

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

Daniele Luzia dos Reis Schneider

**ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E
CLINICOPATOLÓGICO DE
PACIENTES JOVENS COM CÂNCER
DE MAMA.**

UFCSPA
Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

**Porto Alegre
2013**

Daniele Luzia dos Reis Schneider

Estudo Imunoistoquímico e Clínicopatológico de Pacientes Jovens com Câncer de Mama.

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Patologia da Fundação Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre como requisito para a obtenção do grau de Mestre.

Orientador: Dra. Adriana Vial Roehe
Co-orientadora: Andrea Pires Souto Damin

**Porto Alegre
2013**

Catlogação na Publicação

Schneider, Daniele

ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO E CLINICOPATOLÓGICO DE
PACIENTES JOVENS COM CÂNCER DE MAMA. / Daniele
Schneider. -- 2013.

59 p.: il., graf., tab.; 30 cm.

Dissertacao (mestrado) -- Universidade Federal de
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de
Pós-Graduação em Patologia, 2013.

"Orientador(a): Adriana Roehe ; Coorientador(a):
Andrea Damin".

1. Câncer de mama em pacientes jovens. I. Título.

Agradecimentos

À minha orientadora, Dra. Adriana Vial Roehe, pelo apoio, paciência e extrema competência na orientação científica.

À minha co-orientadora, Dra. Andréa Pires Souto Damin, pelo auxílio e dedicação.

Aos meus pais, Marisa Helena Schneider e Roque Schneider, pelo amor e educação que me proporcionaram.

Aos meus irmãos, pela amizade e amor.

À minha sobrinha, Izadora, unicamente pelo fato de existir.

Às histotécnicas do Laboratório de Patologia do Programa de Pós-graduação da UFCSPA, Rosalva Meurer e Teresinha Stein, pelo empenho em tornar possível a metodologia do trabalho.

À secretária do Programa de Pós-Graduação em Patologia da UFCSPA, Maristela Pasin, pela dedicação e profissionalismo.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	7
1.1. Epidemiologia do câncer de mama	7
1.2. Fatores de risco	8
1.3. O câncer de mama em mulheres jovens	9
1.4. Revisão da literatura	11
1.4.1. Fatores prognósticos e preditivos no câncer de mama	11
1.4.2. Perfil imunoistoquímico no câncer de mama	14
1.4.3. Vimentina e 34βE12 no câncer de mama	16
1.4.4. BRCA1 e sua relação com o carcinoma de mama	17
1.4.5. Ki67	18
1.5. Referências bibliográficas	21
2. OBJETIVOS	28
3. ARTIGO CIENTÍFICO REDIGIDO EM INGLÊS	29
4. ANEXOS	50
4.1. Protocolo da coleta de dados	50
4.2. Estadiamento patológico	51
4.3. Graduação histológica	53
4.4. Procedimentos imunoistoquímicos	54
4.5. Pareceres dos Comitês de Ética	56

Lista de abreviaturas utilizadas

BRCA1: Gene supressor tumoral

CK: citoqueratina

DNA: ácido desoxirribonucléico

EGFR: receptor do fator de crescimento epidérmico

EMT: Transição epitélio mesenquimal

HER2: receptor do fator de crescimento epidérmico humano; produto do proto-oncogene c-erb-B2

INCA: Instituto Nacional do Câncer

RE: receptor de estrogênio

RP: receptor de progesterona

TMA: Tissue microarray; microarranjo tecidual

TNM: sistema de estadiamento tumoral TNM

TRH: Terapia de reposição hormonal

Resumo da Dissertação

Introdução: O câncer de mama é um dos tumores malignos mais comuns entre as mulheres. Estudos recentes evidenciaram um aumento da incidência da doença em pacientes com idade inferior a 35 anos. Nesta faixa etária, segundo a literatura, a neoplasia possui comportamento biológico mais agressivo. **Objetivo:** Analisar as características clinicopatológicas e imunoistoquímicas do carcinoma de mama em pacientes com idade inferior a 35 anos e a partir dos 45 anos. **Métodos:** Estudo prospectivo que analisou pacientes atendidas no Serviço de Mastologia do Hospital Fêmeina de Porto Alegre, entre julho de 2008 a outubro de 2011. Sete pacientes com diagnóstico de carcinoma de mama e idade inferior a 35 anos e 130 pacientes a partir de 45 anos foram testadas para os marcadores BRCA1, vimentina, 34βE12 e Ki67. Dados clínicos e anatomopatológicos foram comparados com os marcadores imunoistoquímicos e submetidos à análises estatística. **Resultados:** Pacientes com idade inferior a 35 anos de idade apresentaram maior frequência de grau histológico III em relação às mais velhas (42,9 *versus* 24,2%). A expressão de HER2 foi maior nas jovens (42,9% *versus* 15,7%), assim como alterações no BRCA1 (57,1% *versus* 27,1%). A expressão de Ki67 (>14%) apresentou relação proporcional com o aumento do grau histológico (P = 0,04) e estadiamentos clínicos mais avançados da doença (P = 0,03). O fenótipo triplo negativo, considerado um dos mais agressivos, apresentou alta expressão de ki67 (P<0,001). Observou-se ainda diminuição da sobrevida global de pacientes com alta expressão deste marcador (P=0,029). Pacientes jovens apresentaram menor sobrevida global em relação às mais velhas

($P=0,019$). **Conclusão:** Não observamos aumento da incidência da doença entre as jovens, no entanto, estas pacientes apresentaram diminuição da sobrevida global em relação às mais velhas, fortalecendo as evidências de desfecho clínico desfavorável nesta faixa etária. A expressão aumentada de Ki67 mostrou relação direta com os parâmetros clinicopatológicos associados ao aumento da agressividade do tumor e diminuição da sobrevida, corroborando o papel deste marcador como ferramenta prognóstica no carcinoma de mama.

1. INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais letal em mulheres (INCA, 2012). Dados do Instituto Nacional do Câncer revelam que o número de casos novos de câncer de mama esperado para o Brasil em 2012 é de 52.680, com um risco estimado de 81,07 casos a cada 100.000 mulheres na região Sul.

A incidência da doença varia de acordo com cada região do país. As populações heterogêneas, os diferentes fatores de risco e exposições contribuem para essa variação (Koifman e Koifman, 2003).

Porto Alegre é a cidade com a maior incidência de câncer de mama do Brasil, com risco estimado de 125 casos a cada 100 mil habitantes. Na Europa, a incidência anual da doença é de 110 casos para 100 mil mulheres em todas as faixas etárias (Vetter e Rochlitz, 2012).

A incidência de carcinoma mamário nos Estados Unidos varia de acordo com a etnia e a raça. Mulheres com idade inferior a 35 anos e de raça negra, possuem o dobro da incidência da doença e maior mortalidade, quando comparadas com mulheres jovens de raça branca (Althius e Brogman, 2003; Shavers e cols., 2003). A média da idade ao diagnóstico foi de 61 anos nos Estados Unidos no período de 2006 – 2010, sendo que mais de 40% das mulheres foram diagnosticadas com idade superior a 65 anos (SEER, 2012).

Os países orientais, que anteriormente apresentavam baixa incidência de câncer de mama, observam um aumento do número de casos da doença, seguindo uma tendência mundial. Na China, a doença está se manifestando aos 40 anos de idade, mais precoce do que nos países ocidentais (Kwong e cols., 2008).

No ano de 2008, a Sérvia apresentou a maior taxa de mortalidade por câncer de mama entre todos os países europeus (Mihajlović e cols.,2013).Para o ano de 2013, a estimativa na União Européia é que diminua a mortalidade da doença. Malvezzi e cols.(2013) acreditam que em poucos anos, o câncer de pulmão ultrapassará o câncer de mama e se tornará a 1ª causa de morte por tumores em mulheres.

1.2 Fatores de risco para o câncer de mama

A incidência da doença aumenta com a idade, sendo mais prevalente após os 50 anos. Nesta faixa etária, o câncer de mama é nove vezes mais freqüente do que em pacientes muito jovens (Dutra e cols., 2009).

Muitos dos fatores de risco para o carcinoma mamário são comuns a todas faixas etárias, incluindo o aumento da idade, raça negra, história familiar, maior idade na primeira gestação, menarca precoce e sedentarismo. Em mulheres jovens, o uso de contraceptivos orais, tabagismo e a exposição à radiação, mais especificamente para o tratamento da doença de Hodgkin, pode aumentar o risco para o desenvolvimento da doença (Yankaskas,2005).

Alguns autores atribuem que a mama densa seja um dos fatores de risco para o câncer de mama, mas determinantes da densidade da mama em mulheres jovens permanecem largamente desconhecidos (Dorgan e cols., 2012).

Mulheres que apresentam histórico familiar de câncer de mama possuem maior chance de desenvolver a doença, assim como as pacientes que apresentam mutações nos genes BRCA1 e BRCA2, tem risco aproximado de 80% (Narod, 2011).

Estudos sobre fatores de risco para a doença, associam sobrepeso e a obesidade com carcinoma de mama em mulheres pós menopáusicas, no entanto, estas associações não estão claramente elucidadas. (Parkin e Boyd,2011; Giles e cols.,2012).

A estimulação estrogênica durante a terapia de reposição hormonal (TRH) pode aumentar o risco para o desenvolvimento da doença, principalmente com a utilização de formulações combinadas com estrógeno e progesterona (Brinton e cols.,2008; Narod.,2011).Após a interrupção do tratamento, este risco diminui, o que sugere que os tumores de mama hormônio dependentes regredem quando a estimulação hormonal é removida (Narod, 2011).

1.3 O câncer de mama em mulheres jovens

Embora a maioria dos estudos classifique "pacientes jovens" na faixa entre 35 e 40 anos de idade, não há um consenso mundial para a definição da idade "jovem" no câncer de mama (Vostakolaei e cols.,2012).

Em mulheres com idade até 35 anos, a incidência da doença varia de 2 a 5% (Gonzalez-Angulo e cols., 2005; Hong-Sing Chen e cols., 2008).

Alguns autores (Kwong e cols.,2008; Robles-Castillo e cols.,2011; Znati e cols.,2012) acreditam que, em pacientes jovens, o tumor apresenta características clinicopatológicas heterogêneas em relação às pacientes mais velhas. Segundo um estudo publicado por Znati e cols. (2012), que avaliou o perfil da apresentação da doença em pacientes com menos de 35 anos, houve uma tendência da neoplasia apresentar-se como um tumor de mau

prognóstico, de alto grau histológico, ausência de expressão dos receptores hormonais e com fenótipo triplo-negativo.

Pronzato e cols. (2011) estudaram o padrão histológico e imunoistoquímico (expressão de receptores de estrogênio e de progesterona e superexpressão de HER2 e Ki67) de carcinomas de mama em pacientes estratificadas de acordo com a idade. As mulheres com menos de 35 anos representaram 7,7% da amostra e apresentaram tumores com ausência da expressão de receptores hormonais e alto índice de Ki67. Os pesquisadores concluíram que a idade seria um fator prognóstico para a doença.

Segundo El Saghir e cols. (2006); Vostakolaei e cols., (2012), a literatura é controversa quando descreve a idade como fator prognóstico independente. Rapiti e cols. (2005) não evidenciaram efeito significativo da idade na avaliação da sobrevida de pacientes jovens, mesmo apresentando tumores com características clínicas mais agressivas. Em estudo publicado por Anders e cols. (2008), que avaliou o fator idade na apresentação da doença em pacientes jovens, houve uma tendência da neoplasia apresentar-se como um tumor de mau prognóstico, de alto grau e com maior comprometimento linfonodal.

Partridge e cols. (2012) analisaram o atraso no diagnóstico em relação ao estágio da doença em mulheres com menos de 40 anos. O estudo concluiu que a idade não é um fator preditor independente de atraso no diagnóstico e que a doença se manifestou em estágio avançado nessas mulheres.

