: Malignant cells in pleural fluid spheroids and isolated. 400x.

CONCLUSION: The life expectancy of patients varies by the distinct morphological patterns, the pattern of isolated cells represents a worse prognosis and clinical outcome after 30 months of diagnosis of pleural effusion.

6. ANEXOS

6.1 Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama.

Pesquisador: Claudia Giuliano Bica

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08624712.0.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 193.243

Data da Relatoria: 29/01/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo de coorte, para aproximadamente 50 mulheres, no período de março de 2013 a março de 2017, com exame para diagnóstico de derrame pleural neoplásico realizado no Laboratório de Patologia da ISCMPA, com diagnóstico prévio de câncer de mama e com acompanhamento de sobrevida pelo período de 5 anos.

Objetivo da Pesquisa:

Traçar um perfil de pacientes femininas com câncer de mama metastático e derrame pleural metastático e seus respectivos marcadores de riscos / expressão / morfologia, a fim de associar o perfil de derrame pleural maligno ao câncer de mama, aprimorando assim maior conhecimento desta neoplasia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos: possibilidade de risco no momento da colheita de sangue, pertinente a este procedimento. Para obtenção de amostra do derrame pleural não haverá risco pois já foi obtido em momento anterior. Sobre os benefícios: maior conhecimento a respeito da neoplasia.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sobre os critérios de inclusão: pacientes provenientes do Hospital Santa Rita - ISCMPA, do sexo feminino, com diagnóstico de derrame pleural neoplásico, com câncer de mama, no período de janeiro/2013 a julho/2013.

Endereço: R. Profº Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: 5132-1485 **Fax:** 5132-1485 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA
DE MISERICORDIA DE PORTO
ALEGRE - ISCMPA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Sobre os critérios de exclusão: pacientes do sexo masculino, do sexo feminino com o mesmo quadro clínico mas com tumor primário em outra localização, que não exclusivamente na mama.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Já referidos em parecer emitido anteriormente.

Recomendações:

Não aplicável.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Foram adequadas as seguintes situações:

Foram adequadas as seguintes situações:

- Cronograma: para início das atividades em março/ 2013.

- Nome do projeto para "Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama", nos seguintes documentos: "Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos" e na Plataforma Brasil.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA, Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Endereço: R. Profº Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer
Bairro: 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: 5132-1485 **Fax:** 5132-1485 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

6.2 Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama.

Pesquisador: Claudia Giuliano Bica

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 06624712.0.0000.5335

Instituição Proponente: Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

Patrocinador Principal: Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 252.516

Data da Relatoria: 18/04/2013

Apresentação do Projeto:

Estudo de coorte, para aproximadamente 50 mulheres, no período de março de 2013 a março de 2017, com exame para diagnóstico de derrame pleural neoplásico realizado no Laboratório de Patologia da ISCMPA, com diagnóstico prévio de câncer de mama e com acompanhamento de sobrevida pelo período de 5 anos.

Objetivo da Pesquisa:

Traçar um perfil de pacientes femininas com câncer de mama metastático e derrame pleural metastático e seus respectivos marcadores de riscos / expressão / morfologia, a fim de associar o perfil de derrame pleural maligno ao câncer de mama, aprimorando assim maior conhecimento desta neoplasia.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos: possibilidade de risco no momento da colheita de sangue, pertinente a este procedimento.

Para obtenção de amostra do derrame pleural não haverá risco pois já foi obtido em momento anterior.

Sobre os benefícios: maior conhecimento a respeito da neoplasia.

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE
PORTO ALEGRE



Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Estudo a ser realizado na ISCMPA com coparticipação da UFCSPA e da PUC. Já analisado e aprovado pela ISCMPA, conforme parecer 226.214 de 22/03/2013.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados.

Recomendações:

Anexar os documentos solicitados pelo CEP/UFCSPA.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

-

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminhar ao CEP/UFCSPA o formulário de encaminhamento e o termo de entrega de relatório semestral/final.

