

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
ESCOLA POLITÉCNICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM TECNOLOGIA EM SAÚDE**

**MILENA MASSUMI KOZONOE**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE REPARO EM CÂNCER DE  
MAMA BILATERAL**

**CURITIBA**

**2021**

Dados da Catalogação na Publicação  
Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Sistema Integrado de Bibliotecas – SIBI/PUCPR  
Biblioteca Central  
Luci Eduarda Wielganczuk

K88a  
2021 Kozonoe, Milena Massumi  
Avaliação da expressão das proteínas associadas ao reparo de DNA em  
câncer de mama bilateral / Milena Massumi Kozonoe ; orientador: Sergio O.  
Ioshii. – 2021.  
64 f. : il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2021  
Bibliografia: 57-64

1. Mama – Câncer. 2. Instabilidade de microssatélites. 3. Reparo de DNA.  
4. Imunoterapia. I. Ioshii, Sergio O. II. Pontifícia Universidade Católica do  
Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde. II. Título.

CDD 20. ed. – 616. 99449

**MILENA MASSUMI KOZONOE**

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE REPARO EM CÂNCER DE  
MAMA BILATERAL**

Dissertação de Mestrado apresentada ao  
Curso de Pós-Graduação em Tecnologia  
em Saúde da Pontifícia Universidade  
Católica do Paraná como requisito parcial  
para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio O. Ioshii

**CURITIBA**

**2021**



ESCOLA  
**POLITÉCNICA**

**Pontifícia Pontifícia Universidade Católica do Paraná**  
**Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde**

### **TERMO DE APROVAÇÃO DE DISSERTAÇÃO Nº 292**

A Dissertação de Mestrado intitulada “**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DE REPARO EM CÂNCER DE MAMA BILATERAL**” defendida em sessão pública pelo(a) candidato(a) **Milena Massumi Kozonoe**, no dia **26 de fevereiro de 2021**, foi julgada para a obtenção do grau de Mestre em Tecnologia em Saúde, e aprovada em sua forma final, pelo Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Sergio Ossamu Ioshii – (PUCPR)

Prof. Dr. Edenir Inez Palmero – (Instituto de Pesquisa Pelé - Pequeno Príncipe)

Prof. Dr. Mauren Abreu de Souza – (PPGTS)

A via original deste documento encontra-se arquivada na Secretaria do Programa, contendo a assinatura da Coordenação após a entrega da versão corrigida do trabalho.

Curitiba, 29 de março de 2021

Prof. Dr. Percy Nohama  
**Coordenador do Programa de  
Pós-Graduação em Tecnologia  
em SaúdePUCPR**

Rua Imaculada Conceição, 1155, Prado Velho, CEP 80215-901, Curitiba – PR,  
BrasilTelefone: +55 41 3271-1657  
E-mail: ppgts@pucpr.br

*Dedico este trabalho à minha família, à  
minha filha Midori e ao meu orientador.*

## **AGRADECIMENTOS**

À minha mãe Ângela Sachiko Kozonoe, que sempre me deu apoio e a base que sempre precisei para cumprir com minhas obrigações. Me ensinou que para chegar em algum lugar devemos nos esforçar e nos dedicar de corpo e alma.

Ao meu marido Eduardo Kawano, que desde o início me apoiou e me incentivou a buscar meu propósito. Me ensinou que com dedicação e determinação conseguimos alcançar nossos objetivos.

À minha filha Laura Midori Kawano, que veio para me ensinar que com muito esforço conseguimos alcançar nossos sonhos. Muitas vezes precisamos correr contra o tempo, mas no final tudo dá certo. Fez com que minha dedicação fosse redobrada. Nasceu em um ano atípico e em um momento mais desafiador da minha vida.

Ao meu orientador prof. Dr. Sérgio O. Ioshii, que me mostrou que devemos levar a vida com mais leveza e calma, que as pedras que encontramos no caminho são só atalhos para nosso crescimento profissional, pessoal e espiritual. Sempre me ensinou a ter sabedoria e a enfrentar os desafios com mais paciência e conhecimento. Foi meu maior e principal incentivador para que eu chegasse até aqui. Agradeço sempre por tê-lo como companheiro de trabalho, como orientador e como conselheiro.

Aos meus amigos e colegas que me ajudaram a completar esse ciclo, principalmente a Jacqueline Justino Nabhen que me ensinou e me auxiliou muito nesse processo. Sem ela o caminho teria sido muito mais difícil.

*Ser feliz não é ter uma vida perfeita, mas  
deixar de ser vítima dos  
problemas e se tornar autor da  
própria história.*

Abraham Lincoln

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de mama bilateral é uma doença rara e pouco estudada comparada ao câncer de mama unilateral. Com o avanço nos métodos de detecção precoce, melhora nos resultados de tratamento e o emprego de terapia alvo, esse cenário vem se alterando, havendo necessidade de maior conhecimento sobre este grupo específico de doença. Do ponto de vista molecular o câncer de mama é uma das neoplasias mais estudadas na atualidade. Instabilidade de microssatélites tem sido pouco relatada nas neoplasias mamárias, tanto unilaterais quanto bilaterais. A instabilidade dos microssatélites é um fenótipo associado às alterações na função do sistema de reparo do DNA (*deficiency mismatch repair* - dMMR). A ausência de expressão imuno-histoquímica das proteínas associadas ao reparo do DNA correlaciona-se com dMMR e portanto possível instabilidade de microssatélites. Esta técnica tem sido amplamente utilizada na seleção inicial dos pacientes com estas características. Estas alterações estão presentes em vários tipos de câncer e as pessoas que apresentam neoplasias com dMMR respondem melhor à terapia imunológica, tornando-se um importante biomarcador na atualidade. O objetivo desse estudo é avaliar a expressão das proteínas associadas ao reparo do DNA pelo método da imuno-histoquímica e investigar a presença da dMMR nas pacientes portadoras de câncer de mama bilateral, correlacionando com dados epidemiológicos, status dos receptores hormonais, HER2 e índice proliferativo (Ki67). Foram investigadas 58 pacientes diagnosticadas com câncer de mama bilateral no Hospital Erasto Gaertner (Paraná, Brasil) no período entre 2005 a 2020. Foram excluídos os casos em que as amostras não tinham material suficiente para análise, os com tipo histológico carcinoma *in situ* e os casos em que a resposta ao tratamento foi completa não necessitando terapia complementar. Para determinar a presença de dMMR foram analisadas a expressão das proteínas associadas ao reparo MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6 pela técnica da imuno-histoquímica utilizando-se amostras de neoplasia contidas em blocos de parafina confeccionados com a técnica do microarranjo tecidual (*tissue microarray* - TMA). **Resultado:** Das 58 pacientes, quatro (6,9%) casos resultaram em ausência parcial de expressão. Em duas pacientes a ausência de expressão ocorreu bilateralmente podendo representar defeito germinativo e em duas pacientes a alteração foi unilateral podendo representar defeito somático. A alteração mais frequente foi a perda da expressão das proteínas MLH1 e PMS2 que ocorreu nos dois casos bilaterais e em um caso unilateral. Em um dos casos a perda da expressão foi unilateral e apenas da proteína PMS2. Não houve associação entre estas alterações e as características epidemiológicas, status hormonal, status do HER-2 e índice proliferativo (Ki67). **Conclusão:** Concluiu-se que cânceres de mama bilaterais apesar de raros podem apresentar-se com perda da expressão de proteínas relacionadas ao reparo do DNA e provável dMMR. Assim, esse grupo de pacientes podem se beneficiar com terapia imunológica para aumento de sobrevida, em especial dos casos avançados. A perda de expressão de proteínas relacionadas ao reparo do DNA em câncer de mama bilateral não está associado a padrões específicos. Assim, nossa sugestão é que todos os casos de câncer de mama bilateral devam ser analisados individualmente quanto a expressão de proteínas relacionadas ao reparo do DNA, pois a conduta terapêutica pode ser diferente para essas pacientes.

**Palavras chave:** Instabilidade de microssatélites; Proteínas de reparo; Câncer de mama bilateral; Câncer de mama; Imunoterapia

## ABSTRACT

**Introduction:** Bilateral breast cancer is a rare and poorly studied disease compared to unilateral breast cancer. With the advance in methods of early detection and improvement in treatment results and the use of targeted therapy, this scenario has been changing, requiring more knowledge about this specific group of diseases. From a molecular point of view, breast cancer is one of the most studied neoplasms today. Microsatellite instability has been little reported in breast cancer, both unilateral and bilateral. The instability of microsatellites is a phenotype associated with changes in the function of the DNA repair system (deficiency mismatch repair – dMMR). The absence of immunohistochemical expression of proteins associated with DNA repair is correlated with dMMR and therefore possible instability of microsatellites. These changes are present in several types of cancer and people with neoplasms with these characteristics respond better to immune therapy, making an important biomarker today. The aim of this study is to evaluate the expression of DNA repair proteins by immunohistochemistry and to investigate the presence of dMMR in patients with bilateral breast cancer, correlating with epidemiological data, the status of receptors hormones, HER2 and proliferative index (Ki67). 58 patients diagnosed with bilateral breast cancer were investigated at Hospital Erasto Gaertner (Paraná, Brazil) between 2005 and 2020. Cases in which the samples did not have enough material for analysis were excluded, those with histological type carcinoma in situ and cases in which the response to treatment was complete not needing complementary therapy. To determine the presence of dMMR, the expression of repair proteins MLH1, PMS2, MSH2, and MSH6 were analyzed by immunohistochemistry using neoplasia samples contained in paraffin blocks made using the tissue microarray technique (tissue microarray - TMA). **Result:** Of the 58 patients, four (6.9%) cases resulted in dMMR. In two patients, dMMR occurred bilaterally, which may represent a germ defect, and in two patients, the change was unilateral and could represent a somatic defect. The most frequent alteration was the loss of MLH1 and PMS2 expression, which occurred in both bilateral cases and one unilateral case. In one of the cases in which the dMMR was unilateral, the loss of expression was only of the PMS2 protein. There was no association between dMMR regarding epidemiological characteristics, hormonal and HER-2 status, and proliferative index (Ki67). **Conclusion:** It was concluded that bilateral breast cancers, although rare, can present with dMMR, and therefore patients can benefit from immunological therapy to increase survival. The dMMR in bilateral breast cancer is not associated with specific patterns and, therefore, all cases must be analyzed and thus patients have the chance of personalized therapy. Thus, investigating the instability of microsatellites in bilateral breast cancer is necessary, as the treatment approach may be different for these patients.