Gnerlich e cols. (2009) analisaram a mortalidade em mulheres com câncer de mama com menos de 40 anos em comparação com pacientes mais velhas. Os achados do estudo revelaram que mulheres mais jovens apresentam tumores

com características de maior agressividade, tais como; alto grau histopatológico, ausência de expressão de receptores hormonais e maior comprometimento linfonodal. Conforme os autores, essas variáveis atribuíram maior mortalidade nas pacientes com doença em estágio inicial.

Morrison e cols. (2012) avaliaram a expressão de marcadores imunoistoquímicos em relação à idade e o subtipo molecular de câncer de mama em mulheres com idade igual ou menor que 40 anos, em comparação com pacientes mais velhas. O estudo mostrou que o fenótipo triplo negativo e o comprometimento linfonodal foi mais freqüente em pacientes jovens, refletindo em tumores de pior prognóstico.

Nosso estudo se destina a comparar características clinicopatológicas do carcinoma de mama entre mulheres com menos de 35 anos e a partir do 45, associando marcadores imunoistoquímicos de mau prognóstico (BRCA1, Ki67, vimentina e 34 β E12)

1.4 REVISÃO DA LITERATURA

1.4.1. Fatores prognósticos e preditivos no câncer de mama

Os carcinomas de mama são tumores heterogêneos com diferentes apresentações genóticas e fenotípicas (Markiewicz e cols., 2012). O prognóstico da doença está relacionado a uma série de fatores, incluindo o estadiamento TNM, o grau histológico, e o comprometimento linfovascular (Rosai e Ackerman, 2004).

O estadiamento TNM foi desenvolvido na década de 50 e continua a ser utilizado na prática clínica até os dias de hoje. Mesmo sofrendo atualizações, o

grande desafio desta classificação é acompanhar a rápida evolução da compreensão biológica dos tumores (Veronesi e cols., 2009)

Park e cols. (2011) acreditam que o estadiamento TNM pode não ser tão eficaz como um indicador de prognóstico para todos os subtipos de câncer de mama, especialmente para os tumores com fenótipo triplo negativo, uma vez que o atual sistema de estadiamento não contempla as diferenças biológicas e moleculares dos tumores.

Em um estudo, Zurrída e Veronesi (2011) propõem uma mudança na classificação TNM. Os autores defendem que descrevendo o tamanho exato do tumor, evitariam discrepâncias dentro do mesmo grupo e informariam um dado mais fidedigno. A descrição dos linfonodos comprometidos poderia ser associada em relação ao número total removido. Além disto, sugerem a indicação do sítio metastático na variável "M" e a remoção das neoplasias *in situ* desta classificação, uma vez que estes tumores não são capazes de produzir metástases.

A presença de metástases nos linfonodos axilares é um dos fatores mais importantes no estadiamento e avaliação prognóstica de pacientes com câncer de mama (Colleoni e cols., 2006 e Ponzzone e cols., 2007).

Rosa - Mendoza e cols. (2013) estudaram preditores de metástases à distância em pacientes com câncer de mama inicial, em relação às características clinicopatológicas. O estudo revelou que o comprometimento linfonodal associado ao estágio e tamanho tumoral foram os principais preditores da ocorrência de metástases à distância. Outro dado do estudo foi que a superexpressão de HER2, considerado um fator prognóstico desfavorável, isoladamente não foi preditor metastático.

Um dos fatores prognósticos bem estabelecidos no câncer de mama é o grau histológico, o qual representa a avaliação morfológica das características biológicas dos tumores, sendo um importante parâmetro no comportamento clínico da doença e de valor prognóstico para as pacientes (Sotiriou e cols.,2006 e Rakha e cols.,2010).

Os receptores de estrógeno e progesterona e a amplificação do receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2), são marcadores consolidados no câncer de mama (Ferguson e cols., 2013). Os receptores de estrógeno e progesterona são responsáveis pela proliferação do epitélio normal da mama em resposta à liberação hormonal. Quando expressos no tecido tumoral, geram uma boa resposta ao tratamento adjuvante com a utilização de tamoxifeno ou fármacos inibidores da aromatase (Millar e cols.,2011).

O gene HER2 codifica uma proteína transmembranar com atividade tirosina-quinase. Sua amplificação é observada em aproximadamente 20% dos carcinomas da mama invasivos, estando associado com prognóstico desfavorável (Gajria e Chandarlapaty.,2011).

Este marcador atua ainda como fator preditivo. O trastuzumab é um anticorpo monoclonal, utilizado como opção terapêutica para as pacientes que apresentam amplificação da proteína (Nahta e cols.,2006). Em combinação com quimioterapia citotóxica, o trastuzumab revolucionou o tratamento e os resultados clínicos da doença com a utilização da terapia alvo. Apesar do sucesso notável, as taxas de resposta geralmente tem duração limitada, em média, 1 ano (Nahta,2012).

1.4.2. Perfil imunohistoquímico no câncer de mama

A heterogeneidade tumoral dos carcinomas mamários é um dos maiores desafios para o tratamento da doença. A incapacidade de considerar as características biológicas destes tumores favorece a limitação da classificação morfológica isolada (Sorlie e cols., 2003; Sorlie, 2004). O estudo do perfil molecular dos carcinomas mamários gerou um importante avanço a partir da identificação dos diferentes perfis de expressão gênica, introduzido por Perou e cols. (Diaz e cols, 2007). Com a utilização da técnica de microarranjo tecidual (TMA – tissue microarray) os carcinomas mamários foram subdivididos em cinco grupos: fenótipo luminal, superexpressão do HER2, basal, normal breast-like e triplo negativo.

O subtipo molecular luminal ainda é dividido em duas classes: luminal A e luminal B. O tipo luminal A representa cerca de 60% dos casos de carcinomas de mama. Apresentam imunopositividade para RE/RP, baixo grau histológico e negatividade para amplificação ou superexpressão de HER2. Os fármacos antiestrogênicos são as terapias alvo-específicas utilizadas no tratamento sistêmico (Weigel e Dowsett., 2010). Além disso, Goldhirsch e cols. (2011) associam uma expressão de Ki67 inferior a 14% para o fenótipo luminal A.

O fenótipo luminal B é caracterizado pela baixa expressão dos receptores hormonais e alto índice proliferativo, com Ki67 superior a 14%. São considerados tumores de pior prognóstico quando comparados com os luminais A. (Goldhirsch e cols. 2011)

O fenótipo HER2 possui elevada expressão da oncoproteína HER2 e negatividade para receptores hormonais. Na maioria dos casos, são

caracterizados por alto grau histológico e pior prognóstico (Maambo e Loffe, 2009).

Tumores classificados como triplo-negativos são caracterizados pela ausência de expressão de RE/RP e de HER2. A falta de um receptor alvo estabelecido neste grupo reduz as opções terapêuticas e continua a ser um desafio no tratamento destas pacientes (Irvin e Carey, 2008). Estudo recente sugere a existência de ligações entre o fenótipo triplo negativo e a transição epitelial-mesenquimal (Yamashita e cols., 2013).

O fenótipo basal apresenta negatividade para os receptores hormonais e HER2 e expressa marcadores de células basais, como a citoqueratina 5 ou 5/6, 34 β E12 e/ou EGFR. Tumores com este perfil são de difícil manejo terapêutico, uma vez que não respondem ao trastuzumabe e às terapias hormonais (Irvin and Carey., 2008).

O subtipo normal-like apresenta elevada expressão de genes comuns às células epiteliais normais da mama, às células adiposas e a outras células do estroma. Apresenta negatividade para os marcadores tumorais usuais e possivelmente representa apenas uma contaminação com o tecido mamário normal durante a realização das análises de perfil de expressão gênica (Parker e cols., 2009., Weigel e cols., 2010).

Cancer Genome Atlas Network (2012) sugeriu uma nova classificação para o carcinoma mamário, redividindo a doença nas seguintes classes: Luminal A, Luminal B, HER2 amplificado e basal. A descoberta biológica de que os quatro principais subtipos são originados por diferentes subconjuntos de anormalidades genéticas e epigenéticas, gerou a hipótese de que a plasticidade e heterogeneidade ocorre dentro, e não entre os subtipos.

Reyal e cols. (2011) analisaram a relação entre os subtipos moleculares e a positividade para o linfonodo sentinela em pacientes com carcinoma de mama em fase inicial. O estudo demonstrou que o subtipo molecular é determinante para o processo de metástase axilar e à distância. A interação entre positividade para RE e HER2 foi preditora de positividade para linfonodo sentinela, quando comparada com expressão de RE isolada.

1.4.3. Vimentina e 34βE12 no câncer de mama

A vimentina é uma proteína de filamento intermediário, com um papel-chave na transição epitélio – mesenquimal (EMT) (Lehtinen e cols, 2012). Sua expressão está associada à invasividade tumoral e à resistência quimioterápica. As teorias biológicas para explicação consistem na derivação histogenética de células mioepiteliais e da transição epitelial-mesenquimal (EMT), refletindo no estágio final de desdiferenciação do tumor de mama (Korsching e cols., 2005). Embora seja utilizada como marcador de EMT, que ocorre durante o processo de embriogênese e metástase, as implicações funcionais da expressão de vimentina não estão claramente elucidadas (Mendez e cols., 2010).

Yamashita e cols. (2013) analisaram o prognóstico de 90 pacientes com tumor de mama e fenótipo triplo-negativo. O estudo revelou que a elevada expressão de vimentina contribuiu para um pior prognóstico nessas pacientes. Vora e cols. (2009) avaliaram o prognóstico de pacientes com câncer de mama através de marcadores imunoistoquímicos, como a vimentina e citoqueratinas. O estudo mostrou que existe uma associação entre

positividade para HER2, estágio avançado e recorrência da doença, ou metástase com a positividade para vimentina.

Ulirsch e cols. (2013) acreditam que a metilação da vimentina está associada à diminuição da sobrevida global, independente da raça, estágio tumoral, subtipo, *status* linfonodal ou doença metastática, indicando ser um possível fator prognóstico de caráter independente.

A 34 β E12 é uma citoqueratina (CK) de alto peso molecular que, na mama normal, possui afinidade por células basais e mioepitelia da camada externa. A expressão de CKs basais está associada a neoplasias com o fenótipo desfavorável, de tipo triplo-negativo (TN) (Alshareeda e cols., 2013).

Chen e cols. (2008) avaliaram a expressão de citoqueratinas basais CK14, CK5 / 6 e 34 β E12 em pacientes com menos de 35 anos e diagnóstico de câncer de mama invasivo. O estudo revelou uma associação inversa entre a expressão das citoqueratinas CK14 e CK5/6 com a expressão de receptores hormonais. A positividade para 34 β E12 foi correlacionada com maior tamanho tumoral.

1.4.4. BRCA1 e sua relação com o carcinoma de mama

O BRCA1 é um gene multi-funcional, envolvido na regulação do DNA, reparação de danos e no controle do ciclo celular (Huen e cols, 2010). Mutações herdadas nos genes BRCA1 e BRCA2 são responsáveis por 5 a 10% dos casos de câncer de mama (Nicoletto e cols, 2001).

Tumores hereditários e esporádicos relacionados a mutações no BRCA1 possuem fenótipo mais agressivo, alto grau histológico, estadiamento avançado, comprometimento axilar, ausência de expressão de receptores

hormonais, superexpressão de HER-2, altas taxas de ki67 e expressão de citoqueratinas basais (Brekelmans e cols., 2007; Atchley e cols., 2008; Rakha 2010; Lagos-Jaramillo 2011).

Alguns autores demonstraram que alterações na expressão imunohistoquímica do BRCA1 podem auxiliar na identificação de mutações do gene. (Vaz 2007; Brakeleer 2007).