PORTO ALEGRE, 23 de Abril de 2013

Assinador por:

José Geraldo Vernet Taborda
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite, 245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51) 303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

1.3 Anexo 3: Normas da Revista Científica Biomarkers

Biomarkers
Instructions for Authors

About the Journal

Aims and Scope
Editor-in-Chief

Manuscript Submission

Manuscript Preparation

File preparation and types
Title Page
Abstract
Main Text
Acknowledgements and Declaration of Interest statement
References
Tables
Illustrations
Notes on Style

Editorial Policies

Authorship
Submission
Peer Review
Ethics and Consent
Copyright and Permissions
Declaration of Interest
NIH and Public Access Policy

Additional Information

Proofs
Reprints
Colour figure charges
Contact the Publisher

About the Journal

Aims and Scope

The journal *Biomarkers* brings together all aspects of the rapidly growing field of biomarker research, encompassing their various uses and applications in one essential source. The journal has enlarged its scope to include the expanding area of biomarkers of disease and now intends to include evidence-based pharmacodynamic markers. **Biomarkers**, now more than ever, provides a vital forum for the exchange of ideas and techniques in all areas of biomarker research. High quality papers in four main areas are accepted and manuscripts describing novel biomarkers and their subsequent validation are especially encouraged: **Biomarkers of disease**: covering measurement of endogenous substances or parameters indicative of a disease process and the use of pharmacodynamic and genetic markers in evidence-based laboratory medicine and treatment (markers of efficacy);

Biomarkers of exposure: covering detection and measurement of internal exposure to drugs and other chemicals; Biomarkers of response: including measures of endogenous substances or parameters indicative of pathological or biochemical changes both toxicodynamic and pharmacodynamic, resulting from exposure to drugs and other chemicals;

Biomarkers of susceptibility: including genetic factors which alter susceptibility to drugs and other chemicals. Manuscripts can describe biomarkers measured in humans or other animals in vivo or in vitro. Biomarkers will consider publishing negative data from studies of biomarkers of susceptibility in human populations. The emphasis will be on demonstrating relationships between markers and effects rather than methodological papers unless they describe novel techniques.

Editor-in-Chief

Alan Paine Emeritus Professor of Toxicology University of London London England, UK

Manuscript Submission

All submissions should be made online at **Biomarkers'** ScholarOne Manuscripts site. New users should first create an account. Once a user is logged onto the site, submissions should be made via the Author Centre. If you experience any problems with your submission or with the site, please contact ScholarOne support through the „get help now“ link.

All submissions to the journal must include full disclosure of all relationships that could be viewed as presenting a potential conflict of interest. If there are no conflicts of interest, authors should state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text under a subheading "Declaration of interest", and, where available within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site).

Please see our full Declaration of Interest Policy for further information.

Manuscript Preparation

File preparation and types

Manuscripts are preferred in Microsoft Word format (.doc files). Documents must be double-spaced, with margins of one inch on all sides. Tables and figures should not appear in the main text, but should be submitted as separate digital files and designated with the appropriate file type on ScholarOne

Manuscripts. References should be given in Harvard style (see References section for example). Manuscripts should be compiled in the following order: title page; abstract; main text; acknowledgements; appendices (as appropriate); references; tables with captions (on separate pages); figures; figure captions (as a list).

Biomarkers publishes the following manuscript types:

- Original papers
- Reviews
- Technical briefs
- Letters to the Editor

Title Page

A title page should be provided comprising the manuscript title plus the full names and affiliations of all authors involved in the preparation of the manuscript. One author should be clearly designated as the corresponding author and full contact information, including phone number and email address, provided for this person. Three to six key terms that are not in the title should also be included on the title page. The keywords will assist indexers in cross indexing your article.

Abstract

All original articles and reviews should start with an abstract of 100 or fewer words, summarising the central core of knowledge that is the focus of the paper. The recommended format is as a structured abstract, with the following headings for an original article: context, objective, materials and methods, results, discussion and conclusion. For a review article, it should be structured as follows: context, objective, methods (including data sources, study selection and data extraction), results and conclusion. It should be written in an informative style permitting its use, without revision, by abstracting services, give essential details of research findings without further reference to the text, and avoid generalisations and nonessential information.

Main Text

Original articles The body of the article should include the following sections: introduction; methods; results; discussion; conclusions.

Introduction: This section should state the relevance and background to the study, and its rationale and purpose.

Methods: This section should include only information that was available at the time the plan or protocol for the study was being written. You should describe your selection of the observational or experimental participants, identify the methods, apparatus and procedures in sufficient detail to allow others to reproduce the results, and describe statistical methods with enough detail to enable a knowledgeable reader with access to the original data to verify the reported results. Biomarkers requires that studies involving humans, both volunteers and patients, or animals be approved by an institutional review board, in accordance with approved published guidelines, prior to actually performing the research and publishing the data. Details including clinical trial registration number must be provided in the methods section if research includes studies conducted on human volunteers.