**Keywords:** Microsatellite instability; Repair proteins; Bilateral breast cancer; Breast cancer; Immunotherapy

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - Estimativa mundial das taxas de incidência do câncer de mama, todas as idades, em 2018 .....	23
Figura 2 - Taxas mundiais de mortalidade por câncer de mama, todas as idades, em 2018 .....	24
Figura 3 - Estimativa de novos casos de câncer de mama, nos Estados Unidos, em 2019 .....	25
Figura 4 - Estimativa de casos de mortes por câncer de mama, nos Estados Unidos, em 2019 .....	25
Figura 5 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil, estimados para 2018.....	26
Figura 6 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil, estimados para 2020.....	27
Figura 7 - Recomendações para detecção precoce e rastreamento segundo a localização do câncer .....	33
Figura 8: Coleta de dados 1 .....	45
Figura 9: Coleta de dados 2 .....	46
Figura 10: TMA.....	47
Figura 11 - Ilustração das proteínas de reparo sem perda da expressão .....	49
Figura 12 - Ilustração das proteínas de reparo com perda da expressão do MLH1 e PMS2, e sem perda da expressão do MSH2 e MSH6.....	53

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação do tumor primário, oitava edição do TNM (AJCC).....	35
Quadro 2 - Classificação do envolvimento regional dos linfonodos, oitava edição do TNM (AJCC).....	36
Quadro 3 - Classificação de metástases, oitava edição do TNM (AJCC) .....	37

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Taxas globais estimadas de incidência dos 10 principais tipos de câncer, ambos os sexos, todas as idades, em 2018.....	21
Gráfico 2 - Taxas globais estimadas de mortalidade dos 15 principais tipos de câncer, ambos os sexos, todas as idades, em 2018.....	22

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Número estimado de novos casos de câncer de mama, todas as idades, em 2018 .....	22
Tabela 2 - Número estimado de mortes por câncer de mama, todas as idades, em 2018 .....	23
Tabela 3 - Número de casos novos de câncer, por Estado, estimativa em 2020.....	27
Tabela 4 - Mortalidade conforme a localização primária do tumor, em mulheres, no Brasil, em 2017.....	28
Tabela 5 - Descrição do resultado do HER2 pelo teste de imuno-histoquímica.....	38
Tabela 6 - Avaliação da expressão das proteínas de reparo pela IHQ .....	40
Tabela 7 - Distribuição de frequência de perda de expressão de proteínas de reparo .....	50
Tabela 8 - Distribuição da Idade dividida em 4 grupos.....	51
Tabela 9 - Comparação histológica entre tumores bilaterais .....	51
Tabela 10 - Descrição dos casos com dMMR .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	<i>American Joint Committee</i>
CAP	Colégio Americano de Patologia
CEP	Comitê de ética e pesquisa
CEPEP	Centro de Projetos de Estudo e Pesquisa
dMMR	Deficiência das proteínas de reparo
EGFR	Receptor de fator de crescimento epidérmico
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FISH	Hibridização fluorescente <i>in situ</i>
HE	Hematoxilina e Eosina
HEG	Hospital Erasto Gaertner
HER2	Receptor de crescimento epidérmico humano
IARC	<i>International Agency for Research on Cancer</i>
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional de Câncer
Ki67	Índice proliferativo
LAP	Laboratório de Anatomia Patológica
MMR	Sistema de reparo
MS	Ministério da Saúde
MSI	Instabilidade de microssatélites
MSI-H	Alta instabilidade de microssatélites
NGS	Nova geração de sequenciamento
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDL1	Ligante de morte celular programada 1
PPGTS	Programa de Pós-Graduação em Tecnologia em Saúde
PUCPR	Pontifícia Universidade Católica do Paraná
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
OMS	Organização Mundial de Saúde
TMA	<i>Tissue microarray</i>
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>16</b>
<b>2 JUSTIFICATIVA</b> .....	<b>19</b>
<b>3 OBJETIVOS</b> .....	<b>20</b>
<b>3.1 OBJETIVO GERAL</b> .....	<b>20</b>
<b>3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS</b> .....	<b>20</b>
<b>4 CÂNCER DE MAMA NO MUNDO</b> .....	<b>21</b>
<b>5 CÂNCER DE MAMA NO BRASIL</b> .....	<b>26</b>
<b>6 CÂNCER DE MAMA BILATERAL</b> .....	<b>28</b>
<b>7 RASTREAMENTO DO CÂNCER DE MAMA</b> .....	<b>32</b>
<b>8 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA</b> .....	<b>34</b>
<b>9 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES</b> .....	<b>39</b>
<b>10 MÉTODOS</b> .....	<b>43</b>
<b>10.1 DESENHO E SELEÇÃO DAS PACIENTES</b> .....	<b>43</b>
10.1.1 Critérios de Inclusão: .....	43
10.1.2 Critérios de Exclusão: .....	43
<b>10.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS</b> .....	<b>43</b>
<b>10.3 MATERIAIS</b> .....	<b>44</b>
<b>10.4 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO</b> .....	<b>46</b>
10.4.1 Dados da Imuno-histoquímica .....	47
<b>11 ANÁLISE DOS RESULTADOS</b> .....	<b>50</b>
<b>12 DISCUSSÃO</b> .....	<b>54</b>
<b>13 CONCLUSÃO</b> .....	<b>57</b>
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	<b>58</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Globalmente, o câncer acomete 8,5 milhões de mulheres e mata mais de 7 milhões de pessoas, entre homens e mulheres, por ano. (SOUZA et al., 2017; Bray, et al., 2018; IARC, 2020). A estimativa no Brasil para 2020, publicado no mês de maio deste mesmo ano, da incidência do câncer em homens foi de 309.750 e 316.280 em mulheres (INCA, 2020).

Em 2018, só o câncer de mama foi diagnosticado em mais de 2 milhões de mulheres em todo o mundo, ocupando segundo lugar, de todos os cânceres, perdendo apenas para o câncer de pulmão e a primeira posição entre os cânceres que acometem apenas as mulheres (SOUZA et al., 2017; Bray, et al., 2018; IARC, 2020).

No Brasil, é o tipo de câncer que mais matam as mulheres. Segundo o Ministério da Saúde (MS), no biênio 2018-2019, houve um risco estimado de 56,33 novos casos a cada 100 mil mulheres (SOUZA et al., 2017; INCA., 2018). A estimativa da incidência só para o câncer de mama no Brasil em 2020 foi de 66.280 correspondendo a 29,7% de todos os cânceres entre as mulheres. Em todas as regiões do Brasil a incidência do câncer de mama ocupa a primeira posição, entretanto, estimou-se que as regiões que tiveram o maior risco foram Sudoeste e Sul, com 81,06 e 71,16 por 100 mil mulheres, respectivamente. No Paraná a taxa estimada foi de 47,96 casos para cada 100.000 mulheres, o que corresponde a 3470 novos casos. (INCA, 2020). O prognóstico da doença é dependente de múltiplos fatores que incluem o estadiamento, os métodos de tratamento neoadjuvante e adjuvante e as características da neoplasia (ABREU, KOIFMAN, 2002; HUIYAN, 2006; NAROD, 2014).

O câncer de mama bilateral é uma doença rara. Estima-se que ocorra em aproximadamente 7% das mulheres com câncer de mama, em um período de 10 anos. O risco para as mulheres com câncer de mama de desenvolver uma segunda neoplasia primária é de 2 a 6 vezes maior do que o risco da população em geral. Os cânceres bilaterais de mama podem ser subdivididos em sincrônicos, quando a segunda neoplasia é detectada em até 12 meses a partir da primeira neoplasia, e metacrônico, quando a segunda neoplasia é detectada após 12 meses do diagnóstico da primeira neoplasia (HUO et al., 2011). É imprescindível realizar o diagnóstico

diferencial entre uma segunda neoplasia mamária primária de um câncer metastático para a mama. Neste sentido, características morfológicas e imuno-histoquímicas (IHQ) auxiliam no diagnóstico diferencial (GONG, et al., 2007; NITA, et al., 2009; DÍAZ, et al., 2012; BAKER, et al., 2013; LIZARRAGA, et al., 2013).

Os fatores de risco para o câncer de mama bilateral incluem pacientes jovens, tumores multicêntricos no primeiro diagnóstico, nuliparidade, carcinoma lobular invasivo, exposição à radiação, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e história familiar de câncer de mama. Pacientes com mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 têm um risco anual de 2 a 6% a mais de desenvolver um segundo câncer de mama e um risco de 50-60% de ser acometido por um segundo câncer de mama até os 70 anos de idade. Além disso, estadió clínico e tumoral, tamanho do tumor e acometimento linfonodal influenciam no risco de desenvolvimento de câncer de mama bilateral. A terapia hormonal, por outro lado, está associada à redução do risco de um segundo câncer de mama (DÍAZ et al., 2012; BAKER et al., 2013; LIZARRAGA et al., 2013).