Em estudo realizado por Roehe (2012) em pacientes com carcinoma esporádico da mama, foi observado que a presença de alteração da imunexpressão do BRCA1 (migração da expressão da proteína do núcleo para o citoplasma, decorrente de mutação no gene) é proporcional ao decréscimo da idade. Pacientes com menos de 35 anos tiveram 20% a mais de perda de expressão nuclear de BRCA1, em relação a mulheres com mais de 55 anos.

Segundo estudo publicado por Lee (2002), que avaliou a diferença na biologia tumoral entre pacientes jovens e mais velhas, as pacientes com menos de 35 anos apresentaram maior tamanho tumoral, alta taxa de proliferação e perda de expressão nuclear de BRCA1, quando comparadas às pacientes mais velhas.

Zhang e cols.(2012) observaram que pacientes com menos de 35 anos possuíam alteração na imunexpressão do BRCA1, estadiamento avançado e maior ocorrência de metástases linfonodais, em relação a pacientes com mais de 60 anos.

1.4.5.Ki67

Desde a sua descoberta no início dos anos 80, há um interesse no Ki67 como marcador de proliferação celular em câncer de mama, sendo geralmente utilizado como complemento para os sistemas de classificação que incluem a contagem mitótica (Luporsi e cols., 2011). O Ki67 está presente em todas as células em proliferação, exceto na fase de G0 (Cheang e cols.,2009). Segundo Nishimura e cols. (2010) a expressão do Ki67 pode prever o tempo de recorrência da doença.

O Ki67 tem sido sugerido como um promissor marcador preditivo e prognóstico no carcinoma de mama no entanto, a grande variabilidade de pontos de corte pode resultar em diferentes desfechos clínicos (Denkert e cols., 2013).

A agressividade do câncer de mama pode ser correlacionada com o estado de proliferação das células tumorais, através das análises do grau tumoral e expressão do Ki67 (Haroon e cols.,2013)

A expressão do Ki67 na análise da resposta patológica completa após quimioterapia neoadjuvante, contribui na elucidação da resposta à droga e seu efeito sobre o prognóstico (Fasching e cols.,2011). No entanto, estudos recentes têm indicado que a resposta à quimioterapia neoadjuvante e o impacto prognóstico sobre a resposta patológica completa diferem entre os subtipos moleculares no carcinoma de mama (Yoshioka e cols.,2013).

Vasseur e cols. (2013) compararam o perfil imunoistoquímico de pacientes com menos de 35 anos em relação a pacientes mais velhas. As jovens apresentaram expressão média superior de ki67 em relação as demais pacientes (30% *versus* 10%), menor expressão de receptores hormonais e maior frequência de tumores com fenótipo triplo negativo.

Delpech e cols. (2012) relataram que a baixa expressão de Ki67 no tumor primário está associada a um maior benefício clínico e maior sobrevida.

Gong e cols. (2013) avaliaram o valor prognóstico do Ki67 em pacientes com carcinoma de mama. A expressão aumentada do marcador foi associada a tumores de maior grau histológico, com presença de metastases nodais e sistêmicas em pacientes com menos de 40 anos.

1.5 Referências Bibliográficas

Alshareeda AT, Soria D, Garibaldi JM, Rakha E, Nolan C, Ellis IO, Green AR. Characteristics of basal cytokeratin expression in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2013 May;139(1):23-37.

Atchley DP, Albarracin CT, Lopez A, Valero V, Amos CI, Gonzalez-Angulo AM, *et al.* Clinical and pathologic characteristics of patients with BRCA-positive and BRCA-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008; 26 :4282–4288.

Althius M, Brogan D. Breast cancers among very young premenopausal women (United States). *Cancer Causes Control.* 2003;14:151–60.

Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, *et al.* Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol.* 2008 Jul 10;26(20):3324-30.

De Brakeleer S, Bogdani M, De Grève J, Decock J, Sermijn E, Bonduelle M, *et al.* Loss of nuclear BRCA1 protein staining in normal tissue cells derived from BRCA1 and BRCA2 mutation carriers. *Mutat Res.* 2007 Jun 1;619(1-2):104-12.

Brekelmans CT, Tilanus-Linthorst MM, Seynaeve C, vd Ouweland A, Menke-Pluymers MB, Bartels CC, *et al.* Tumour characteristics, survival and prognostic factors of hereditary breast cancer from BRCA2-, BRCA1- and non-BRCA1/2 families as compared to sporadic breast cancer cases. *Eur J Cancer.* 2007; 43 :867–876.

Brinton LA, Sherman ME, Carreon JD, Anderson WF. Recent trends in breast cancer among younger women in the United States. *J Natl Cancer Inst.* 2008 Nov 19;100(22):1643-8.

Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012 Oct 4;490(7418):61-70.

Cheang MCU, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, *et al.* Ki-67 Index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101(10):736-50.

Chen MH, Yip GW, Tse GM, Moriya T, Lui PC, Zin ML, *et al.* Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Mod Pathol.* 2008 Oct;21(10):1183-91.

Colleoni M, Rotmensz N, Peruzzotti G, Maisonneuve P, Orlando L, Ghisini R, *et al.* Role of endocrine responsiveness and adjuvant therapy in very young women (below 35 years) with operable breast cancer and node negative disease. *Ann Oncol.* 2006;17:1497-503.

Diaz L K, Cryns V L, Symmans F, Sneige N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: From expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol*.2007;14: 419-30.

Delpech Y, Wu Y, Hess KR, Hsu L, Ayers M, Natowicz R, *et al*. Ki67 expression in the primary tumor predicts for clinical benefit and time to progression on first-line endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 135(2): 619–627.

Denkert C, Loibl S, Müller BM, Eidtmann H, Schmitt WD, Eiermann W, *et al*. Ki67 levels as predictive and prognostic parameters in pretherapeutic breast cancer core biopsies: a translational investigation in the neoadjuvant GeparTrio trial. *Ann Oncol*. 2013 Aug 22.

Dorgan JF, Klifa C, Shepherd JA, Egleston BL, Kwiterovich PO Jr, Himes JH, *et al*. Height, adiposity and body fat distribution and breast density in young women. *Breast Cancer Res*.2012 Jul 13;14(4):R107.

Dutra MC, Rezende MA, Andrade VP, Soares FA, Ribeiro MV, de Paula EC, Gobbi H. Imunofenótipo e evolução de câncer de mama: comparação ente mulheres jovens e mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009 Fev;31(2).

El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, Geara FB, *et al*. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer*. 2006 Jul 20;6:194.

Fasching PA, Heusinger K, Haeberle L, Niklos M, Hein A, Bayer CM, *et al*. Ki67, chemotherapy response, and prognosis in breast cancer patients receiving neoadjuvant treatment. *BMC Cancer*. 2011 Nov 14;11:486.

Ferguson NL, Bell J, Heidel R, Lee S, Vanmeter S, Duncan L, *et al*. Prognostic value of breast cancer subtypes, ki-67 proliferation index, age, and pathologic tumor characteristics on breast cancer survival in caucasian women. *Breast J*. 2013 Jan;19(1):22-30.

Gajria D, Chandarlapaty S. HER2-amplified breast cancer: mechanisms of trastuzumab resistance and novel targeted therapies. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2011 February; 11(2): 263–275.

Gnerlich JL, Deshpande AD, Jeffe DB, Sweet A, White N, Margenthaler JA. Elevated breast cancer mortality in women younger than age 40 years compared with older women is attributed to poorer survival in early-stage disease. *J Am Coll Surg*. 2009 Mar;208 (3):341-7.

Giles ED, Wellberg EA, Astling DP, Anderson SM, Thor AD, Jindal S, *et al*. Obesity and overfeeding affecting both tumor and systemic metabolism activates the progesterone receptor to contribute to postmenopausal breast cancer. *Cancer Res*. 2012 Dec 15;72(24):6490-501.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, *et al.* 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* 22:1736–1747.

Gong P, Wang Y, Liu G, Zhang J, Wang Z. New Insight into Ki67 Expression at the Invasive Front in Breast Cancer. *PLoS One*. 2013; 8(1):e54912.

Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, *et al.* Women age \leq 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. *Cancer*. 2005;103(12):2466-72.

Haroon S, Hashmi AA, Khurshid A, Kanpurwala MA, Mujtuba S, Malik B, Faridi N. Ki67 index in breast cancer: correlation with other prognostic markers and potential in pakistani patients. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2013;14(7):4353-8

Hong-Sing Chen M, Wai-Cheong Y, Man-Kit Tse G, Moriya T, Chi-Wai Lui P, Zin M, *et al.* Expression of basal keratins and vimentin in breast cancer of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Modern Pathology*. 2008;21:1183-91.

Huen MS, Sy SM, Chen J. BRCA1 and its toolbox for the maintenance of genome integrity. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2010;11:138–148.

Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Acessado em: 20 de novembro de 2012.

Irvin WJ Jr, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008 Dec;44(18):2799-805.

Koifman S, Koifman R. Environment and cancer in Brazil: an overview from a public health perspective. *Mutat Res* 2003; 544:305-11.

Korsching E, Packeisen J, Liedtke C, Hungermann D, Wülfing P, van Diest PJ, *et al.* The origin of vimentin expression in invasive breast cancer: epithelial-mesenchymal transition, myoepithelial histogenesis or histogenesis from progenitor cells with bilinear differentiation potential? *J Pathol*. 2005 Aug;206(4):451-7.

Kwong A, Cheung P, Chan S, Lau S. Breast cancer in Chinese women younger than age 40: are they different from their older counterparts? *World J Surg*. 2008 Dec;32(12):2554-61.

Lagos-Jaramillo VI, Press MF, Ricker CN, Dubeau L, Mai PL, Weizel, JN. Pathological characteristics of BRCA-associated breast cancers in Hispanics. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 November; 130(1): 281–289.

Lee WY. Frequent loss of BRCA1 nuclear expression in young women with breast cancer: an immunohistochemical study from an area of low incidence but early onset. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Dec;10(4):310-5.

Lehtinen L, Ketola K, Mäkelä R, Mpindi JP, Viitala M, Kallioniemi O, Iljin K. High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD2 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget*. 2012 Dec 17.

Li L, Ji J, Wang JB, Niyazi M, Qiao YL, Boffetta P. Attributable Causes of Breast Cancer and Ovarian Cancer in China: Reproductive Factors, Oral Contraceptives and Hormone Replacement Therapy. *Chin J Cancer Res*. 2012 March; 24(1): 9–17.

Maambo EC, Ioffe OB. Molecular classification and prognostication of breast cancer. *Pathol case reviews*. 2009;14(4):129-134.

Malvezzi M, Bertuccio P, Levi F, La Vecchia C, Negri E. European cancer mortality predictions for the year 2013. *Ann Oncol*. 2013 Feb 12.

Markiewicz A, Ahrends T, Welnicka-Jaśkiewicz M, Seroczyńska B, Skokowski J, Jaśkiewicz J, *et al*. Expression of epithelial to mesenchymal transition-related markers in lymph node metastases as a surrogate for primary tumor metastatic potential in breast cancer. *J Transl Med*. 2012 Nov 19;10:226.

Mendez MG, Kojima AI, Goldman R. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. *FASEB J*. 2010 June; 24(6): 1838–1851.

Mihajlović J, Pechlivanoglou P, Mikov MM, Zivković S, Postma MJ. Cancer incidence and mortality in Serbia 1999–2009. *BMC Cancer*. 2013; 13: 18.

Millar EK, Graham PH, McNeil CM, Browne L, O'Toole SA, Boulghourjian A, *et al*. Prediction of outcome of early ER+ breast cancer is improved using a biomarker panel, which includes Ki-67 and p53. *Br J Cancer*. 2011 Jul 12;105(2):272-80.