Results: Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations.

Discussion: This should include implications of the findings and their limitations, with reference to all other relevant studies and the possibilities these suggest for future research.

Conclusions: This must summarise the main paper. Ensure that extrapolations are reasonable and that conclusions are justified by the data presented, and indicate if the study design can be generalised to a broader study population.

Reviews

The body of a review article should be a comprehensive, scholarly evidence-based review of the literature, accompanied by critical analysis and leading to reasonable conclusions. Wherever appropriate details of the literature search methodology should be provided, i.e. the databases searched (normally Medline and at least one or two other databases), the search terms and inclusive dates, and any selectivity criteria imposed. Wherever possible, use primary resources, avoiding "Data on File", "Poster" or other unpublished references.

Technical briefs describe the development of a novel method or an improvement or noteworthy modification of an already existing technique or platform used in biomarker research. They should not be subdivided into titled sections but written in a continuous style. Technical briefs should not exceed 2500 words (including references as well as figure and table legends) and contain no more than three display elements (figures and tables).

Acknowledgements and Declaration of Interest sections

Acknowledgements and Declaration of interest sections are different, and each has a specific purpose. The Acknowledgements section details special thanks, personal assistance, and dedications. Contributions from individuals who do not qualify for authorship should also be acknowledged here.

Declarations of interest, however, refer to statements of financial support and/or statements of potential conflict of interest. Within this section also belongs disclosure of scientific writing assistance (use of an agency or agency/ freelance writer), grant support and numbers, and statements of employment, if applicable. For a more detailed list of points to include, please see "Declaration of Interest section" below.

Acknowledgements section

Any acknowledgements authors wish to make should be included in a separate headed section at the end of the manuscript preceding any appendices, and before the references section. Please do not incorporate acknowledgements into notes or biographical notes.

Declaration of Interest section

All declarations of interest must be outlined under the subheading „Declaration of interest". If authors have no declarations of interest to report, this must be explicitly stated. The suggested, but not mandatory, wording in such an instance is: The authors report no declarations of interest. When submitting a paper via ScholarOne Manuscripts, the „Declaration of interest" field is compulsory (authors must either state the disclosures or report that there are none). If this section is left empty authors will not be able to progress with the submission.

Please note: for NIH/Wellcome-funded papers, the grant number(s) must be included in the Declaration of Interest statement. For more information regarding DOI and NIH policy, please refer to our Author Resources page here .

References

References should be given in the Harvard style. Citation in the text is by author and date (Smith, 2001). The list of references appears alphabetically by primary author's last name. Examples:

Journal: Iyengar BS, Dorr RT, Remers WA. (2004). Chemical basis for the biological activity of Imexon and related Cyanaziridines. *J Med Chem* 47:218-23.

Book: Vyas SP, Khar RK. (2001). Targeted and controlled drug delivery. New Delhi, India: CBS Publisher and Distributor.

Contribution to a Book: Chandrasekaran SK, Benson H, Urquhart J. (1978). Methods to achieve controlled drug delivery: The biomedical engineering approach. In: Robinson JR, editor. Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems. New York: Marcel Dekker, 557-93.

Electronic Resources: Lin A-S, Shibano M, Nakagawa-Goto K, Tokuda H, Itokawa H, Morris-Natschke, SL, Lee K-H. (2007). Cancer Preventive Agents. 7. Antitumor-Promoting Effects of Seven Active Flavonolignans from Milk Thistle (*Silybum marianum*) on Epstein-Barr Virus Activation. *Pharm Biol* [Online] Available at:

<http://www.informapharmascience.com/doi/abs/10.1080/13880200701585592>. Accessed on 12 April 2009.

Periodical abbreviations should follow the style given by Index Medicus.

Tables

Tables should be used only when they can present information more efficiently than running text. Care should be taken to avoid any arrangement that unduly increases the depth of a table, and the column heads should be made as brief as possible, using abbreviations liberally. Lines of data should not be numbered nor run numbers given unless those numbers are needed for reference in the text. Columns should not contain only one or two entries, nor should the same entry be repeated numerous times consecutively. Tables should be grouped at the end of the manuscript on separate pages.