O diagnóstico de câncer de mama é realizado a partir de exames de imagem e anatomopatológico. Após a confirmação, fatores prognósticos e preditivos devem ser avaliados pelo exame de IHQ. A avaliação da expressão do receptor hormonal de estrógeno (RE), receptor hormonal de progesterona (RP), receptor de crescimento epidérmico humano (HER2) e índice proliferativo (Ki67) são pré-requisitos para indicação do tratamento (AJCC, 2017). A partir do resultado do exame de IHQ, associado a evolução clínica da paciente, o tratamento é direcionado. Existem outros biomarcadores, como o PDL-1, que também podem auxiliar na escolha do tratamento nessas pacientes, porém não é preconizado como exame de rotina no câncer de mama. Outros tipos de cânceres também possuem biomarcadores que devem ser pesquisados, como no câncer colorretal. A avaliação da instabilidade de microssatélites é indicada para todos os pacientes, pois quando o tumor é instável, o tratamento pode ser diferente do habitual (KAWAKAMI et al., 2015).

A instabilidade de microssatélites (MSI) é caracterizada como sequências curtas e repetidas de 1 a 6 nucleotídeos e é o resultado do acúmulo de mutações que levam a inativação dos genes que realizam o reparo do DNA (*mismatch repair system* – MMR). As instabilidades de microssatélites são encontradas esporadicamente no

câncer colorretal e endometrial. Apesar de não serem freqüentes no câncer de mama, estudos apontam que no câncer de mama bilateral a incidência pode ser maior (DIETMAIER et al.,1997; KULIGINA et al., 2006; HAUSE et al., 2016). A MSI está intimamente correlacionada com a perda da expressão das proteínas que fazem o reparo do DNA. A perda da expressão dessas proteínas pode ser diagnosticada pelo método da imuno-histoquímica e determinar se o tumor é deficiente ou não, denominando como deficiência das enzimas de reparo (dMMR) (DIETMAIER W, et al. 1997).

A dMMR no câncer de mama, e principalmente no bilateral, ainda é um assunto pouco abordado e estudado. A incidência é baixa, porém acredita-se que com o desenvolvimento de novas tecnologias, a tendência é diagnóstico cada vez mais precoce, assim como melhores tratamentos, aumentando a sobrevida dessas pacientes, o que pode resultar no aumento da incidência do câncer de mama bilateral e a MSI nesses tumores (BERNSTEIN et al., 2003). Esse é o primeiro estudo em pacientes do sul do Brasil e tem como objetivo avaliar a expressão de proteínas relacionadas ao sistema de reparo do DNA, que podem sugerir MSI, propor novos estudos e direcionar novas possibilidades de tratamento para essas pacientes.

## 2 JUSTIFICATIVA

Pacientes com câncer de mama bilateral quando diagnosticadas precocemente podem ter uma taxa de sobrevida mais alta comparadas com as que são diagnosticadas após os sintomas. Com o avanço de melhores tecnologias para sua detecção precoce somados aos melhores tratamentos, a tendência é de termos um aumento na incidência do câncer contralateral (BERNSTEIN et al., 2003).

Atualmente os receptores hormonais e HER2 são biomarcadores mandatórios para direcionarem o tratamento ideal (FISHER et al., 1981). Existem outros biomarcadores em estudo, incluindo as proteínas de reparo para pesquisa das instabilidades de microssatélites (FUSCO et al., 2018).

Estudos apontam que a instabilidade de microssatélites, apesar de não serem frequentes no câncer de mama, podem ter incidência aumentada no câncer de mama bilateral (DIETMAIER et al., 1997; KULIGINA et al., 2006; HAUSE et al., 2016). Em 2017 o tratamento com pembrolizumab, um inibidor de *checkpoint*, teve aprovação pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (*US Food and Drug Administration FDA*) em qualquer tumor que tenha MSI-H ou dMMR comprovada por algum método de detecção. Portanto, pacientes com câncer de mama bilateral que tenham MSI-H ou dMMR comprovada, podem se beneficiar com os inibidores de *checkpoint* (FDA, 2017; LI, 2020).

Essa pesquisa tem como objetivo avaliar a expressão das proteínas relacionadas à dMMR no câncer de mama bilateral correlacionando com dados clínicos, perfil hormonal, status do HER2 e índice proliferativo (Ki67). Tem como proposta utilizar o método da IHQ para a detecção da expressão das proteínas. A IHQ é um método com bom custo benefício e de fácil acesso à população por ser encontrado em vários laboratórios de patologia e auxilia na seleção de pacientes elegíveis para o estudo molecular.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Analisar a expressão das proteínas relacionadas ao reparo do DNA pelo método da imuno-histoquímica, em mulheres que foram diagnosticadas com câncer de mama bilateral no Hospital Erasto Gaertner de Curitiba-PR.

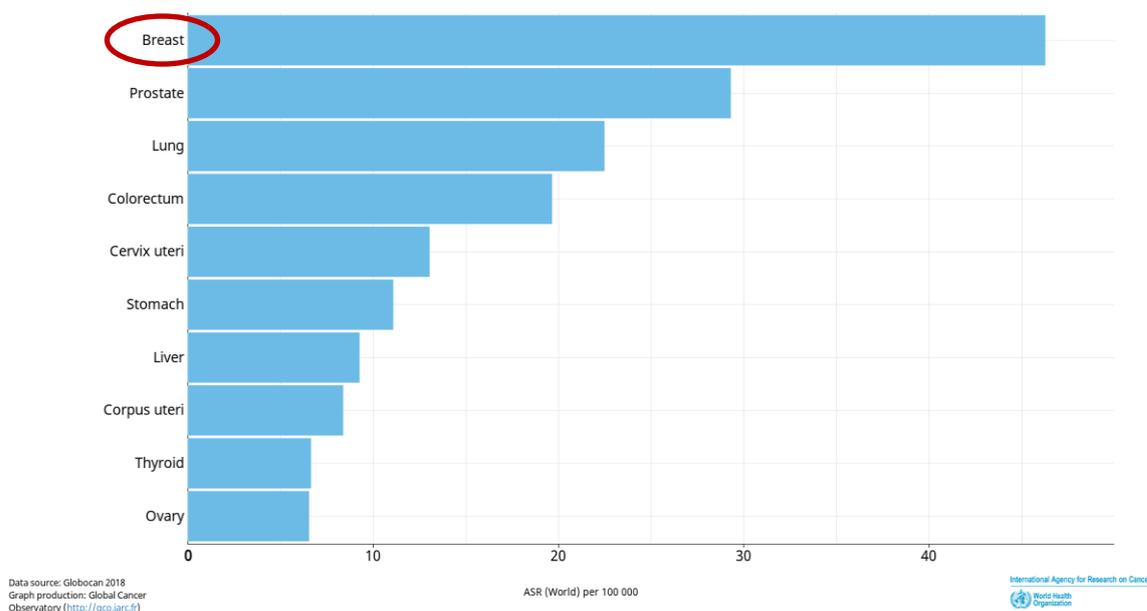
#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- a) analisar a expressão das proteínas relacionadas ao reparo do DNA - MLH1, PMS2, MSH2, MSH6 - pelo método da imuno-histoquímica;
- b) correlacionar os achados da expressão com status hormonal, HER2 e Ki67;
- c) correlacionar os achados da expressão com idade;
- d) correlacionar os achados da expressão com os tipos histológicos do câncer de mama

## 4 CÂNCER DE MAMA NO MUNDO

O câncer de mama, em termos de incidência, ocupa a primeira posição global (46,3 casos a cada 100.000 pessoas) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018) (gráfico 1).

Gráfico 1 - Taxas globais estimadas de incidência dos 10 principais tipos de câncer, ambos os sexos, todas as idades, em 2018

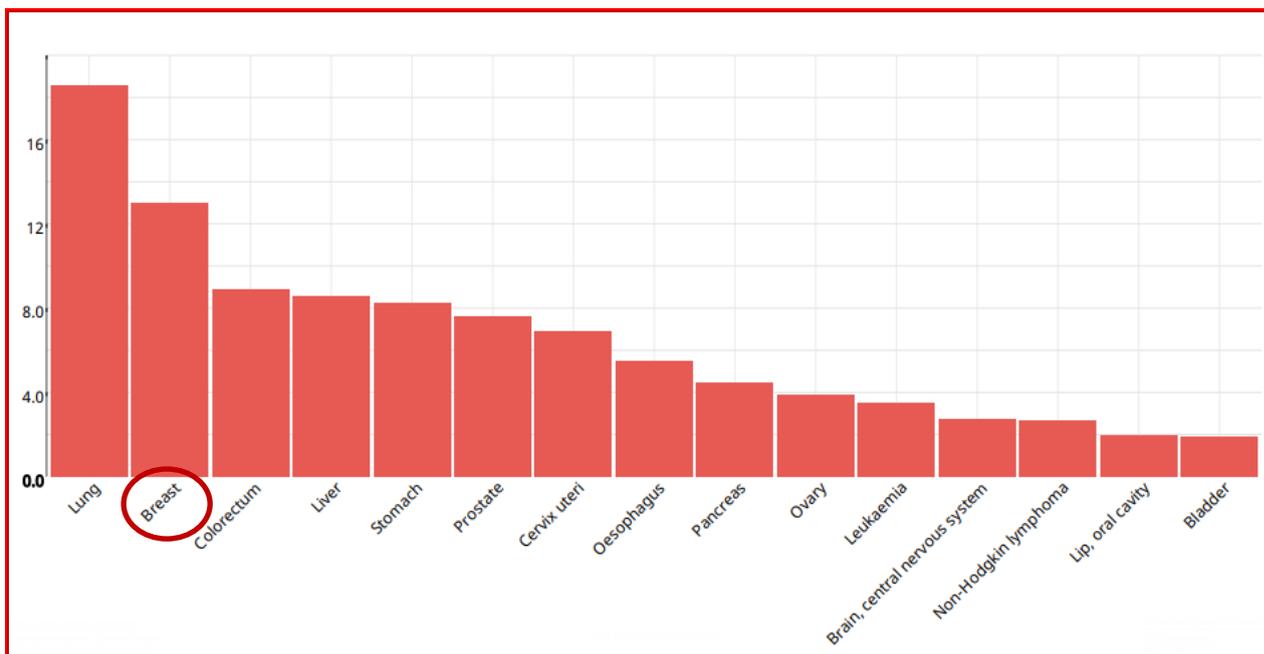


Fonte: (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

No ano de 2018, a incidência mundial de câncer de mama foi de 2,1 milhões correspondendo a 24,2 % do total de casos e atingiu 626.679 óbitos, sendo a causa mais frequente de morte, correspondendo a 15% entre todos os tipos de câncer entre as mulheres (WHO, 2020; INCA, 2020).