Morrison DH, Rahardja D, E Rei, Peng Y, Sarode VR. Tumour biomarker expression relative to age and molecular subtypes of invasive breast cancer. *Br J Cancer*. 2012 Jul 10; 107 (2) :382-7.

Nahta, R. Molecular Mechanisms of Trastuzumab-Based Treatment in HER2-Overexpressing Breast Cancer. *ISRN Oncol*. 2012; 2012: 428062.

Nahta R, Yu D, Hung MC, Hortobagyi GN, Esteva FJ. Mechanisms of disease: understanding resistance to HER2-targeted therapy in human breast cancer. *Nat Clin Pract Oncol*. 2006 May;3(5):269-80.

Narod SA. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. *Nat Rev Clin Oncol*. 2011 Aug 2;8(11):669-76.

Nicoletto MO, Donach M, De Nicolo A, Artioli G, Banna G, S Monfardini. BRCA-1 and BRCA-2 mutations the prognostic factors in clinical practice and genetic counseling. *Cancer Treat Rev*. 2001 Oct; 27 (5): 295-304.

Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med*. 2010 Sep;1(5):747-754.

Park YH, Lee SJ, Cho EY, Choi YL, Lee JE, Nam SJ, *et al*. Clinical relevance of TNM staging system according to breast cancer subtypes. *Ann Oncol*. 2011 Jul;22(7):1554-60.

Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, Leung S, Voduc D, Vickery T, *et al*. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27(8):1160-7.

Parkin DM, Boyd L. Cancers attributable to overweight and obesity in the UK in 2010 *British Journal of Cancer* 2011;105, S34–S37.

Partridge AH, Hughes ME, Ottesen RA, Wong YN, Edge SB, Theriault RL, *et al*. The effect of age on delay in diagnosis and stage of breast cancer. *Oncologist*. 2012;17(6):775-82.

Ponzzone R, Maggiorotto F, Mariani L, Jacomuzzi ME, Magistris A, Mininanni P, *et al*. Comparison of two models for prediction of nonsentinel node metastases in breast cancer. *Am J Surg*. 2007;193:686-92.

Pronzato P, Mustacchi G, De Matteis A, Di Costanzo F, Rulli E, Floriani I, *et al*. Biological characteristics and medical treatment of breast cancer in young women—a featured population: results from the NORA study. *Int J Breast Cancer*.;2011:534256.

Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, *et al*. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. *Breast Cancer Res*. 2010;12(4):207.

Rapiti E, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schäfer P, Sappino AP, *et al*. Survival of young and older breast cancer patients in Geneva from 1990 to 2001. *Eur J Cancer*. 2005;41:1446–1452.

Reyal F, Rouzier R, Depont-Hazelzet B, Bollet MA, Pierga JY, Alran S, *et al*. The molecular subtype classification is a determinant of sentinel node positivity in early breast carcinoma. *PLoS One*. 2011;6(5):e20297.

Robles-Castillo J, Ruvalcaba-Limón E, Maffuz A, Rodríguez-Cuevas S. Breast cancer in Mexican women under 40. *Ginecol Obstet Mex*. 2011 Aug;79(8):482-8.

Roehe AV, Boff AL, Damin A. BRCA1 immunohistochemistry assay: can it play a role in assessing sporadic early-onset breast cancer? *Breast J*. 2012 Sep;18(5):500-1.

Rosa-Mendoza ES, Moreno E, Caguioa PB. Predictors of early distant metastasis in women with breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 Jan 3.

Rosai J, Ackerman. *Surgical Pathology*. 9^a. Edition. Elsevier, Philadelphia. 2004.

Shavers VH, Harlan LC, Stevens J. Racial/ethnic variation in clinical presentation, treatment, and survival among breast cancer patients under age 35. *Cancer*. 2003;97:134-47.

Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004;40(18):2667-75.

Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, *et al*. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.

Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, *et al*. Gene Expression Profiling in Breast Cancer: Understanding the Molecular Basis of Histologic Grade To Improve Prognosis *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 98, No. 4, February 15, 2006

Surveillance Epidemiology and End Results (SEER). Disponível em: <http://seer.cancer.gov/statfacts/html/breast.html#incidence-mortality,2012>. Acessado em: 08 de novembro de 2012.

Ulirsch J, Fan C, Knafl G, Wu MJ, Coleman B, Perou CM *et al*. Vimentin DNA methylation predicts survival in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2013 Jan;137(2):383-96. doi: 10.1007/s10549-012-2353-5. Epub 2012 Dec 13.

Vasseur F, Baranzelli MC, Fournier C, Bonneterre J. Ki67 in young patients with breast cancer. *Gynecol Obstet Fertil*. 2013 Jan;41(1):16-9.

Vaz FH, Machado PM, Brandão RD, Laranjeira CT, Eugénio JS, Fernandes AH, *et al*. Familial breast/ovarian cancer and BRCA1/2 genetic screening: the role of immunohistochemistry as an additional method in the selection of patients. *J Histochem Cytochem*. 2007 Nov;55(11):1105-13.

Veronesi U, Zurrada S, Viale G, Galimberti V, Arnone P, Nolè F. Rethinking TNM: a breast cancer classification to guide to treatment and facilitate research. *Breast* 2009;15:291-295.

Vetter M, Rochlitz C. Breast cancer - Treatment guidelines and new treatment options in 2012, a medical oncology prospective. *Ther Umsch*. 2012 Oct;69(10):577-84.

Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, Mehta SV, Brahmbhatt BV, Shah MJ, *et al.* Vimentin and cytokeratin expression in breast cancer. *Int J Marcadores Biol.* Jan-Mar 2009; 24 (1) :38-46.

Vostakolaei FA, Broeders MJ, Rostami N, van Dijck JA, Feuth T, Kiemeneij LA, *et al.* Age at Diagnosis and Breast Cancer Survival in Iran. *Int J Breast Cancer.* 2012;2012:517976.

Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr Relat Cancer.* 2010 Sep 23;17(4):R245-62.

Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, *et al.* Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2013 May;139(5):739-46.

Yankaskas BC. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Dis.* 2005-2006;23:3-8.

Yoshioka T, Hosoda M, Yamamoto M, Taguchi K, Hatanaka KC, Takakuwa E, *et al.* Prognostic significance of pathologic complete response and Ki67 expression after neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. *Breast Cancer.* 2013 May 5

Zhang Q, Zhang Q, Cong H, Zhang X. The ectopic expression of BRCA1 is associated with genesis, progression, and prognosis of breast cancer in young patients. *Diagn Pathol.* 2012; 7:181.

Znati K, Bennis S, Abbass F, Akasbi Y, Chbani L, Elfatemi H, *et al.* Breast cancer in young patient in Morocco. *Gynecol Obstet Fertil.* 2012 Apr 19.

Zurrida S, Veronesi U. A new TNM classification for breast cancer to meet the demands of the present and the challenges of the future. *Womens Health (Lond Engl).* 2011 Jan;7(1):41-9.

2. OBJETIVOS

Geral:

Analisar as características clinicopatológicas e imunoistoquímicas do carcinoma de mama em mulheres com idade inferior a 35 anos e a partir de 45 anos.

Específicos:

Avaliar o perfil fenotípico do carcinoma de mama nas mulheres com idade inferior a 35 anos, atendidas no Serviço de Mastologia do Hospital Fêmeina (HF) no período de julho de 2008 a outubro de 2011, em relação às mulheres com idade \geq 45 anos. Comparar as variáveis abaixo entre os dois grupos etários:

- a) características clinicopatológicas do tumor
- b) sobrevida global e livre de doença
- d) marcadores tumorais imunoistoquímicos (RE, RP, Her2, 34 β E12, vimentina, BRCA1, ki67).

3. ARTIGO CIENTÍFICO EM INGLÊS

Young age (<35 years old) and ki67 predicts death in breast cancer.

Daniele L.R Schneider¹, Adriana Vial Roehe², Andréa Pires Souto
Damin³, Rosalva T. Meurer⁴,

1.M.D. Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre (UFCSPA),
Brazil

2.M.D., PhD., Department of Pathology of Universidade Federal de Ciências da
Saúde de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil

3.M.D., PhD., Hospital Fêmeina, Grupo Hospitalar Conceição (GHC), Brazil

4.M.D. Laboratory of Pathology of Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre (UFCSPA), Brazil

Corresponding author: Adriana Vial Roehe

Adress: Rua Potiguara, 263 Assunção CEP 91900480 Porto Alegre-RS,

Phone: 55-51-81331044

E-mail: aroehe@gmail.com

Key-words: Breast carcinoma, young, immunohistochemistry, ki67.

Abstract

Breast cancer is the most common malignant tumors among women. According to the National Cancer Institute (INCA), Porto Alegre has the highest incidence in the country. Recent research showed an increase in the number of cases diagnosed in women under 35 years. In this age group, according to the literature, the cancer has more aggressive biological behavior, reflecting an increase in mortality. **Objective:** The purpose of this study was to analyze the clinicopathological and immunohistochemical characteristics of breast cancer, including overall survival and disease free survival in patients aged less than 35 years compared to women over 45 years. **Methods:** A prospective study was conducted with patients the Femina Hospital in July 2008 to October 2011. Seven patients diagnosed with breast carcinoma and age less than 35 years and 130 patients aged over 45 years were tested for BRCA1 markers, vimentin and Ki67 34βE12. **Results:** Patients aged less than 35 years old had a higher frequency of clinicopathological parameters of poor prognosis and shorter overall survival ($P = 0.019$). The altered BRCA1 expression was associated with HER2 molecular phenotype ($P = 0.037$). Ki67 positivity was correlated with high histological grade ($P = 0.04$) and stage III and IV ($P = 0.03$), triple-negative phenotype ($P < 0.001$) and lower overall survival ($P = 0.029$). **Conclusion:** Breast cancer presents different biological behavior in young women. The early age (<35 years) and Ki67 positivity (> 14%) are independent prognostic factors for overall survival in breast cancer.

Introduction

Breast cancer is one of the most prevalent malignancies in women in Brazil [1]. Most cases of the disease occurs after age 50. The incidence of breast cancer in women under the age of 35 years ranges 2-5%, according to the different ethnic groups [2,3]. However, some countries recorded an increase in the number of cases in young [4].

According to the National Cancer Institute (INCA), Brazil registered an overall increase in the number of cases of breast cancer in recent decades in all regions and Porto Alegre city, has the highest incidence rate of cancer [1]. There are few published data on the age distribution of breast cancer in the country. Three retrospective studies showed an increase in the number of cases recorded up to 40 years old [5,6,7].

The early age of occurrence of this neoplasm has shown, in some studies, a factor of poor prognosis. Studies show that in young women, the tumor usually presents aggressive biological behavior, with higher chances of recurrence and lower overall survival [8,9]. It was also observed unfavorable clinicopathological parameters, such as higher tumor grade and size, lymph node metastases, lower expression of hormone receptors (HR), increased expression of HER2 and presence of phenotype triple-negative/basal [10,11].

However, there are still controversial when describing age as an independent prognostic factor. Studies showed no significant effect of age on the assessment of the survival of young patients, even in the presence of tumors with unfavorable clinicopathological features [12,13,14].

Anders et al. (2008) [15] observed in young patients only a tendency to lower survival rates, despite the presence of overexpression of HER2, higher tumor grade and increased lymph node involvement.

Chen et al. (2008) [16] analyzing breast tumors in patients up to 35 years, found a higher expression of vimentin and CK 34BE12 in cases where there were larger tumor size and histological grade, overexpression of HER2 and basal phenotype. According to Yamashita et al, 2013,[17] the expression of vimentin revealed a marker of poor prognosis in patients with triple-negative phenotype (TN).