Illustrations

Illustrations (line drawings, halftones, photos, photomicrographs, etc.) should be submitted as digital files for highest quality reproduction and should follow these guidelines:

- 300 dpi or higher
- Sized to fit on journal page
- EPS, JPG, TIFF, or PSD format only
- Submitted as separate files, not embedded in the text
- Legends or captions for figures should be listed on a separate page, double spaced

For information on submitting animations, movie files and sound files or any additional information including indexes and calendars please click [here](#).

Colour figure charges are: US\$500 per article, a 15% service fee will be applied by Rightslink.

Notes on Style

General Style

Authors are asked to take into account the diverse audience of the journal. Please avoid the use of terms that might be meaningful only to a local or national audience, or provide a clear explanation where this is unavoidable. However, papers that reflect the particularities of a social and cultural system are acceptable. Some specific points on style follow:

1. Authors should write in clear, concise UK English. Language and grammar should be consistent with Fowler's English Usage; spelling and meaning of words should conform to Webster's Dictionary. If English is not your native language please ensure the manuscript has been reviewed by a native speaker. Please note: extensive rewriting of the text will not be undertaken by the editorial staff.
2. Latin terminology, including microbiological and species nomenclature, should be italicised.
3. Use standard convention for human and animal genes and proteins: italics for genes and regular font for proteins, and upper case for human products and lower case for animal products.
4. "US" is preferred to "American", "USA" to "United States", and "UK" to "United Kingdom".
5. Double quotation marks rather than single are used unless the "quotation is „within" another".
6. Punctuation of common abbreviations should adhere to the following conventions: "e.g."; "i.e."; "cf.". Note that such abbreviations should not generally be followed by a comma or a (double) point/period.
7. Upper case characters in headings and references should be used sparingly, e.g. only the first word of paper titles, subheadings and any proper nouns begin upper case; similarly for the titles of papers from journals in the references and elsewhere.
8. Apostrophes should be used sparingly. Thus, decades should be referred to as follows: "The 1980s [not the 1980's] saw ...". Possessives associated with acronyms (e.g. APU), should be written as follows: "The APU's findings that ..." but note that the plural is "APUs".
9. All acronyms for national agencies, examinations, etc., should be spelled out the first time they are introduced in text or references. Thereafter the acronym can be used if appropriate, e.g. "The work of the Assessment of Performance Unit (APU) in the early 1980s ..." and subsequently, "The APU studies of achievement ...", in a reference "(Department of Education and Science [DES] 1989a)".
10. Brief biographical details of significant national figures should be outlined in the text unless it is quite clear that the person concerned would be known internationally. Some suggested editorial comments in a typical text are indicated in the following with square brackets: "From the time of H. E. Armstrong [in the 19th century] to the curriculum development work associated with the Nuffield Foundation [in the 1960s], there has been a shift from constructivism to heurism in the design of [British] science courses".
11. The preferred local (national) usage for ethnic and other minorities should be used in all papers. For the USA, "African-American", "Hispanic" and "Native American" are used, e.g. "The African-American presidential candidate, Jesse Jackson ..."; for the UK, "Afro-Caribbean" (not "West Indian"), etc.
12. Material to be emphasised by italicisation in the printed version should be italicised in the typescript rather than underlined. Please use such emphasis sparingly.
13. Numbers in text should take the following forms: 300, 3000, 30 000 (not 30,000). Spell out numbers under 10 unless used with a unit of measure, e.g. nine pupils but 9 mm (do not use full stops (periods) within units). For decimals, use the form 0.05 (not .05, × 05 or 0× 05). "%" (not "per cent") should be used in typescripts.

14. Appendices should appear before the references section and after any acknowledgements section. The style of the title is shown by the following example:

“Appendix C: The random network generator”.

Figures and tables within appendices should continue the sequence of numbering from the main body of the text. Sections within appendices should be numbered, for example, C.1, C.2. Equations in appendices should be numbered, for example, (C 1), (C 2). If there is only one appendix, it is referred to as “the appendix” and not called “Appendix A”.

Abbreviations and nomenclature

For abbreviations and nomenclature, authors should consult the latest edition of the CSE Style Manual available from the Council of Science Editors, 60 Revue Drive, Suite 500 Northbrook, IL, 60062, USA.