Em relação a taxa de mortalidade global para ambos os sexos, o câncer de mama chegou a 13%, correspondendo a segunda posição, ficando atrás apenas do câncer de pulmão (gráfico 2) (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

Gráfico 2 - Taxas globais estimadas de mortalidade dos 15 principais tipos de câncer, ambos os sexos, todas as idades, em 2018



Fonte: (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018).

As estimativas de novos casos de câncer de mama em relação aos continentes em 2018, evidenciou que os continentes asiático e europeu concentraram 1.433.527 (68,62%) dos casos de câncer de mama em todo o mundo (tabela 1).

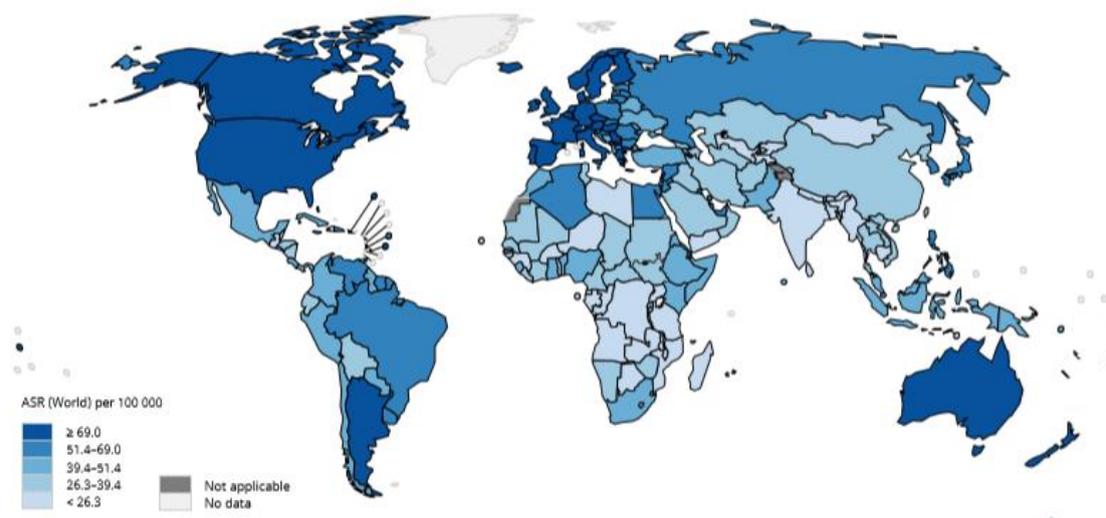
Tabela 1 - Número estimado de novos casos de câncer de mama, todas as idades, em 2018

Continente	Número de casos
Ásia	911.014
Europa	522.513
América do Norte	262.347
América Latina e Caribe	199.734
África	168.690
Oceania	24.551

Fonte: (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018)

O panorama mundial de incidência do câncer de mama, mostrou que os países com maiores incidências neste tipo de neoplasia, a cada 100.000 pessoas, no ano de 2018, foram: Bélgica (113,2), Luxemburgo (109,3), Holanda (105,9) e França (99,1). Os países que apresentaram as menores incidências de câncer de mama foram: Butão (5,0), República da Gâmbia (6,9), Mongólia (11,3) e Tajikistão (14,8). No Brasil, a incidência reportada foi de 62,9 casos a cada 100.000 pessoas (figura 1).

Figura 1 - Estimativa mundial das taxas de incidência do câncer de mama, todas as idades, em 2018



Fonte: (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018)

Os continentes asiático e europeu, concentraram 448.284 (71,53%) dos casos de óbitos por câncer de mama (tabela 2).

Tabela 2 - Número estimado de mortes por câncer de mama, todas as idades, em 2018

<b>Continente</b>	<b>Número de mortes</b>
Ásia	310.577
Europa	137.707
América do Norte	74.072
América Latina e Caribe	52.558
África	46.963
Oceania	4.802

Fonte: (INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER, 2018)



Figura 3 - Estimativa de novos casos de câncer de mama, nos Estados Unidos, em 2019

Estimated New Cases	Male					Female		
Prostate	174,650	20%		Breast	268,600	30%		
Lung & bronchus	116,440	13%		Lung & bronchus	111,710	13%		
Colon & rectum	78,500	9%		Colon & rectum	67,100	7%		
Urinary bladder	61,700	7%		Uterine corpus	61,880	7%		
Melanoma of the skin	57,220	7%		Melanoma of the skin	39,260	5%		
Kidney & renal pelvis	44,120	5%		Thyroid	37,810	4%		
Non-Hodgkin lymphoma	41,090	5%		Non-Hodgkin lymphoma	33,110	4%		
Oral cavity & pharynx	38,140	4%		Kidney & renal pelvis	29,700	3%		
Leukemia	35,920	4%		Pancreas	26,830	3%		
Pancreas	29,940	3%		Leukemia	25,860	3%		
<b>All sites</b>	<b>870,970</b>			<b>All sites</b>	<b>891,480</b>			

Fonte: (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019)

Em relação à estimativa de óbitos por câncer de mama, a Sociedade Americana do Câncer, estimou que em 2019, nos Estados Unidos, tiveram 41.760 mortes por câncer de mama entre as mulheres, correspondendo a 15% de todos os tipos de câncer (figura 4) (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Figura 4 - Estimativa de casos de mortes por câncer de mama, nos Estados Unidos, em 2019

Estimated Deaths	Male					Female		
Lung & bronchus	76,650	24%		Lung & bronchus	66,020	23%		
Prostate	31,620	10%		Breast	41,760	15%		
Colon & rectum	27,640	9%		Colon & rectum	23,380	8%		
Pancreas	23,800	7%		Pancreas	21,950	8%		
Liver & intrahepatic bile duct	21,600	7%		Ovary	13,980	5%		
Leukemia	13,150	4%		Uterine corpus	12,160	4%		
Esophagus	13,020	4%		Liver & intrahepatic bile duct	10,180	4%		
Urinary bladder	12,870	4%		Leukemia	9,690	3%		
Non-Hodgkin lymphoma	11,510	4%		Non-Hodgkin lymphoma	8,460	3%		
Brain & other nervous system	9,910	3%		Brain & other nervous system	7,850	3%		
<b>All sites</b>	<b>321,670</b>			<b>All sites</b>	<b>285,210</b>			

Fonte: (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019)

## 5 CÂNCER DE MAMA NO BRASIL

O câncer de mama é o tipo da doença mais comum entre as mulheres no mundo e no Brasil, depois do de pele não melanoma, correspondendo cerca de 25% dos casos novos a cada ano (INCA, 2018). O INCA estimou para 2018, que no Brasil, seriam diagnosticados 59.700 novos casos de câncer de mama e que é o tipo de câncer mais frequente nas mulheres, correspondendo um total de 29,5% entre outros tipos de câncer (figura 5).

Figura 5 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes, por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil, estimados para 2018

Homens			Mulheres		
Localização Primária	Casos	%	Localização Primária	Casos	%
Próstata	68.220	31,7%	Mama Feminina	59.700	29,5%
Traqueia, Brônquio e Pulmão	18.740	8,7%	Cólon e Reto	18.980	9,4%
Cólon e Reto	17.380	8,1%	Colo do Útero	16.370	8,1%
Estômago	13.540	6,3%	Traqueia, Brônquio e Pulmão	12.530	6,2%
Cavidade Oral	11.200	5,2%	Glândula Tireoide	8.040	4,0%
Esôfago	8.240	3,8%	Estômago	7.750	3,8%
Bexiga	6.690	3,1%	Corpo do Útero	6.600	3,3%
Laringe	6.390	3,0%	Ovário	6.150	3,0%
Leucemias	5.940	2,8%	Sistema Nervoso Central	5.510	2,7%
Sistema Nervoso Central	5.810	2,7%	Leucemias	4.860	2,4%

Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018)

Os números representaram um risco de 56,33 casos novos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2018). Para esse ano de 2020, estimam-se 66.280 mil novos casos de câncer de mama, correspondendo a 29,7% de outros tipos de câncer no sexo feminino (figura 6).

Figura 6 - Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes por sexo, exceto pele não melanoma, no Brasil, estimados para 2020

Localização Primária	Casos	%			Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%	Homens	Mulheres	Mama feminina	66.280	29,7%
Cólon e reto	20.520	9,1%			Cólon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020)

Se contextualizarmos a incidência do câncer de mama por estados brasileiros nesse ano, o estado de São Paulo ocupa o primeiro no ranking com 27,57%, seguido do estado do Rio de Janeiro e Minas Gerais, com 13,80% e 12,44%, respectivamente. Já Roraima é o estado com a menor incidência no Brasil, com 0,09%. O Paraná fica em quinto lugar, com 5,23% (tabela 3).