The immunohistochemical expression (IMQ) of BRCA1 protein in sporadic breast tumors has been associated with poor prognostic features such as advanced pathological stage, presence of axillary nodal metastases, higher tumor grade and size, absence of expression of HR [18,19]. Furthermore, positivity for this marker has been associated with tumors at an early age, high levels of expression of Ki67 and CK baseline [7,20].

High expression of Ki67 was associated with breast cancers in young patients, with higher histological grade, the presence of nodal and systemic metastases, greater chance of recurrence and lower overall survival [21,22].

The aim of this study was to analyze the biological behavior of breast cancer in young women. We compared clinicopathologic characteristics, overall survival and disease-free and expression of immunohistochemical markers among patients under 35 and over 45 years.

Material and methods

The study included prospectively 137 patients diagnosed with breast cancer, from the Hospital Clinic of Mastology Femina - HF (Conceição Hospital Group - GHC), for the period July 2008 to October 2011. The case group consisted of 7 patients aged less than 35 years. The control group consisted of 130 patients aged over 45 years. All patients agreed to participate in the study, which was approved by the Ethics Committee in Research of the Federal University of Health Sciences of Porto Alegre - UFCSPA (Protocol 1221/10) and GHC (Protocol 11-037).

Clinicopathological evaluation

The clinicopathological characteristics were obtained from medical records. The tumor staging was established according to the TNM (American Joint Committee on Cancer, 2003). The analysis of overall survival and disease free survival was performed using the serial follow-up of patients in the HF, according to the protocol standardized by the Brazilian Society of Mastology.

Immunohistochemical analysis

Hormonal Receptors (RE, RP) and HER2 immunohistochemical status were obtained from anatomopathological reports. To another markers the reactions were performed at the UFCSPA Laboratory of Pathology Research, as follows described. Briefly, paraffin-embedded specimens were sectioned into 3 μm slices, deparaffinized and rehydrated. Antigen retrieval was performed in a water bath (95-98°C) for 30 minutes with sodium citrate buffer (pH 6.0) for citoqueratina 34BE12 (clone 34BE12 1/100 DakoCytomation®), Ki67 (clone-MIB-1 1/300 DakoCytomation®) and BRCA1 (polyclonal 1/150

Biogenex®) but not with Vimentin (clone V9, 1/300 DakoCytomation®). Endogenous peroxidases were blocked with 5% hydrogen peroxide in methanol. To avoid nonspecific binding sites, the sections were incubated for 30 minutes with 1% bovine serum albumin (BSA, Sigma®) in PBS. Incubation with primary antibodies was held overnight at 4°C. After that, HRP-labeled polymer conjugated (ADVANCE HRP kit, Dakocytomation) was incubated for 40 minutes at room temperature. Negative controls were obtained with the same protocol above described, replacing the primary antibody, by BSA. Diaminobenzidine (0.06%) was utilized to demonstrate the immunoreactions. The counterstaining was performed with Harris' hematoxylin. The positive reactions considered are shown in Table 1.

Table 1: Identification of positive tumor markers

Marker	Positive
Vimentin	Any cytoplasmatic stain [23].
34βE12	Sained more than 1% of the neoplastic cytoplasm [24].
BRCA1	Any cytoplasmatic stain and lacking of nuclear stain [20]. According to these authors, we consider probable gene mutation if the immunohistochemistry reaction is negative in nucleous and positive in the cytoplasm. Cases with nuclear expression of the BRCA1 protein were considered normal.
Ki67	Nuclear stain in more than 14% of the neoplastic cells [25]

The molecular classification of the breast cancer cases was performed as recommended by Goldhirsch e cols.(2011) [25]. Table 2.

Statistical analysis

Analyses were performed using SPSS (Statistical Package for the Social Sciences) version 18.0. Categorical variables were described as frequencies and percentages. Categorical variables were compared by chi-square or in case of 2x2 tables, we used the Fisher exact test or chi-square test with Yates correction. We used analysis of standardized residuals to detect the categories with more or less often than expected.

To evaluate the overall survival and disease-free survival analysis was used for survival Kaplan Meier method and compared survival rates between different categories of variables by the log-rank test. We considered a significance level of 5%.

Results

The clinicopathological characteristics of sample study are shown in Table 3. The total number of incident cases of breast cancer observed in our study was 169 cases: 7 (4%) in women younger than 35 years (cases), 32 (19%) between 35 and 45 years and 130 (77%) after 45 years (controls). We excluded patients aged between 35 and 45 years. In relation to clinicopathological characteristics, there were no statistically significant differences between cases and controls (Table 3).

The mean follow-up of patients was 66.2 months. In the group of cases overall survival media (OS) was 39.2 months versus 66.8 months in the control group ($P = 0.019$) (Figure 1). Considering the disease-free survival (DFS), the average time in the cases and controls, respectively, was 25.8 versus 53.6 months ($P = 0.48$) (Figure 2).

Considering the individual analysis of each immunohistochemical marker, we obtained the following data. High Ki67 positivity was significantly correlated with tumor grade 3 ($P = 0.04$), TN phenotype ($P < 0.001$), advanced tumor stage (3 and 4) ($P = 0.03$) (Table 4) and lower overall survival ($P = 0.029$) (Figure 3). We did not observe statistically significant in relation to other variables.

The expression of cytokeratin 34BE12 was lower in patients with stage 3 ($P = 0.004$) (Table 5). There was no relationship between the expression of 34BE12 and overall survival and disease free survival (Figure 4). Table 6 shows the results of expression of vimentin versus the clinicopathologic characteristics of the sample. There was a higher protein expression in metastatic patients ($P = 0.09$), and tumor stage 4 ($P = 0.08$). The average SLD in patients with vimentin positive was 22.6 months versus 47 months in patients vimentin negative ($P = 0.06$) (Figure 5). The ST was 25 months in patients with vimentin positive versus 49.6 months in patients with no expression of vimentin ($P = 0.17$) (Figure 6).

Regarding the BRCA1, immunohistochemical alterations were significantly more present in patients with molecular phenotype HER2 ($P = 0.03$). These alterations were also more frequent in patients with histologic grade 2 and 3 (92.3%) versus grade 1 (7.7%) ($P = 0.49$) and stage 3 and 4 (85.2%) versus stage 1 and 2 (14.8%) ($P = 0.27$) (Table 7). No relationship was found among the marker expression and overall survival (Figure 7).

Discussion

The purpose of this study was to investigate prospectively the biological behavior of breast cancer, especially in young patients. There is no established consensus that defines the "young age" in breast cancer. Han (2010) recommended a cutoff for defining breast cancer of early onset before 35 years of age, when it is observed sharp drop in patients survival time [26].

The incidence of cancer in this age group in our study was 4%. Since the expected rate of the disease in this group is between 2 and 4%, we found no increased incidence of cancer in young people. However, we observed significantly lower overall survival in this group ($P = 0.019$), demonstrating that the 35 years old cutoff point can be considered an independent prognostic factor in breast cancer. Regarding other clinicopathological parameters of poor prognosis, we observed in the young higher frequency of tumor grade 3 (42.9% vs 24.2%), lymph node involvement (57% vs 43%), advanced stage (28.6% vs. 5.5%), systemic metastases (28.6% vs. 6.6%), overexpression of HER2 (42.9% vs. 15.7%), Ki67 (57.1% vs. 30.2%), vimentin (14.3% vs. 5.4%), and BRCA1 (57.1% vs. 27.1%), and minor SLD time (25 vs. 53 months). Although we did not observe statistically significant relationships, these data could explain the increased aggressiveness of the disease and the lower survival rates.

Regarding to the molecular phenotypes of breast cancer, we found divergent data of others studies [27,28], who related phenotype TN / basal with early age. We had no young patient (even with a sample size limited) with phenotype TN / basal. The high positivity of RE in our sample: 85.7% in young and 76.2% in the over 45 years has resulted in the classification of most

patients between classes Luminal A, Luminal B and Luminal B-HER2. Similar RE rates were found in studies on breast cancer at an early age [7,29].

Canello *et al* (2011) examined the relationship between age, molecular phenotype and prognosis of breast cancers. The youth group had worse prognostic markers, including increased risk of recurrence and death. According to the authors, young patients with phenotypes TN, Luminal B and HER2 had a worse prognosis compared with older patients with similar disease.

Considering the individual analysis of immunohistochemical markers, we demonstrated results according with other studies, in relation to the increased expression of Ki67. We found significant associations among the expression of Ki67 greater than 14% and high histological grade, advanced stage and phenotype TN / basal. The marker was still independent predictor of worse overall survival ($P = 0.029$).

According Inwald *et al.* (2013) the higher the expression of Ki67, the greater the association with adverse histopathology parameters and with shorter overall and disease-free survival.

Delpech *et al.* (2010) emphasize that high expression of Ki67 in the primary tumor is predictive of metastatic disease ($P = 0.001$). A study demonstrated that high proliferative activity of Ki67 is associated with high-grade tumors, with cancer relapse and poor survival [22].

In our study expression of basal CK 34BE12 was higher among patients with TN phenotype, as reported by Chen *et al.* (2008) [16]. However, we found an inverse relationship between marker positivity and the presence of metastasis ($P = 0.017$). It was similarly observed by Vora *et al* (2009) [31] whom studied the expression of CK and vimentin in breast tumors. According to the authors,

the lower expression of CKs and the higher expression of vimentin, were related to the acquisition of mesenchymal characteristics, the phenomenon of epithelial mesenchymal transition. The study suggests that the loss of CK 's expression and the increase in vimentin expression would be associated with aggressive disease.

Regarding to vimentin, we observed increased expression of it in the presence of advanced disease (metastases and stage 4). We saw also lower OS and SLD between vimentin-positive cases. Other authors have demonstrated the relationship between positivity for this marker and features of poor prognosis in breast carcinoma [16,17,31].

Analyzing the expression of BRCA1, we found a significant relationship with the molecular phenotype HER2 ($P = 0.037$). Besides, cases with higher histological grade and advanced stage showed immunostaining consistent with the gene mutation. Previous studies similarly showed a relationship between the expression of BRCA1 and unfavorable clinicopathological features [7,19,20].

In this study we could see, even with a small sample, that breast cancer has aggressive biological behavior in women less than 35 years old. Larger studies are needed to elucidate the role of immunohistochemical markers 34BE12 CK, vimentin and BRCA1 in the pathogenesis and prognosis of the disease. The early age (<35 years) and Ki67 positivity (> 14%) seems to be independent prognostic factors for overall survival in breast cancer.

References

1. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/>. Acessado em: 20 de novembro de 2012.
2. Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V *et al*. Women age \leq 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. *Cancer*. 2005;103(12):2466-72.
3. Hong-Sing Chen M, Wai-Cheong Y, Man-Kit Tse G, Moriya T, Chi-Wai Lui P, Zin M *et al*. Expression of basal keratins and vimentin in breast cancer of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Modern Pathology*. 2008;21:1183-91.
4. Bouchardy C, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schaefer P, Delaloye JF *et al*. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br J Cancer*. 2007 Jun 4;96(11):1743-6
5. Menke CH, Pohlmann PR, Backes A, Cerricatto R, Oliveira M, Bittelbrunn A *et al*. Tumor size as a surrogate end point for the detection of early breast cancer: a 30 year (1972-2002), single-center experience in Southern Brazil. *Breast J* 2007;13: 448-456.
6. Freitas-Junior R, Freitas NMA, Curado MP, Martins E, Moreira MA, Silva CM. Variations in breast cancer incidence per decade of life (Goiania, GO, Brazil): 16- year analysis. *Cancer Causes and Control* 2008;19 (7): 681-687.
7. Roehe AV, Boff AL, Damin A. BRCA1 immunohistochemistry assay: can it play a role in assessing sporadic early-onset breast cancer? *Breast J*. 2012 Sep;18(5):500-1.
8. Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G *et al*. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Ann Oncol*. 2010 Oct;21(10):1974-81.
9. Evans DG, Moran A, Hartley R, Dawson J, Bulman B, Knox F *et al*. Long-term outcomes of breast cancer in women aged 30 years or younger, based on family history, pathology and BRCA1/BRCA2/TP53 status. *Br J Cancer*. 2010 Mar 30;102(7):1091-8.
10. Dutra MC, Rezende MA, Andrade VP, Soares FA, Ribeiro MV, de Paula EC *et al*. Imunofenótipo e evolução de câncer de mama: comparação ente mulheres jovens e mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2009 Fev;31(2).
11. Liukkonen S, Leidenius M, Saarto T, Sjöström-Mattson J. Breast cancer in very young women. *Eur J Surg Oncol*. 2011 Dec;37(12):1030-7.