Nomenclature for Oxidatively Damaged DNA

In light of the uncertainty concerning what is appropriate and accurate terminology when describing studies concerning the effects of oxidatively generated DNA damage, Biomarkers has adopted the following policy, based upon the recommendations of Cooke et al. (2010) *Chem. Res. Toxicol.* 23 (4): 705–707.

The term “oxidative DNA damage” should be avoided as it implies that the damage i.e. the lesion per se, is oxidative and thus capable of oxidising other substrates. In the interests of accuracy this should be replaced with such terms as „oxidatively damaged DNA“, or „oxidatively generated DNA damage“, to describe the consequence of the interaction of reactive oxygen species with DNA.

The oxidatively generated nucleobase which has received, by far, the most attention is 8-oxo-7,8-dihydroguanine (which should be abbreviated as 8-oxoGua). Adoption of this nomenclature is based upon International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) states that, based upon current nomenclature, the (di)hydro- prefix is non-detachable, meaning that it is always immediately before the parent name [Panico R, Powell WH and Richer J-C, Eds. (1993) *A Guide to IUPAC Nomenclature of Organic Compounds*, recommendations, Oxford: Blackwell Scientific Publications]. The corresponding 2'-deoxyribonucleoside of 8-oxoGua is 8-oxo-7,8-dihydro-2'-deoxyguanosine, abbreviated as 8-oxodG or 8-oxodGuo. For completeness, it is worth noting that the ribonucleoside equivalent is 8-oxo-7,8-dihydroguanosine, abbreviated as 8-oxoGuo.

Mathematics

Please click [here](#) for more information on the presentation of mathematical text.

Statistics

Guidelines are given in Lovell, D.P. (2012) *BiOMARKERS* 17(3) 193-200. In brief, BiOMARKERS expects authors to be aware of the appropriate statistical analyses that should be used in their specific field of research and prepare their submissions accordingly. A statistical analysis plan should be available for the studies reported and, if required, all relevant data and analyses must be accessible to reviewers. Authors should indicate how datasets used in the analyses will be maintained and be willing to make their data available to other researchers.

The author(s) responsible for statistical design and analysis must be indicated as a point of contact on the title page by the # symbol. If a statistician was employed for the analysis, but is not an author, they must be identified and have agreed that their name and email address will appear in the acknowledgements section.

Footnotes

Footnotes are not to be used except for designation of the corresponding author of the paper or current address information for an author (if different from that shown in the affiliation). Information concerning grant support of research should appear in a separate declaration of interest section at the end of the paper. Acknowledgements of the assistance of colleagues or similar notes of appreciation belong in a separate Acknowledgements section.

Footnotes to tables should be typed directly below the table and are indicated by the following symbols: * (asterisk or star), † (dagger), ‡ (double dagger), ¶ (paragraph mark), § (section mark), || (parallels), # (number sign). Reinitialise symbol sequence within tables.

Editorial Policies

Authorship According to the International Committee on Medical Journal Ethics (ICMJE), an author is defined as one who has made substantial contributions to the conception and development of a manuscript. Informa Pharmaceutical Science adheres to the ICMJE guidelines (<http://www.icmje.org/#author>), which state that “authorship credit should be based on all of the following:

1) substantial contributions to conception and design, acquisition of data, or analysis and interpretation of data; 2) drafting the article or advising it critically for important intellectual content; and 3) final approval of the version to be published”¹. All other contributors should be listed as acknowledgements. ¹ Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical Journals: Writing and Editing for Biomedical Publication. Available at: <http://www.icmje.org/>

All submissions are expected to comply with the above definition. Changes to the authorship list after submission will result in a query from the publisher requesting written explanation.

Submission

Biomarkers considers all manuscripts on the strict condition that they have been submitted only to Biomarkers, that they have not been published already, nor are they under consideration for publication or in press elsewhere. Informa Pharmaceutical Science adheres to the Code of Conduct and Best Practice Guidelines set forth by the Committee on Publication Ethics (COPE). As per these guidelines, failure to adhere to the above conditions will result in the editor and Informa publishing an appropriate correction, a statement of retraction, or enacting a withdrawal of the article. In extreme cases, offending authors may be banned from submitting to Informa Pharmaceutical Science journals in the future, or reported to their institution’s ethics committee.

Peer Review

All manuscripts will be subjected to confidential peer review by experts in the field and, on the basis of reviewers’ feedback, papers will be accepted unconditionally, accepted subject to revision or rejected.