Tabela 3 - Número de casos novos de câncer, por Estado, estimativa em 2020

Estados	Próstata	Mama Feminina	Cólon e Reto	Traqueia, Brônquio e Pulmão	Estômago	Colo do Útero	Cavidade Oral
Acre	120	100	50	100	90	90	20
Amapá	100	70	20	50	80	90	30
Amazonas	480	450	210	320	380	580	100
Pará	930	780	470	560	860	780	220
Rondônia	310	220	130	180	120	130	60
Roraima	70	60	30	30	30	50	20
Tocantins	760	290	170	220	100	220	60
Alagoas	890	620	230	250	160	300	190
Bahia	6.130	3.460	1.480	1.170	1.150	1.090	750
Ceará	3.330	2.510	1.090	1.290	1.270	1.010	640
Maranhão	1.850	840	450	470	440	890	170
Paraíba	1.740	1.120	440	490	430	290	380
Pernambuco	2.630	2.390	960	1.120	830	730	550
Piauí	1.370	590	330	320	180	390	130
Rio Grande do Norte	1.570	1.130	470	420	450	310	300
Sergipe	1.060	530	310	230	180	240	190
Distrito Federal	840	730	490	420	240	260	150
Goiás	2.240	1.620	1.160	940	550	590	460
Mato Grosso	1.030	560	330	320	220	200	150
Mato Grosso do Sul	1.240	850	540	460	310	270	220
Espírito Santo	1.380	790	520	530	390	240	300
Minas Gerais	6.420	8.250	4.000	2.990	2.460	1.270	1.620
Rio de Janeiro	6.440	9.150	5.070	2.930	1.660	1.640	1.560
São Paulo	13.650	18.280	14.670	6.890	4.880	2.250	4.300
Paraná	3.560	3.470	2.480	1.990	1.390	990	910
Rio Grande do Sul	3.980	4.050	2.540	3.740	1.090	720	660
Santa Catarina	1.720	3.370	2.350	1.770	1.290	970	1.050
Brasil	65.840	66.280	40.990	30.200	21.230	16.590	15.190

\*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2020)

Em relação à mortalidade do câncer de mama no Brasil, estimou-se que em 2017, foi o principal responsável por casos de óbitos (16.724 casos), representando 16,1% do total de casos de câncer (tabela 4).

Tabela 4 - Mortalidade conforme a localização primária do tumor, em mulheres, no Brasil, em 2017

<b>Localização Primária</b>	<b>Óbitos</b>	<b>%</b>
Mama	16.724	16,1%
Traqueia, Brônquios e Pulmões	11.792	11,4%
Cólon e Reto	9.660	9,3%
Colo do útero	6.385	6,2%
Pâncreas	5.438	5,2%
Estômago	5.107	4,9%
Localização primária desconhecida	4.714	4,6%
Fígado e Vias biliares intra-hepáticas	4.292	4,1%
Sistema Nervoso Central	4.401	4,2%
Ovário	3.879	3,7%
<b>Todas neoplasias</b>	<b>103.583</b>	<b>100,0%</b>

Fonte: (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018).

A partir desses dados é possível entender o impacto que essa doença atinge as mulheres não só no Brasil, mas em todo o mundo.

## 6 CÂNCER DE MAMA BILATERAL

O câncer de mama bilateral é uma doença rara. A incidência em mulheres ao longo de sua vida varia de 0,5 a 1,0% (SAMANT, 2001). Estima-se que ocorra em aproximadamente 7% das mulheres que já foram diagnosticadas com câncer de mama, dentro de um período aproximadamente de 10 anos. O risco para as mulheres

com câncer de mama de desenvolver uma segunda neoplasia primária é de 2 a 6 vezes maior do que o risco da população em geral e a chance desse segundo tumor ser contralateral é de 30 a 50% (SOERJOMATARAM et al, 2005; GONG et al., 2007; NITA et al., 2009; DÍAZ et al., 2012; BAKER et al., 2013; LIZARRAGA et al., 2013; DIAZ et al, 2012). A incidência do tumor contralateral pode reduzir em 30 a 50% quando o tratamento do primeiro tumor foi com tamoxifeno, porém se a paciente foi submetida a radioterapia, essa incidência pode aumentar ao longo de 10 anos (RUTQVIST, 1991; HARTMAN et al. 2005). É imprescindível realizar o diagnóstico diferencial entre uma segunda neoplasia mamária primária de um câncer metastático para a mama. Neste sentido, características morfológicas e imuno-histoquímicas auxiliam no diagnóstico diferencial (SOERJOMATARAM et al., 2005; GONG et al., 2007; NITA et al., 2009; DÍAZ et al., 2012; BAKER et al., 2013; LIZARRAGA et al., 2013).

Huo et al., analisaram 30.617 pacientes com câncer bilateral durante um período de 17 anos e mostraram que devem ser considerados como tumores sincrônicos quando o diagnóstico do contralateral é realizado em até 12 meses e metacrônico, acima de 12 meses (HUO et al., 2011). Os tumores sincrônicos são menos frequentes comparados aos metacrônicos. Os tumores metacrônicos são diagnosticados ao longo do acompanhamento das pacientes que tiveram o primeiro diagnóstico de câncer de mama (DÍAZ et al., 2012).

Os fatores de risco para o câncer de mama bilateral incluem pacientes jovens e tumores multicêntricos no primeiro diagnóstico, nuliparidade, carcinoma lobular invasivo, exposição à radiação, mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 e história familiar de câncer de mama. Pacientes com mutações nos genes BRCA1 e BRCA2 têm um risco anual de 2 a 6% a mais de desenvolver um segundo câncer de mama e um risco de 50 a 60% de ser acometido por um segundo câncer de mama até os 70 anos de idade. Além disso, estadió clínico e tumoral, tamanho do tumor, acometimento linfonodal tratamento com radioterapia influenciam no risco de desenvolvimento de câncer de mama bilateral. A terapia hormonal e a quimioterapia, por outro lado, estão associadas à redução do risco de um segundo câncer de mama (HOONING et al., 2008; DÍAZ et al., 2012; BAKER et al., 2013; LIZARRAGA et al., 2013). No estudo do Vaittinen e Hemminki (2000) mostraram estatisticamente que a idade jovem, com

relação aos outros fatores de risco, é o mais consistente para o desenvolvimento do câncer contralateral (VAITTINEN et al, 2000).

Hartman et al (2005) avaliaram 138.372 pacientes no período de 30 anos que tiveram o diagnóstico de câncer de mama. Esse estudo teve como objetivo mostrar a incidência do câncer de mama bilateral correlacionando a idade e o tempo desde o diagnóstico do primeiro câncer. No resultado, mostraram que pacientes na pré-menopausa (abaixo dos 45 anos) tiveram uma incidência maior do que as mulheres após a menopausa. Nenhum marcador clínico foi encontrado nos tumores contralaterais, porém histórico familiar, idade jovem no primeiro diagnóstico, tipo histológico lobular invasor, foram fatores que influenciaram no aumento do risco. Com relação aos tumores metacrônicos, na pré-menopausa, concluíram que as mutações genéticas pudessem ter influência, impactando negativamente, diferente nos tumores sincrônicos, que foram encontradas em mulheres mais idosas, onde as mutações esporádicas podem estar mais relacionadas (HARTMAN et al, 2005). A detecção precoce, ou seja, antes do aparecimento dos sintomas do câncer contralateral é de extrema importância visto que pode impactar significativamente na sobrevivência dessas pacientes. O acompanhamento rotineiro com exame de mamografia é indicado, na tentativa de se detectar precocemente os contralaterais ( LU W. et al., 2009.; LU WL. et al., 2009).

Nia et al. (2009), num estudo retrospectivo de 89 casos, descreveram que no carcinoma sincrônico a idade média de aparecimento foi aos 62 anos e a forma de apresentação clínica mais comum foram nódulos palpáveis em 77% dos casos. Em pacientes com carcinomas metacrônicos, a idade média de início do primeiro tumor foi de 48 anos, com um intervalo médio entre o diagnóstico do primeiro e do segundo tumor de 102 meses, e a forma de apresentação clínica como nódulo palpável em 68% dos casos (NITA et al., 2009).

Díaz et al. (2012), num estudo retrospectivo, longitudinal, dos casos de câncer de mama bilateral em hospital universitário na Espanha, afirmaram que a história natural do câncer de mama bilateral é mal compreendida e não encontraram relação do tratamento hormonal do primeiro tumor com o aparecimento do segundo tumor. Entre 3757 pacientes tratados por câncer de mama na Instituição, identificaram 3,2% casos de câncer bilateral de mama, sendo 2,4% metacrônicos, e 0,8% sincrônicos. Após análise do histórico evolutivo, chegaram à conclusão de que as diferenças

morfológicas não foram significativas, entretanto descreveram que o câncer de mama sincrônico foi menos frequente, porém foi observado em uma população mais idosa e com histórico familiar de câncer de mama. Um período menor do que 5 anos a partir do primeiro tumor, negatividade para RE e neoplasias com grau histológico 3 foram considerados como fatores prognósticos não favoráveis. Não foram encontradas diferenças com relação a sobrevida entre os tumores sincrônicos e metacrônicos, e sugeriram que métodos de imagens das mamas contralaterais devem fazer parte do acompanhamento para detecção, diagnóstico e tratamento precoce (DÍAZ et al., 2012).