- 12.El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, Geara FB *et al.* Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer*. 2006 Jul 20;6:194.
- 13.Vostakolaei FA, Broeders MJ, Rostami N, Van Dijck JA, Feuth T, Kiemeneij LA *et al.* Age at Diagnosis and Breast Cancer Survival in Iran. *Int J Breast Cancer*. 2012;2012:517976
- 14.Rapiti E, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schafer P, Sappino AP *et al.* Survival of young and older breast cancer patients in Geneva from 1990 to 2001. *Eur J Cancer*. 2005;41:1446–1452.
- 15.Anders C, Hsu D, Broadwater G, Acharya C, Foekens J, Zhang Y *et al.* Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancer shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 2008;26:3324-29.
- 16.Chen MH, Yip GW, Tse GM, Moriya T, Lui PC, Zin M *et al.* Expression of basal keratins and vimentin in breast cancers of young women correlates with adverse pathologic parameters. *Mod Pathol*. 2008 Oct;21(10):1183-91.
- 17.Yamashita N, Tokunaga E, Kitao H, Hisamatsu Y, Taketani K, Akiyoshi S, *et al.* Vimentin as a poor prognostic factor for triple-negative breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2013 May;139(5):739-46.
- 18.Rakha EA, El-Sheikh SE, Kandil MA, El-Sayed ME, Green AR, Ellis IO. Expression of BRCA1 protein in breast cancer and its prognostic significance. *Hum Pathol*. 2008 Jun;39(6):857-65. 8.
- 19.Zhang Q, Zhang Q, Cong H, Zhang X. The ectopic expression of BRCA1 is associated with genesis, progression, and prognosis of breast cancer in young patients. *Diagn Pathol*. 2012; 7: 181.
- 20.Lee WY. Frequent loss of BRCA1 nuclear expression in young women with breast cancer: an immunohistochemical study from an area of low incidence but early onset. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2002 Dec;10(4):310-5.
- 21.Delpech Y, Wu Y, Hess KR, Hsu L, Ayers M, Natowicz R *et al.* Ki67 expression in the primary tumor predicts for clinical benefit and time to progression on first-line endocrine therapy in estrogen receptor-positive metastatic breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 135(2): 619–627.
- 22.Nishimura R, Osako T, Okumura Y, Hayashi M, Toyozumi Y, Arima N. Ki-67 as a prognostic marker according to breast cancer subtype and a predictor of recurrence time in primary breast cancer. *Exp Ther Med*. 2010 Sep;1(5):747-754.
- 23.Hong-Sing Chen M, Wai-Cheong Y, Man-Kit Tse G, Moriya T, Chi-Wai Lui P, Zin M *et al.* Expression of basal keratins and vimentin in breast cancer of young

women correlates with adverse pathologic parameters. *Modern Pathology*. 2008;21:1183-91.

24.Fernandes RCM, Bevilacqua JLB, Soares IC, Siqueira SAC, Pires L, Hegg R, Carvalho F. Coordinated expression of ER, PR and HER2 define different prognostic subtypes among poorly differentiated breast carcinomas. *Histopathology*. 2009;55:346-52.

25.Goldhirsch A, Wood WC, Coates, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H *et al.* (2011).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* 22:1736–1747

26.Han W, Kang SY. Relationship between age at diagnosis and outcome of premenopausal breast cancer: age less than 35 years is a reasonable cut-off for defining young age-onset breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* (2010) 119:193–200

27.Tea MK, Fan L, Delancey JW, Staudigl C, Steurer S, Lang C *et al.* Is breast cancer in young Asian women more aggressive than in Caucasians? A cross-sectional analysis. *Tumour Biol*. 2013 Aug;34(4):2379-82.

28.Anders C, Hsu D, Broadwater G, Acharya C, Foekens J, Zhang Y *et al.* Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancer shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol*. 2008;26:3324-29.

29.Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri *et al.* Prognosis in women with small (T1mic,T1a,T1b) node-negative operable breast cancer by immunohistochemically selected subtypes. *Breast Cancer Res Treat*. 2011 Jun;127(3):713-20.

30.Inwald EC, Klinkhammer-Schalke M, Hofstädter F, Zeman F, Koller M, Gerstenhauer *et al.* 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*. 2013 Jun;139(2):539-52. 2013 May 16.

31.Vora HH, Patel NA, Rajvik KN, Mehta SV, Brahmbhatt BV, Shah M *et al.* Vimentin and cytokeratin expression in breast cancer. *Int J Cancer*. 2009; 124 (1) :38-46.

Table 3. Clinicopathological characteristics of the sample study

Variable	Cases(%)	Controls(%)	N	P
	7(4)	130(77)		
Histologic Grade				0.38
Grade I	0(0)	17(14.2)	17	
Grade II	4(57.1)	74(61.7)	78	
Grade III	3(42.9)	29(24.2)	32	
TMN Stage				0.55
I	2(28.6)	28(22.6)	30	
II	3(42.9)	39(31.5)	42	
III	1(14.3)	49(39.5)	50	
IV	1(14.3)	8(6.5)	9	
Immunohistochemistry				
RE	6(85.7)	93(76,2)	99	0.99
RP	5(71.4)	84(68.9)	89	0.99
HER2	3 (42.9)	19(15.7)	22	0.09
Vimentin	1(14.3)	5(5.4)	6	0.36
34βE12	4(57.1)	57(27.1)	61	0.67
BRCA1	4(57.1)	23(27.1)	27	0.18
Ki67 >14%	4(57.1)	26(30.2)	30	0.20
Ki67<14%	3(42.9)	60 (69.8)	63	
Molecular Phenotype				0.35
Luminal A	2(28.6)	41(43.6)	43	
Luminal B	2(28.6)	12(12.8)	14	
Luminal B HER2	2(28.6)	13(13.6)	15	
HER2	1(14.3)	7(7.4)	8	
Triple negative	0(0)	21(22.3)	21	

P: statistical significance, Grade I,II III and IV : Nottingham histological, Stage I,II, III and IV, TNM tumoral stage, ER: estrogen receptor, PR: progesterone receptor, HER2:human epidermal receptor growth factor, Luminal A: luminal A phenotype, Luminal B: luminal B phenotype, Luminal B HER2 overexpression: Luminal B HER2 ;phenotype,HER2 phenotype: HER2, Triple – negative: triple – negative phenotype.

Table 4. Relationship between the expression of vimentin with stage, histological grade and metastasis.

Variable	Vimentin – n(%)	N	P
Stage			
IV	2(28.6)	7	0.08
Histological grade			
I	1(7.7)	13	0.89
II	4(5.8)	69	0.89
III	3(8.1)	37	0.89
Metastasis	2(25.)	8	0.09

Table 5. BRCA1 immunohistochemical alterations rates compared to tumoral stage, histological grade and molecular phenotype.

Variable	BRCA1 – n(%)	N	P
Histological grade			
I	2(7.7)	11	0.49
II and III	24(92.3)	78	0.49
Stage			
I and II	4(14.8)	22	0.27
III and IV	23(85.2)	69	0.27
Molecular Phenotype			
Luminal A	8(21.6)	37	
Luminal B	5(41.7)	12	
Luminal B HER2	4(33.3)	12	
HER2	3(100)	3	0.37
Triple negative	3(18.8)	16	

Table 6. Relationship among the expression of vimentin to stage, histological grade and metastasis.

Variable	Vimentin – n(%)	N	P
Stage			
IV	2(28.6)	7	0.08
Histological grade			
I	1(7.7)	13	0.89
II	4(5.8)	69	0.89
III	3(8.1)	37	0.89
Metastasis	2(25.)	8	0.09

Table 7. BRCA1 immunohistochemical alterations and tumoral stage, histological grade and molecular phenotype.

Variable	BRCA1 –n(%)	N	P
Histological grade			
I	2(7.7)	11	0.49
II and III	24(92.3)	78	0.49
Stage			
I and II	4(14.8)	22	0.27
III and IV	23(85.2)	69	0.27
Molecular Phenotype			
Luminal A	8(21.6)	37	
Luminal B	5(41.7)	12	
Luminal B HER2	4(33.3)	12	
HER2	3(100)	3	0.037
Triple negative	3(18.8)	16	

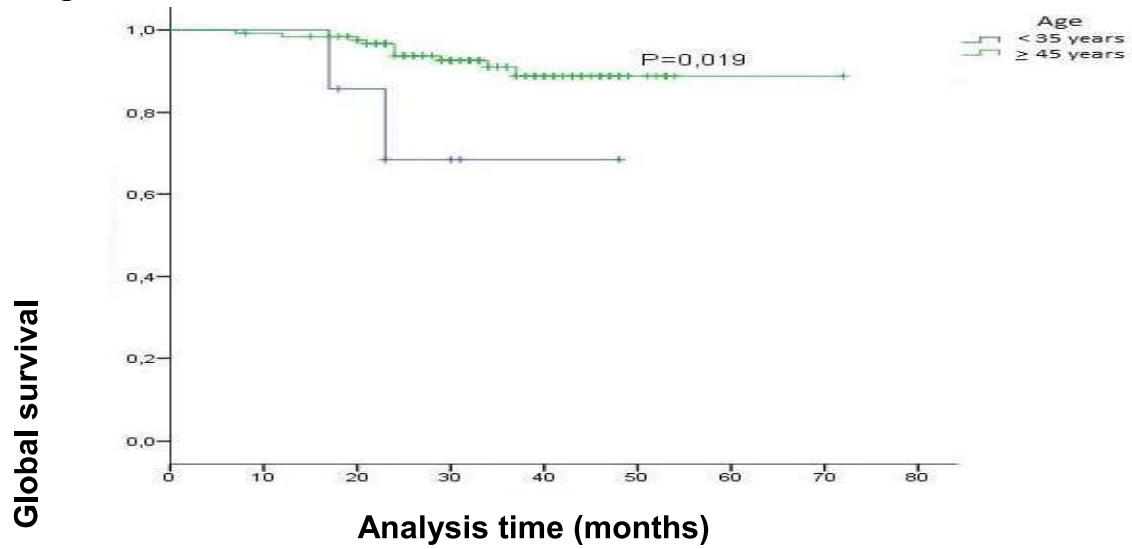
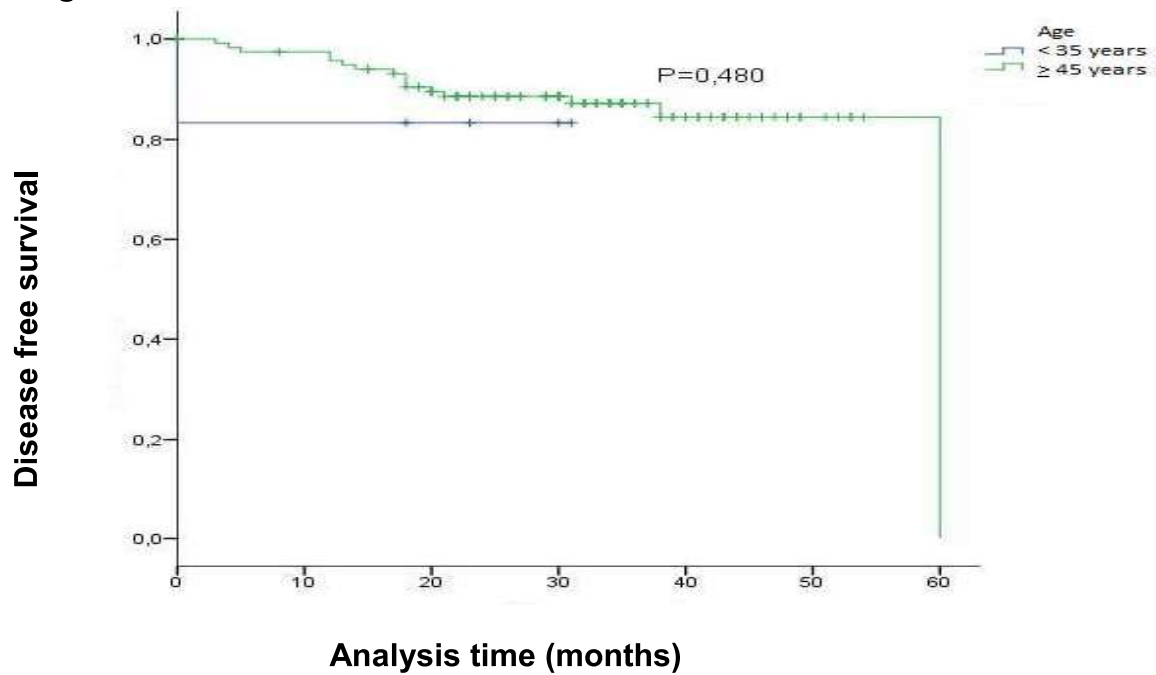
Figure 1: Global survival in cases and controls**Figure 2: Disease-free survival in cases and controls**