Ethics and Consent

- Do not use patients’ names, initials, or hospital numbers, especially in illustrative material. Identifying information should not be published in written descriptions, photographs, and pedigrees unless the information is essential for scientific purposes and the patient (or parent or guardian) gives written informed consent for publication. Informed consent for this purpose requires that the patient be shown the manuscript to be published.

- Papers including animal experiments or clinical trials must be conducted with approval by the local animal care or human subject committees, respectively (see below).

- To comply with FDAAA legislation, Informa Pharmaceutical Science requires trial registration as a condition of publication for all studies involving clinical trials. Trial registration numbers should be included in the abstract, with full details provided in the methods section.

- All manuscripts, except reviews, must include a statement in the Introduction or Methods section that the study was approved by an Investigational Review Board (Human Studies Committee or Ethics Committee or Animal Care and Use Committee), if applicable. Authors who do not have formal ethics review committees should include a statement that their study followed principles in the Declaration of Helsinki (<http://www.wma.net/e/policy/b3.htm>).

- When a product has not yet been approved by an appropriate regulatory body for the use described in the manuscript, the author must specify that the product is not approved for the use under discussion or that the product is still under investigation.

Further information on Ethics and Consent can be found by clicking here

Copyright and Permissions

It is a condition of publication that authors assign copyright or license the publication rights in their articles, including abstracts, to Informa UK Ltd. This enables us to ensure full copyright protection and to disseminate the article, and the Journal, to the widest possible readership in print and electronic formats as appropriate. Authors may, of course, use the article elsewhere after publication without prior permission from Informa UK Ltd., provided that acknowledgement is given to the Journal as the original source of publication, and that Informa Pharmaceutical Science is notified so that our records show that its use is properly authorised. Authors retain a number of other rights under the Informa UK Ltd. rights policies documents.

Authors are required to sign an agreement for the transfer of copyright to the publisher. All accepted manuscripts, artwork, and photographs become the property of the publisher. A copyright agreement form can be downloaded by corresponding authors of accepted manuscripts with proofs. This should be signed and returned to Informa Pharmaceutical Science.

Authors are themselves responsible for obtaining permission to reproduce copyright material from other sources.

Further information on Permissions can be found by clicking here.

Declaration of Interest

It is the policy of all Informa Pharmaceutical Science, to adhere in principle to the Conflict of Interest policy recommended by the ICMJE. All authors must disclose any financial and personal relationships with other people or organizations that could inappropriately influence (bias) their work. It is the sole responsibility of authors to disclose any affiliation with any organization with a financial interest, direct or indirect, in the subject matter or materials discussed in the manuscript (such as consultancies, employment, paid expert testimony, honoraria, speakers bureaus, retainers, stock options or ownership, patents or patent applications or travel grants) that may affect the conduct or reporting of the work submitted. All sources of funding for research are to be explicitly stated. If uncertain as to what might be considered a potential conflict of interest, authors should err on the side of full disclosure.

If there are no declarations, authors should explicitly state that there are none. This must be stated at the point of submission (within the manuscript, after the main text, under a subheading "Declaration of interest", and within the appropriate field on the journal's ScholarOne Manuscripts site). Manuscript submission cannot be completed unless a declaration of interest statement (either stating the disclosures or reporting that there are none) is included.

This will be made available to reviewers and will appear in the published article. If any potential conflicts of interest are found to have been withheld following publication, the journal will proceed according to COPE guidance. The intent of this policy is not to prevent authors with any particular relationship or interest from publishing their work, but rather to adopt transparency such that reviewers, editors, the publisher, and most importantly, readers can make objective judgements concerning the work product.

Additional Information

Proofs

Usual practice will involve corresponding authors receiving email notification with a password and web address from which to download a PDF. Hard copies of proofs will not be mailed. To avoid delays in publication, corrections to proofs must be returned within 48 hours, by electronic transmittal, fax or mail. Authors will be charged for excessive correction at this stage of production. If authors do not return page proofs promptly, the Publisher reserves the choice to either delay publication to a subsequent issue or to proceed to press without author corrections. The Publisher reserves the right to proceed to press without submitting page proofs to the author.

Reprints

Each corresponding author will receive a PDF file of the final version of their article. Reprints of individual articles are available for order at the time authors review page proofs. A discount on reprints is available to authors who order before print publication. Copies of the journal can be purchased at the author's preferential rate of \$25/£15 per copy.