Segundo Lizarraga et al. (2013), a incidência de carcinoma de mama bilateral diminuiu tanto nos Estados Unidos como na Europa nos últimos 30 anos, e isso é atribuído, pelo menos em parte, aos avanços na terapia adjuvante do câncer primário. O risco anual para a mulher na pós-menopausa com câncer de mama RE positivo é estimado em 0,1% a 0,4%. A idade, o status dos receptores hormonais, a história familiar e o tratamento adjuvante afetam o risco, e não está claro exatamente como todos esses fatores interagem para influenciar nas chances de uma mulher desenvolver doença contralateral. Além disso, não parece que o risco de vida de uma mulher permaneça constante, mas pode ser atenuado pelo tempo, especialmente quando o câncer é diagnosticado em pacientes jovens (com menos de 50 anos de idade). Relataram ainda que na última década observou-se aumento nas taxas de mastectomia e aumento de mastectomia profilática contralateral. Muitos fatores influenciam nesta decisão, incluindo a percepção de que uma melhor simetria pode ser obtida com a mastectomia bilateral associada a reconstrução imediata, o desejo de evitar futuras mamografias e biópsias, e a preocupação de que o câncer se desenvolva na mama oposta. As duas últimas razões são frequentemente declaradas pelos pacientes como um desejo de "nunca ter que passar por isso novamente" (LIZARRAGA et al., 2013).

A melhora da expectativa de vida após o tratamento do câncer de mama e o uso rotineiro de mamografia contralateral resultaram em aumento do número de casos de câncer bilateral de mama, em especial nas formas mais precoces. Estudos das características clínicas e morfológicas desta entidade podem contribuir na identificação de fatores associados e das características que indiquem maior risco ao

surgimento da segunda neoplasia mamária (INTRA et al., 2004; BAYKARA et al., 2012; PADMANABHAN, 2015).

O tratamento realizado inicialmente nas pacientes com câncer de mama, pode ser um fator de risco importante para o desenvolvimento do tumor contralateral. Há pelo menos duas classes de quimioterápicos utilizados para tratar outros tipos de câncer que podem promover a perda da função das proteínas de reparo do DNA, como a 06-metilguanina e tiopurina metiltransferase. Pacientes com diagnóstico de leucemia mieloide e alguns tumores cerebrais, podem se beneficiar recebendo tratamento quimioterápico com essas classes, porém após o tratamento podem evoluir com a instabilidade de microssatélite. Pacientes com diagnóstico de linfoma de Hodgkin, que recebem tratamento com a radioterapia podem evoluir com um câncer primário de pulmão. (ALLAN, 2005) Ainda não há estudos que comprovem a associação do tratamento inicial do câncer de mama com o tumor contralateral, porém partindo de que cada vez mais o tratamento do câncer de mama tem evoluído e cada vez mais as mulheres estão tendo uma sobrevida maior, a chance de desenvolver o contralateral se torna, conseqüentemente mais alta e essa associação de quimioterápicos e radioterapia evoluindo com um segundo tumor primário, deve ser considerada e estudada.

## **7 RASTREAMENTO DO CÂNCER DE MAMA**

A incidência do câncer de mama tem aumentado na maioria das regiões do mundo. Entretanto, nos países altamente desenvolvidos, atingiu uma estabilidade seguida de queda na última década. Ainda nesses países, as taxas de mortalidade apresentaram um declínio desde o final da década de 1980 e início de 1990, refletindo uma combinação de melhoria na detecção precoce, por meio de rastreamento populacional, e intervenções terapêuticas mais eficazes (STEWART, 2014).

O diagnóstico do câncer de mama acontece em estágios variados, porém quando são diagnosticados nos estágios avançados da doença, aumenta a morbidade relacionada ao tratamento, comprometendo a qualidade de vida e reduzindo a sobrevida dos pacientes. No intuito de modificar esse cenário, o controle do câncer de mama tem sido uma das prioridades na agenda da Política Nacional de Saúde no

Brasil. Assim, o Ministério da Saúde, por meio da população “Diretrizes para a Detecção Precoce do Câncer de Mama no Brasil”, recomenda a identificação da doença em estágios iniciais por intermédio das estratégias de detecção precoce, pautadas nas ações de rastreamento e diagnóstico precoce. A mamografia bienal para as mulheres na faixa etária de 50 a 69 anos é a estratégia de rastreio indicada, enquanto o diagnóstico precoce é formado pelo tripé: população em alerta para os sinais e sintomas suspeitos; profissionais de saúde capacitados para avaliar os casos suspeitos; e sistemas e serviços de saúde preparados para garantir a confirmação diagnóstica oportuna e com qualidade (INTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ DE ALENCAR GOMES DA SILVA, 2015).

O Brasil adota as recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) para o rastreamento do câncer, nos quais os únicos tipos de câncer com recomendações e orientações para a detecção precoce são: câncer de mama, câncer do colo do útero, câncer de cólon e reto e câncer de cavidade oral (BRASIL, 2019) (figura 7).

Figura 7 - Recomendações para detecção precoce e rastreamento segundo a localização do câncer

Localização do câncer	Recomendações para detecção precoce	
	Diagnóstico precoce	Rastreamento
Mama	Sim	Sim <sup>a</sup>
Colo do útero	Sim	Sim
Cólon e reto	Sim	Sim <sup>b</sup>
Cavidade oral	Sim	Sim
Pulmão	Não	Não
Próstata	Sim	Não
Estômago	Sim	Não
Pele (melanoma e não melanoma)	Sim	Não

Fonte: (BRASIL, 2019)

Políticas públicas, fácil acesso às informações sobre o câncer, neste caso o câncer de mama, e conscientização da população sobre a importância do diagnóstico precoce são pontos importantes para maior sobrevivência das pacientes.

## 8 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE MAMA

Para o diagnóstico do câncer de mama, quando é detectado um nódulo suspeito, seja pela própria paciente ou pelo médico durante o exame físico, a recomendação do ministério da saúde é a realização de exame de imagem, seja ultrassonografia, ressonância magnética ou mamografia. A confirmação é feita por biópsia, que consiste na retirada de um fragmento do tumor, que é a análise do tecido, e punção aspirativa por agulha fina (PAAF), que é a análise das células. O material é estudado pelo patologista que faz a confirmação diagnóstica (INCA, 2019).

As principais manifestações clínicas do câncer de mama são: nódulo fixo e geralmente indolor (90%), alteração da coloração e textura da pele, podendo às vezes ter sinais de retração, saída de secreção pelo mamilo e nódulos na axila (INCA, 2019). Esses sinais e sintomas podem variar e dependem do grau de evolução do tumor, podendo ser assintomático no estágio inicial.

O estadiamento do câncer de mama baseia-se no tamanho do tumor e no sistema TNM (tumor, nódulo e metástase). Tumores com até 2,0 cm entram no estadio I, de 2,0 a 5,0 cm estadio II, maiores do que 5,0 cm estadio III e quando há metástase para outros órgãos o estadio é IV (quadro 1).

Este sistema tem como base a avaliação de três componentes: tumor (T), nódulo (N) e metástase (M) (INCA, 2004):

- T: extensão do tumor primário;
- N: ausência ou presença de metástase em linfonodos regionais;
- M: ausência ou presença de metástase à distância.

O objetivo do estadiamento TNM é fornecer uma descrição do câncer que pode ser facilmente comunicada a outros profissionais. Além disso, pode auxiliar nas decisões de tratamento e servir como um indicador de prognóstico. Também é útil na comparação de casos, principalmente, no que diz respeito aos resultados associados a diferentes opções terapêuticas. Na prática clínica, o estadiamento TNM é utilizado combinando as características clínicas do paciente e, em alguns casos, com as características moleculares do próprio tumor, com a intenção de orientar a avaliação prognóstica e a definição do tratamento (AJCC, 2018).

Quando o câncer de mama é diagnosticado, fatores prognósticos e preditivos devem ser avaliados pelo exame de IHQ. A avaliação da expressão dos receptores hormonais de estrógeno (RE), progesterona (RP) e HER2 são fundamentais para indicação do tratamento (AJCC, 2018).

A oitava edição da *American Joint Committee (AJCC)*, classifica o câncer de mama segundo a classificação do tumor primário (quadro 1), classificação do envolvimento regional dos linfonodos (quadro 2) e classificação de metástases (AJCC, 2018) (quadro 3).

Quadro 1 - Classificação do tumor primário, oitava edição do TNM (AJCC) (continua)

<b>T: Tumor primário clínico e patológico</b>	
Tx	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis (DCIS)	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
Tis (Paget)	Doença de Paget do mamilo sem associação com carcinoma invasivo e/ou carcinoma <i>in situ</i> (CDIS) no parênquima mamário subjacente. Carcinoma no parênquima mamário associados a Doença de Paget são categorizados pelo tamanho e características da doença do parênquima, embora a presença da Doença de Paget deverá mesmo assim ser mencionada.
T1	Tumor < 20 mm na maior dimensão
T1 mi	Tumor < ou igual a 1 mm na maior dimensão
T1a	Tumor > 1 mm e igual ou < 5 mm na maior dimensão (aproximadamente qualquer medida de 1,0-1,9 mm a 2 mm).
T1b	Tumor > 5 mm e igual ou < 10 mm na maior dimensão
T1c	Tumor > 10 mm e igual ou < 20 mm na maior dimensão
T2	Tumor > 20 mm e igual ou < 50 mm na maior dimensão
T3	Tumor > 50 mm na maior dimensão
T4	Tumor de qualquer tamanho com extensão para parede torácica e/ou pele (ulceração ou nódulos macroscópicos); apenas invasão da derme não qualifica como T4

Fonte: (AJCC , 2018)

Quadro 2 - Classificação do envolvimento regional dos linfonodos, oitava edição do TNM (AJCC)