Figure 3: Ki67 expression and overall survival

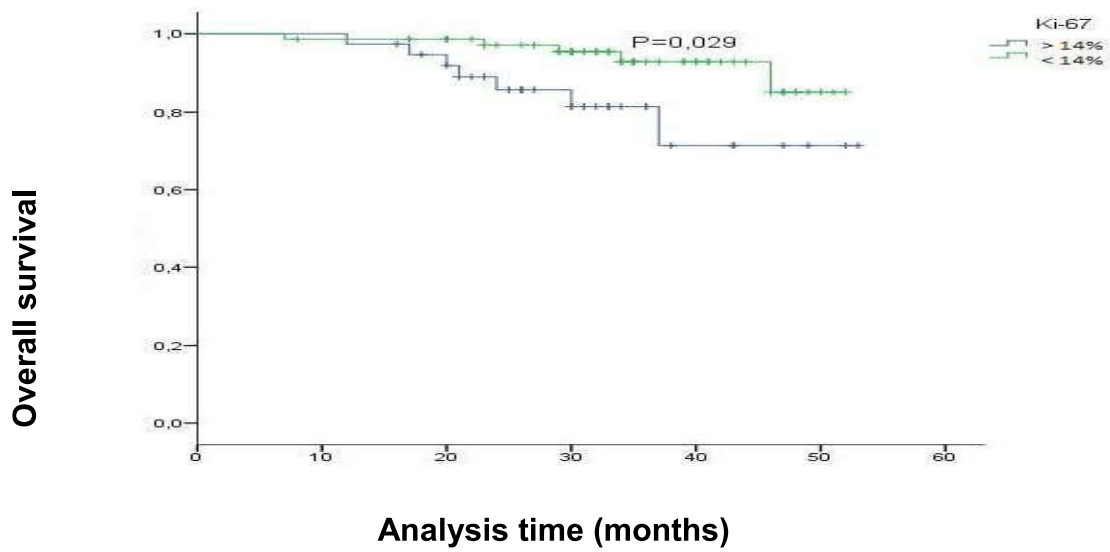


Figure 4: 34βE12 expression and overall survival

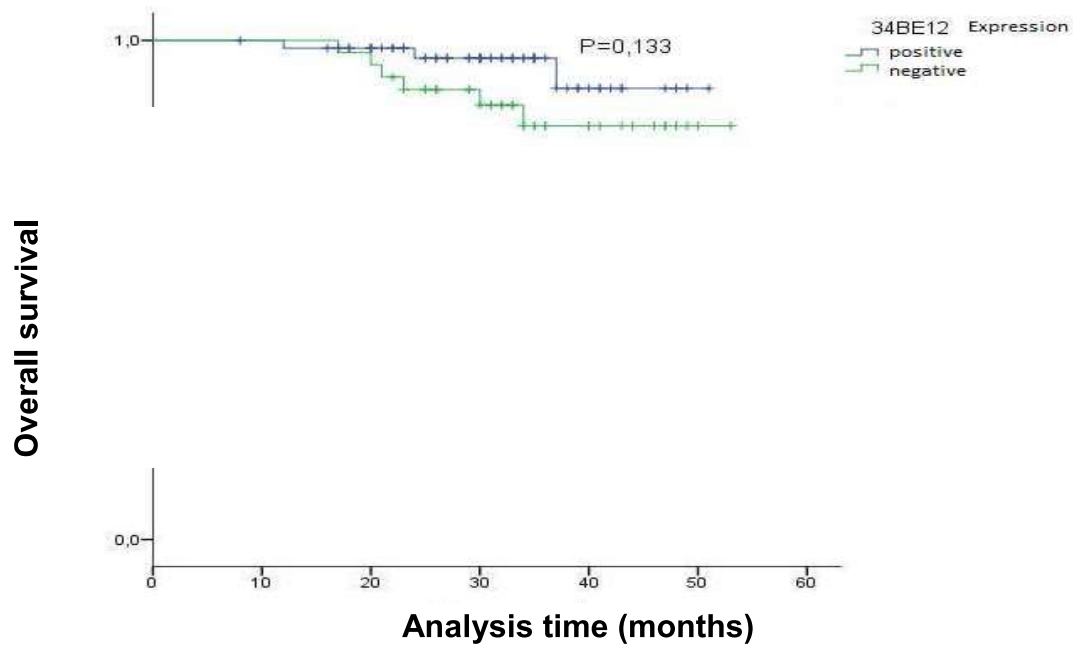


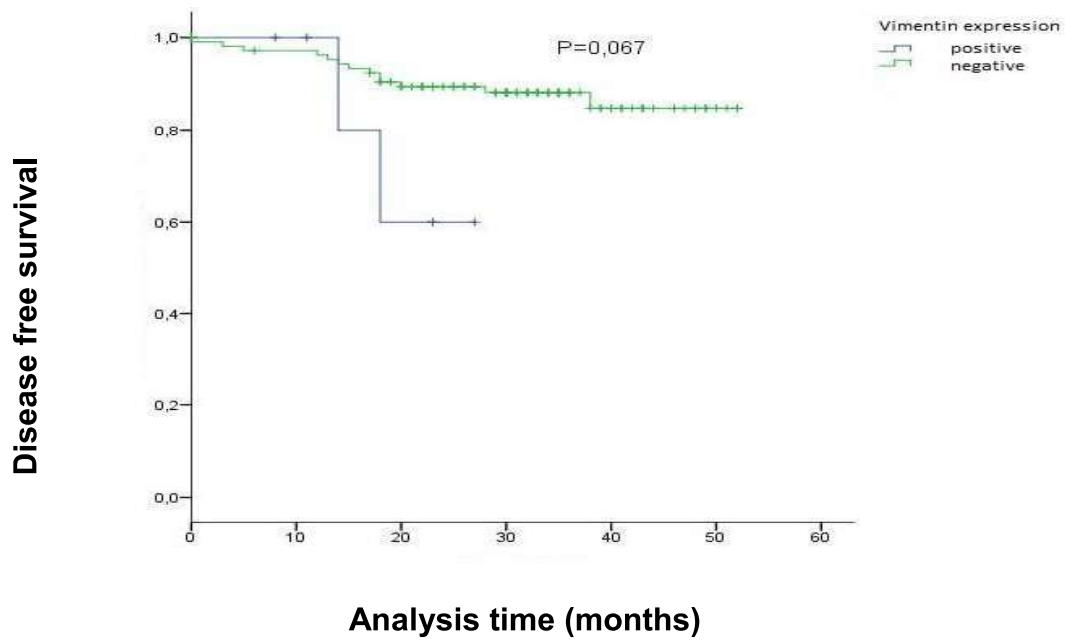
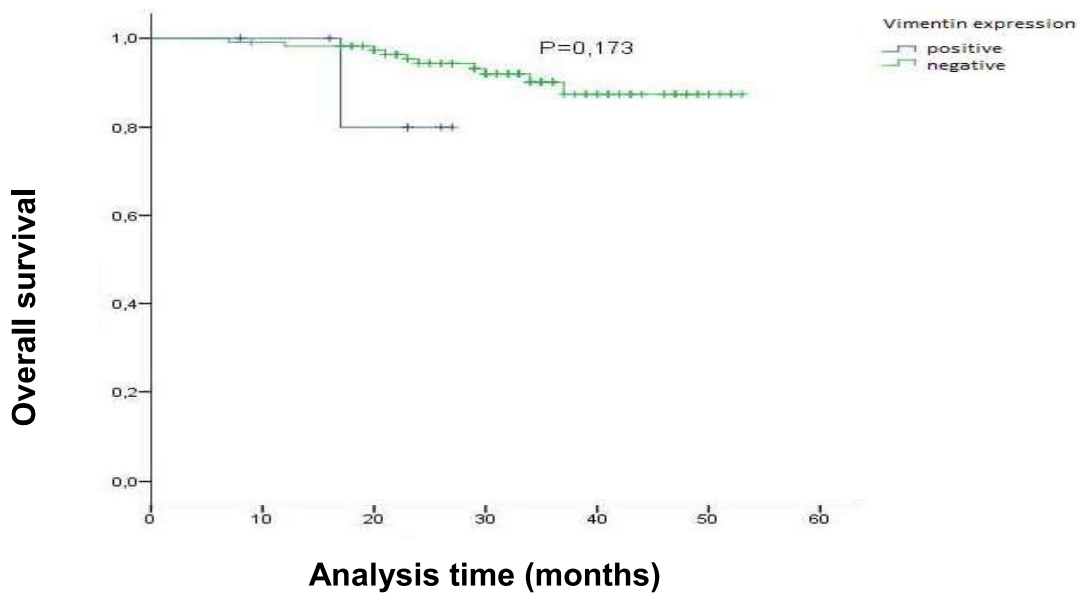
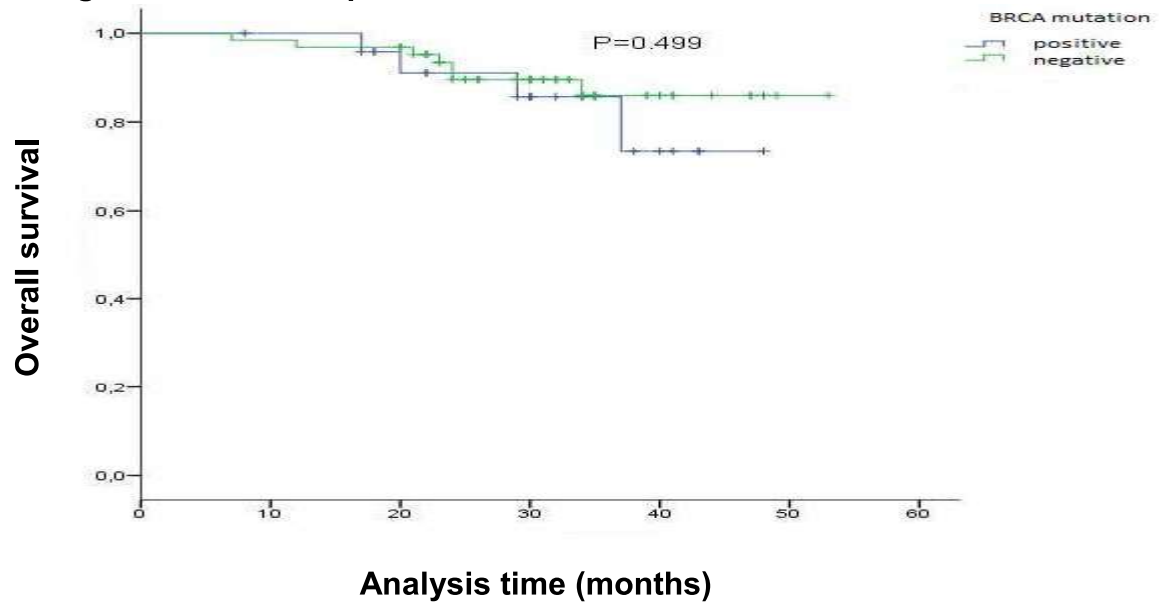
Figure 5: Vimentin expression and disease-free survival**Figure 6: vimentin expression and overall survival**