Further information on Reprints can be found by clicking [here](#).

Colour figure charges

Any figure submitted as a colour original will appear in colour in the Journal's online edition free of charge. Print copy colour reproduction will only be considered on condition that authors bear the associated costs. The charge for the first page with colour is US \$1000/£500, each subsequent page is charged at US \$500/£250. There are no charges for non-colour pages. Contact the publisher

Click [here](#) for contact details for the Publisher.

6.4 Anexo 4: Normas da Revista Científica BioTechniques.

A ser submetido o artigo intitulado: Fishbone technique: Quality of the cytological distension with impact on diagnosis

Instructions for Authors (Benchmarks)

MISSION AND SCOPE

BioTechniques is a peer-reviewed, open-access journal dedicated to publishing original laboratory methods, related technical tools, and methods-oriented review articles that are of broad interest to professional life scientists, as well as to scientists from other disciplines (e.g., chemistry, physics, computer science) interested in life science applications for their technologies. Since 1983, *BioTechniques* has been the leading peer-reviewed journal for methods-related research. All manuscripts submitted to *BioTechniques* are first evaluated on the basis of scientific quality, originality, appropriateness, contribution to the field, and style. Suitable manuscripts are then subject to rigorous, fair, and rapid peer review.

BioTechniques is dedicated to serving the interests of both authors and readers. In accordance with this policy, no submission, publication, or page fees, or color charges, are levied. The journal is committed to broad dissemination of its content and enlists advertiser support to provide print and online versions free of charge to scientists based in North America, Europe, Asia, and the Middle East. The journal maintains its longstanding policy of accepting manuscripts on the basis of scientific merit alone. Reports describing innovative new methods, substantive modifications to existing methods, or innovative applications of existing methods to new models or scientific questions are appropriate subject matter for the journal. Descriptions of technical tools that facilitate the design or performance of experiments or data analysis, such as software and simple laboratory devices, are also welcome.

PEER-REVIEWED ARTICLE TYPES

BENCHMARKS (a maximum of 3 journal pages, 1000 words*, 1–2 figures, and 15 references; no subsections) are peer-reviewed short communications describing new methods or brief but substantive modifications of existing methods. Authors must demonstrate either significantly improved results compared to standard protocols or equivalent results with substantial time or cost savings. Benchmarks should contain a short 3–4 sentence Abstract (150 words). In addition, a 1–2 sentence Method Summary (focusing only on the method itself and not supporting data) is also required at submission. Authors are encouraged to provide brief enumerated protocols using the *BioTechniques* template (p. 15) or other appropriate supplementary materials when necessary.

MANUSCRIPT

Complete details on the manuscript style and conventions are provided in the **Manuscript Format** section (p. 4). In brief, manuscript text must be submitted as a Microsoft Word document and should include, in a single file in the order shown below, the following sections:

	Benchmark	Report	Review/ Practical Guide	Letter to the Editor
Title Page	√	√	√	√
Abstract	√	√	√	NA
Method Summary	√	√	NA	NA
Introduction	combined—no subheads	√	as appropriate	combined—no subheads
Materials and Methods		√	NA	
Results		combined—no subheads	NA	
Discussion			as appropriate	
Author Contributions*	√	√	√	√
Acknowledgments	√	√	√	√
Competing Interests	√	√	√	√
References	√	√	√	√
Tables	as appropriate	as appropriate	as appropriate	as appropriate
Figure Legends	as appropriate	as appropriate	as appropriate	as appropriate

* Note: This section should not be included in an article with only one author.

FIGURES

Each figure must be submitted as a separate file and should not be embedded in the manuscript text. See figure specifications in Appendix A (p. 10).

SOFTWARE

Software and associated documentation should be available on the author's web site for editor and reviewer access at the time of manuscript submission. Authors are required to guarantee the availability of software and documentation for three full years following publication.

SUPPLEMENTARY MATERIAL

Any supporting information for online publication only, including figures, tables, movie files, or supporting data sets, should be uploaded with the submission as separate files.

PROTOCOL All authors are encouraged to submit a detailed working protocol accompanying the original submission. See protocol specifications in Appendix C (p. 13).

ADDITIONAL MATERIAL FOR REVIEW In order to facilitate the review process, authors should provide all necessary additional information (e.g., reprints, related manuscripts under review or impress, etc.) at the time of submission.