<b>N: envolvimento regional dos linfonodos, patológico</b>	
pNx	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
pN0	Sem metástase de linfonodos regionais ou apenas células tumorais isoladas
pN0(i+)	Apenas células tumorais isoladas (agrupamentos de células malignas não maior do que 0,2 mm) no linfonodo regional
pN0(mol+)	Achados moleculares positivos pela transcriptase reversa (RT-PCR); células tumorais isoladas não detectadas
N1	Micrometástase; ou metástase em 1 a 3 linfonodos axilares; e/ou nódulos mamários internos negativos clinicamente com micrometástase ou biópsia de linfonodo sentinela com macrometástase
N1 mi	Micrometástase (aproximadamente 200 células ou medida maior do que 0,2 mm e menor do que 2,0 mm)
pN1a	Metástase em 1 a 3 linfonodos axilares com uma metástase com pelo menos 2,0 mm
pN1b	Metastástase em linfonodo sentinela mamário interno ipsilateral, excluindo células tumorais isoladas.
pN1c	pN1a e pN1b combinado
N2	Metástases em 4 a 9 linfonodos axilares; ou linfonodo mamário interno positivo ipsilateral pela imagem e ausência de metástase em linfonodo axilar
N2a	Metástases em 4 a 9 linfonodos axilares (pelo menos 1 depósito tumoral maior do que 2,0 mm)
N2b	Metástase detectado clinicamente em linfonodo mamário interno com ou sem confirmação microscópica; com linfonodos axilares negativos patologicamente
N3	Metástases em mais de 10 linfonodos axilares; ou linfonodo infraclavicular (nível 3); ou linfonodo mamário interno positivo pela imagem e a presença de um ou mais linfonodos do nível I, II positivo; ou mais de 3 linfonodos axilares e micrometástase ou macrometástase pela biópsia do linfonodo sentinela clinicamente negativo em linfonodo mamário interno
N3a	Metástases em mais de 10 linfonodos axilares (com uma metástase com pelo menos 2,0 mm); ou metástase em linfonodo infraclavicular (nível 3)
N3b	pN1a ou pN2a na presença de N2b (linfonodo mamário interno positivo pela imagem)
N3c	Metástase em linfonodo supraclavicular ipsilateral

Fonte: (AJCC , 2018)

Quadro 3 - Classificação de metástases, oitava edição do TNM (AJCC)

<b>M: Metástase distante</b>	
M0	Sem metástase distante
M1	Metástase distante presente

Fonte: (AJCC , 2018)

Ao final de todos os laudos anatomopatológicos, insere-se o estadiamento patológico, o que auxilia o mastologista e o oncologista na determinação do melhor tratamento para a paciente.

Após a confirmação do diagnóstico de câncer pelo exame anatomopatológico, é necessária a avaliação prognóstica e preditiva através do exame de IHQ na amostra. Avaliam-se os receptores hormonais de estrógeno (RE), progesterona (RP), receptor de crescimento epidérmico humano (HER2) e índice proliferativo (Ki67). A partir do resultado do exame de IHQ o tratamento para a paciente é direcionado. O benefício do tratamento hormonal em pacientes com receptores RE e RP positivos já é estabelecido na literatura e corresponde a maioria dos cânceres de mama (HAMMOND, et al, 2010). A oncoproteína HER2 é um receptor de crescimento epidérmico humano e faz parte da família do receptor de fator de crescimento epidérmico (EGFR). Tem expressão elevada e amplificação em 15 a 30% dos cânceres de mama, observado em tipos histológicos mais agressivos comparado aos outros tipos histológicos. Pacientes que tem expressão positiva e amplificação do HER2 podem se beneficiar com a droga transtuzumabe, que é um anticorpo monoclonal, podendo ser associado ou não a quimioterapia (LYNDSAY, et al, 2007).

O material retirado para a análise, biópsia ou peça cirúrgica, deve ser submerso em solução de formalina tamponada para fixação logo após a coleta da amostra, por um período mínimo de 6 horas e no máximo de 72 horas, em um volume adequado (tecido/solução 1:20). Evitar o tempo de isquemia do material é necessário para um resultado adequado, evitando assim exames falsos-negativos (HAMMOND, et al., 2010, FRAGOMENI et al., 2018). O tempo de tolerância preconizada entre a retirada da amostra até sua imersão em solução de formalina tamponada, é de no máximo 1 hora (HADI et al., 2008, FRAGOMENI et al., 2018). A má fixação da biópsia e da peça cirúrgica pode levar a resultados falsos-negativos na IHQ (YILDIZ-AKTAS, 2012).

Considera-se marcação positiva do RE e do RP quando há pelo menos 1% de marcação no núcleo das células neoplásicas, podendo chegar a 100%. Essa porcentagem deve ser descrita no laudo anatomopatológico, assim como sua intensidade, variando de fraca, moderada a forte (HAMMOND et al., 2010; FRAGOMENI et al., 2018). Aproximadamente 75 a 80% dos tumores de mama são RE e RP positivos, principalmente os carcinomas invasivos, bem e moderadamente diferenciados (HAMMOND et al., 2010). A marcação do HER2 é classificada em escores conforme a tabela 5.

Tabela 5 - Descrição do resultado do HER2 pelo teste de imuno-histoquímica

<b>Resultado</b>	<b>Crítérios</b>
Negativo (escore 0)	Nenhuma marcação observada ou marcação incompleta e fraca em menos de ou igual a 10% das células tumorais.
Negativo (escore 1+)	Marcação incompleta e fraca em pelo menos 10% das células tumorais.
Inconclusivo (escore 2+)	Marcação das membranas, fraca a moderada, em pelo menos 10% das células tumorais ou marcação intensa das membranas em menos de 10% das células tumorais.
Positivo (escore 3+)	Marcação em toda a circunferência das membranas em pelo menos 10% das células tumorais.

Fonte: (CAP, 2019)

Resultando o exame inconclusivo ou positivo, recomenda-se a avaliação da amplificação do gene HER2 pelo teste de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) (WOLFF et al., 2018).

O marcador Ki67 é uma proteína de marcação nuclear que avalia o índice proliferativo das células tumorais em todos os ciclos de proliferação celular. É utilizado para avaliação do grupo prognóstico, mas ainda não há uma definição clara com

relação a baixa ou alta expressão. É descrita nos laudos em porcentagem da positividade nuclear das células tumorais (DOWSETT et al., 2011).

## 9 INSTABILIDADE DE MICROSSATÉLITES

A instabilidade de microssatélites (MSI) foi primeiramente descrita em 1993, por Boland e colaboradores, em um subconjunto de câncer colorretal (BOLAND et al., 1998). No DNA existem locais onde há pequenas e repetidas sequências de nucleotídeos, variando de 1 a 6, chamados de microssatélites. Para cada indivíduo, esses microssatélites podem variar em localizações e diversas sequências. Quando mutações ocorrem nesses locais, o sistema de reparo (MMR), que são codificadas pelos principais genes *MLH1*, *MSH2*, *MSH6*, *PMS2*, faz o ajuste desses erros. Esses 4 genes, codificam 4 proteínas que recebem as mesmas identificações e atuam como heterodímeros: MLH1 com o PMS2 e o MSH2 com o MSH6. No momento em que esses genes de reparo se tornam deficientes e param de realizar sua função, as mutações vão se acumulando e podem ocasionar as dMMR/MSI, sendo uma consequência da oncogênese (DIETMAIER et al., 1997; KULIGINA et al., 2006).

São encontradas esporadicamente no câncer colorretal e endometrial, porém são infrequentes no câncer de mama. Ekatherina et al (2006) comparou, a partir de estudo molecular, 52 pacientes com diagnóstico de câncer de mama unilateral e 71 pacientes com diagnóstico de câncer de mama bilateral encontrando instabilidade de microssatélite (MSI) em 10% dos casos de bilateralidade e nenhuma instabilidade nos cânceres unilaterais (KULIGINA et al., 2006).

MSI pode ser observado em tumores esporádicos e hereditários. Nos hereditários, temos a síndrome de Lynch que é encontrada em um grupo de pacientes com câncer colorretal que têm variantes germinativas patogênicas nos genes do sistema MMR. Nos casos dos esporádicos, podemos encontrar em outros tipos de tumores, como os de origem mamária. A inativação de genes MMR pode ocorrer devido a presença de mutações somáticas ou aos eventos epigenéticos, como a hipermetilação do promotor do gene *MLH1* (por exemplo, associado à mutação somática BRAF V600E), inativação epigenética de *MSH2* ou regulação negativa de genes MMR por microRNAs (HERMAN et al., 1998; HENDRIKS et al., 2006;

LIGTENBERG et al., 2009; LI et al., 2020).

Dung et al., estudaram 32 diferentes tipos de tumores sólidos e concluíram que desses, 11 mostraram deficiência nas proteínas de reparo (LE DT et al., 2017). Para o diagnóstico dos tumores instáveis, utilizam-se características clínicas e histológicas, e pesquisa das alterações nos tecidos, podendo ser utilizados a IHQ, nova geração de sequenciamento (*next generation sequencing* – NGS) e a reação em cadeia pela polimerase (PCR). A análise feita por métodos moleculares, como NGS e PCR são mais utilizados, por ter uma acurácia mais elevada 92 a 94,6% e 100%, respectivamente, comparada ao método da IHQ, com acurácia de 89 a 95%. A vantagem da IHQ é por ser um exame mais acessível, tanto pela disponibilidade em diversos serviços, como em termos de custo (CHEAH et al., 2019; LI et al., 2020). Além disso há alta correlação entre os tumores com perda da expressão proteica e instabilidade de microssatélites (*MSI-High* - MSI-H) e quando comparados possuem prognósticos similares (MUELLER et al., 2009).