Figure 7: BRCA1 expression alterations and overall survival

4.ANEXOS

4.1.Protocolo de coleta de dados

Dados de prontuário coletados:

Nome da paciente: _____

Idade: () até 35 anos () de 36 a 40 anos () 50 anos ou mais

Estadiamento TNM: _____

Ano do diagnóstico _____

Exame anatomopatológico

Nome da paciente: _____

Grau histológico de Nottingham: ()1 ()2 ()3

Exame imunoistoquímico

Nome da paciente: _____

-Receptor de estrogênio: () menos de 10% de núcleos neoplásicos corados
() mais de 10% de núcleos neoplásicos corados

-Receptor de progesterona: () menos de 10% de núcleos neoplásicos corados
() mais de 10% de núcleos neoplásicos corados

-HER2: () negativo: 1+ ou 2+ () positivo: 3+

-Vimentina: () negativo () positivo

-34BE12: () negativo () positivo

-BRCA1: () mais de 10% de núcleos neoplásicos corados () menos de 10%
de núcleos neoplásicos corados ou negativo () presença de *dot*
citoplasmático, ausência de marcação nuclear

4.2. Estadiamento patológico

O estadiamento patológico do carcinoma de mama utilizado foi o TNM, segundo a AJCC 2010, organizado da seguinte maneira:

Tx: tumor primário não pode ser avaliado

T0: sem evidência de tumor primário

Tis: carcinoma *in situ* (inclui carcinoma ductal *in situ*, carcinoma lobular *in situ* e doença de Paget do mamilo sem tumor)

T1 mic: microinvasão de 0,1cm ou menos em sua maior dimensão

T1: tumor com até 2 cm na sua maior dimensão

T1a: tumor medindo entre 0,2 e 0,5 cm na sua maior dimensão

T1b: tumor medindo entre 0,6 e 1 cm na sua maior dimensão

T1c: tumor medindo entre 1,1cm e 2,0 cm na sua maior dimensão

T2: tumor medindo entre 2,1 e 5,0 cm na sua maior dimensão

T3: tumor medindo mais de 5,0 cm na sua maior dimensão

T4: tumor de qualquer tamanho com extensão direta para a parede torácica (T4a) ou para a pele (T4b)

T4c: presença de T4a e T4b

T4d: carcinoma inflamatório

pNx: linfonodos regionais não podem ser avaliados (removidos previamente ou não para estudo anatomopatológico)

pN0: ausência de metástases em linfonodos regionais, sem exames adicionais como imunoistoquímica para detecção de células tumorais isoladas

pN0(i-): ausência de metástases em linfonodos regionais em exame anatomopatológico, com imunoistoquímica negativa

pN0(i+): ausência de metástases em linfonodos regionais em exame anatomopatológico, com imunoistoquímica positiva, sem agrupamentos maiores do que 0,2 mm

pN0(mol-): ausência de metástases em linfonodos regionais em exame anatomopatológico, com PCR real time negativo

pN0(mol+): ausência de metástases em linfonodos regionais em exame anatomopatológico, com PCR real time positivo

pN1: metástases para um a três linfonodos axilares e/ou mamários internos, com doença microscópica, não detectável clinicamente

pN1mi: micrometástase em linfonodo (maior que 0,2mm e menor ou igual a 2 mm)

pN1a: metástases para um a três linfonodos axilares

pN1b: metástases para linfonodos mamários internos, detectada por dissecação de linfonodo sentinela, mas não detectável clinicamente

pN1c: metástases para um a três linfonodos axilares e para linfonodos mamários internos, com doença microscópica detectada por dissecação de linfonodo sentinela, mas não detectável clinicamente

pN2: metástases para um a quatro linfonodos axilares ou metástases clinicamente aparentes para linfonodos mamários internos, na ausência de metástases axilares

pN2a: metástases para quatro a nove linfonodos axilares (no mínimo um depósito tumoral maior do que 2mm)

pN2b: metástases clinicamente aparentes para linfonodos mamários internos, na ausência de metástases axilares

pN3: metástases para 10 ou mais linfonodos axilares ou para linfonodos supraclaviculares ou metástases clinicamente aparentes

pN3a: metástases para 10 ou mais linfonodos axilares (no mínimo um depósito tumoral maior do que 2 mm) ou para linfonodos axilares

pN3b: metástases clinicamente aparentes para linfonodos mamários internos ipsilaterais na presença de um ou mais linfonodos axilares positivos; ou mais de três linfonodos axilares positivos com metástases em linfonodos mamários internos detectados por dissecação de linfonodo sentinela, mas não detectáveis clinicamente

pN3c: metástases para linfonodos supraclaviculares ipsilaterais

Mx: metástases a distância não podem ser avaliadas

M0: ausência de metástases a distância

M1: metástases a distância

4.3. Graduação histológica

Todos os carcinomas de mama foram graduados segundo a classificação combinada de Nottingham (modificação de Elston-Ellis) ou sistema de graduação de Bloom-Richardson. O grau do tumor foi determinado através da avaliação das seguintes características morfológicas: capacidade de formações tubulares apresentadas pelo tumor, índice mitótico e grau de pleomorfismo citológico, atribuindo-se o valor de 1 (favorável) a 3 (desfavorável) para cada item, ao final somando-se os escores. Um escore combinado de 3 a 5 pontos foi designado grau 1; de 6 a 7 pontos é designado grau 2 e de 8 a 9 pontos, grau 3.

4.4. Procedimentos Imunoistoquímicos

Para realização dos estudos IMQs foi utilizado o tecido tumoral fixado em formalina e incluído em parafina. Os blocos foram seccionados na espessura de 3µm, desparafinados e reidratados para a realização da técnica. Foi utilizado o método ADVANCE™ HPR, da DAKO para detecção das proteínas: vimentina, E-cadherina, Citoqueratina 34BE12, Ki-67 e BRCA1. Para vimentina não foi realizado recuperação antigênica. Para E-cadherina, Citoqueratina 34BE12 e Ki-67 a recuperação antigênica foi realizada com citrato de sódio (pH 6,0) aquecido em banho-maria, (95-98°C) por 30 min, e para BRCA1 a recuperação antigênica foi realizada em Tris-EDTA (pH 9,0) aquecido em banho-maria, (95-98°C) por 30min. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, utilizando-se dois banhos de 10 min em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30V, a 5%, em metanol. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com BSA (Albumina de soro bovino) 1% por 1 hora. A incubação com os anticorpos primários realizou-se durante a noite, à temperatura de 4°C. A incubação com anticorpo secundário e anticorpo terciário foi realizada durante 40min à temperatura ambiente. Para controle negativo da técnica, foram utilizados os mesmos tecidos, incubados com os mesmos anticorpos, exceto o primário, que foi substituído por BSA 1%. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com o cromógeno DAB (diaminobenzidina). A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris; as lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética.

Imunoistoquímica

Anticorpo (clone)	Diluição	Fabricante	Controle positivo
Vimentina	1/400	DakoCytomation®	Tonsila palatina
Citoqueratina(34BE12)	1/200	DakoCytomation®	Tonsila palatina
Ki67	1/100	DakoCytomation®	Tonsila palatina
BRCA1 (policlonal)	1/100	Biogenex	Mama

4.5. Pareceres dos comitês de ética



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
Av. Francisco Trein, 590
CEP 91350-200 - Porto Alegre - RS
Fone: 3337.2000
CNPJ: 92.797.116/0001-20

HOSPITAL DA CRIANÇA CONCEIÇÃO
(Unidade Filial do Hospital Nossa
Senhora da Conceição S.A.)

HOSPITAL CRISTO REDEEMTOR S.A.
Rua Domingos Rubbo, 20
CEP 91040-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.4100
CNPJ: 92.787.176/0001-76

HOSPITAL FÊMINEA S.A.
Rua Montebello, 17
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3314.5200
CNPJ: 92.593.134/0001-53



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

O Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição (CEP/GHC), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS desde 31/10/1997, pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB0001105) e pelo FWA - Federalwide Assurance (FWA 00000378), em reunião extraordinária realizada em 27 de abril de 2011, reavaliou o seguinte projeto de pesquisa:

Projeto: 11-037

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

ADRIANA VIAL ROEHE

GRASIELA AGNES

DANIELE L. DOS REIS SCHNEIDER

ANDRÉA PIRES SOUTO DAMIN

Título: Câncer de mama: Estudo epidemiológico, de características clinicopatológicas e moleculares e fatores de risco.

Documentação: Aprovados

Aspectos Metodológicos: Aprovados

Aspectos Éticos: Aprovados

Parecer final: Este projeto, por estar de acordo com as Diretrizes e Normas Internacionais e Nacionais especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde, obteve o parecer de APROVADO.

Considerações Finais: Toda e qualquer alteração do projeto, deverá ser comunicada imediatamente ao CEP/GHC. Lembramos do compromisso de encaminhar dentro dos prazos estipulados, o(s) relatório(s) parcial(ais) e/ou final ao Comitê de Ética em Pesquisa do Grupo Hospitalar Conceição e ao Centro de Resultado onde a pesquisa for desenvolvida.

Daniel Demétrio Faustino da Silva
Coordenador-geral do CEP/GHC

Porto Alegre, 27 de abril de 2011.

**COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE****COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
UFCSPA**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFCSPA, registrado na Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) sob o nº 075/05 em 23/07/04, analisou o Projeto:

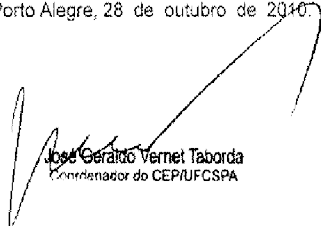
Projeto: 10-641**Versão do Projeto:****Versão do TCLE:****Pesquisadores:**

ADRIANA ROEHE
GRASIELA AGNES
CARMELA NICOLINI
BRUNA PEIXOTO DE SOUZA
TALITA HAUBERT CERUTTI
CLÁUDIO OSMAR PEREIRA ALEXANDRE

Título: CÂNCER DE MAMA: ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO, DE CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E MOLECULARES E FATORES DE RISCO,

Esse projeto foi aprovado em seus aspectos éticos e metodológicos conforme as Resoluções 196/09 e demais Resoluções complementares. Toda e qualquer alteração do projeto, assim como eventos adversos graves, deverão ser comunicados a este CEP. Os TCLE, quando necessários, somente poderão ser utilizados após prévia e explícita aprovação (carimbo) de sua redação por este CEP".

Porto Alegre, 28 de outubro de 2010.



José Gerardo Vernet Taborda
Coordenador do CEP/UFCSPA