Pela técnica da IHQ, a pesquisa é feita com 4 anticorpos que identificam especificamente as proteínas de reparo MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6. Como atuam como heterodímeros, a análise é feita sempre em pares MLH1 com o PMS2 e MSH2 com o MSH6. Se há perda da expressão do MLH1, o PMS2 também perde sua expressão e da mesma forma ocorre com o outro par MSH2 e MSH6. A perda isolada da expressão pode ocorrer com o PMS2 e MSH6 (tabela 6) (HENDRKS et al., 2006; PENA-DIAZ, et al., 2016).

Tabela 6 - Avaliação da expressão das proteínas de reparo pela IHQ

<b>EXPRESSÃO PELA IHQ</b>			
MHL1	PMS2	MSH2	MSH6
-	-	+	+
+	-	+	+
+	+	-	-
+	+	+	-

Fonte: a autora, 2021

Pelo método do PCR, o painel de microssatélites recomendado pelo Instituto Nacional do Câncer, compreendem cinco marcadores: 2 mononucleotídeos (BAT25, BAT26) e 3 multinucleotídeos (D5S346, D2S123, D17S250). Tumores instáveis para 2 ou mais dos 5 marcadores são considerados tumores com MSI-H (GRYFE et al., 2000; LI et al., 2020).

Os tumores com MSI possuem maior quantidade de linfócitos intratumorais e têm uma série de acúmulos de mutações, como consequência, maior número de mutações adquiridas comparados aos tumores estáveis, resultando em tumores mais imunogênicos. Essas características mostram que esses tumores podem resultar na expressão positiva da proteína PDL1 (SLOAN et al., 2017). Em 2017, a agência federal do Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (*US Food and Drug Administration FDA*), aprovou o tratamento com pembrolizumab, um inibidor de *checkpoint*, em qualquer tumor que tenha dMMR ou MSI-H comprovada por algum método de detecção (FDA, 2017; LI et al., 2020).

Em 2017, em um estudo abordando 86 pacientes e 12 tipos de cânceres, mostrou a hipótese da eficácia no tratamento com inibidor de *checkpoint* nos tumores que resultaram com MSI (LE et al., 2017). Em outros dois estudos, um com câncer colorretal e outro com câncer de endométrio, mostraram que o anticorpo PDL1 foi mais expresso quantitativamente nos tumores com MSI do que os tumores estáveis, o que indica a possibilidade de resposta de tratamento com os inibidores de *checkpoint* (ROSENBAUN et al., 2016; SLOAN et al., 2017). No contexto dos tumores com MSI, o câncer colorretal é o mais frequente, porém já foram observados em outros tumores em uma frequência variada. A frequência de MSI em tumores mamários é extremamente baixa, variando de 0% a 1,5%, porém já foi encontrada uma maior incidência (0 a 33%) (OZER et al., 2002; HAUSE et al., 2016; BONNEVILLE et al., 2017). Kuligina et al., em 2006, realizou um estudo com 71 pacientes com diagnóstico de câncer de mama bilateral, comparando com grupo controle de 52 pacientes com diagnóstico de câncer de mama unilateral. O método de detecção foi por PCR e encontrou 10% de MSI-H nos tumores contralaterais metacrônicos, 05% nos sincrônicos e nenhuma nos unilaterais. (KULIGINA et al., 2006).

Por ser um tema que ainda não está bem elucidado na literatura, esse estudo poderá trazer novos incentivos. O tratamento com pembrolizumab pode ser utilizado

em tumores com MSI ou com dMMR. Portanto, não existe a necessidade da confirmação da MSI pelo método molecular. Ao detectar a dMMR pelo método da IHQ, é possível realizar o tratamento com essa medicação. Esse estudo é o único realizado com pacientes brasileiras com diagnóstico de câncer de mama bilateral e detectado pelo método da IHQ. Este, por ser uma exame de custo acessível e que pode ser encontrado em muitos serviços, é considerado o método de escolha, possibilitando acesso à toda população brasileira que recebem esse diagnóstico.

## **10 MÉTODOS**

### **10.1 DESENHO E SELEÇÃO DAS PACIENTES**

O presente trabalho trata-se de uma pesquisa não experimental, analítica e retrospectiva realizado em hospital com foco no tratamento oncológico. Foram selecionadas amostras de pacientes com diagnóstico de câncer de mama bilateral do laboratório de patologia (LAP) no Hospital Erasto Gaertner da Liga Paranaense de Combate ao Câncer (HEG – LPCC), localizado em Curitiba – PR, no período entre 2005 a 2020. Estas pacientes foram acompanhadas e tratadas, onde realizaram biópsias e/ou ressecções cirúrgicas no próprio Hospital Erasto Gaertner.

#### **10.1.1 Critérios de Inclusão:**

- Pacientes diagnosticadas com câncer de mama bilateral, metacrônico e sincrônico;
- Amostras referentes à biópsias e peças cirúrgicas.

#### **10.1.2 Critérios de Exclusão:**

- Pacientes com diagnóstico do tipo histológico “in situ”;
- Pacientes com resposta completa após tratamento;
- Amostras com escassa quantidade de tumor.

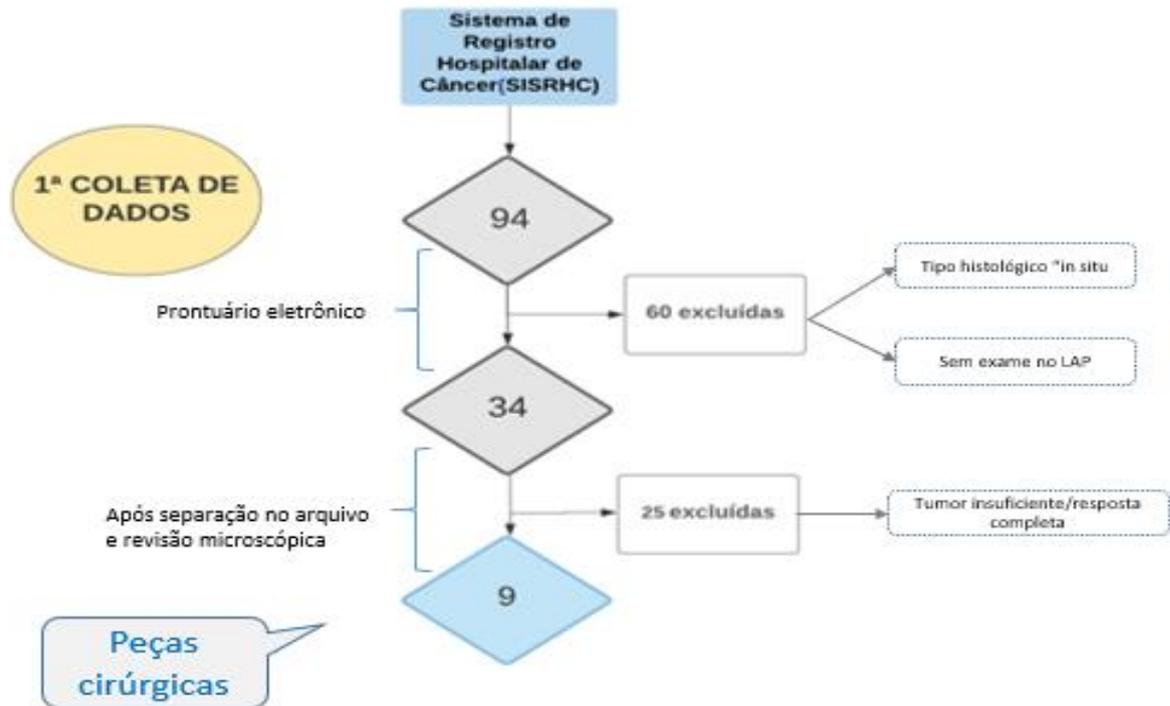
### **10.2 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Esse estudo foi submetido e aprovado pelo CEP Centro de Projetos de Estudo e Pesquisa (CEPEP) do HEG registrado com o CAAE 09593219.6.0000.0098. Todas as informações coletadas das pacientes foram mantidas em sigilo absoluto e de responsabilidade dos pesquisadores.

### 10.3 MATERIAIS

A primeira coleta de dados foi extraída do Sistema de Registro Hospitalar de Câncer (SISRHC) pelo setor de estatística do (HEG), desenvolvido e disponibilizado pelo INCA. Por se tratar de um estudo sobre câncer de mama bilateral, foram selecionadas as pacientes cujos registros apresentaram duas vezes o CID referente ao diagnóstico de câncer de mama e foi encontrado 94 pacientes. A partir dessa lista, onde contemplava apenas o nome das pacientes, foi realizada a segunda etapa da coleta de dados, porém no prontuário eletrônico do HEG (sistema Tasy) do HEG, onde foi extraído o número dos exames anátomo-patológicos do LAP, idade, data do procedimento, tipo do procedimento, tipo histológico, tratamento neoadjuvante quando realizado, estadiamento e o número do exame de imuno-histoquímica quando presente. No primeiro momento optamos por selecionar apenas amostras de peças cirúrgicas (mastectomias, setorectomias e quadrantectomias) no intuito de garantir maior quantidade de tumor, excluindo as que tinham apenas amostras de biópsias. Após a análise dos dados enquadrados para o estudo, com os critérios de exclusão, o número de pacientes reduziu para 34. A separação dessas 34 amostras (blocos de parafina, lâminas histológicas e de imuno-histoquímica) para avaliação, foi realizada na empresa terceirizada, localizado em Campo Largo-PR onde ficam armazenadas amostras dos anos anteriores a 2019, com as devidas políticas e normas da empresa. As lâminas foram revisadas por dois patologistas e das 34 pacientes, apenas 9 das amostras estavam elegíveis para o estudo (Figura 8). As demais foram descartadas pelos critérios de exclusão.

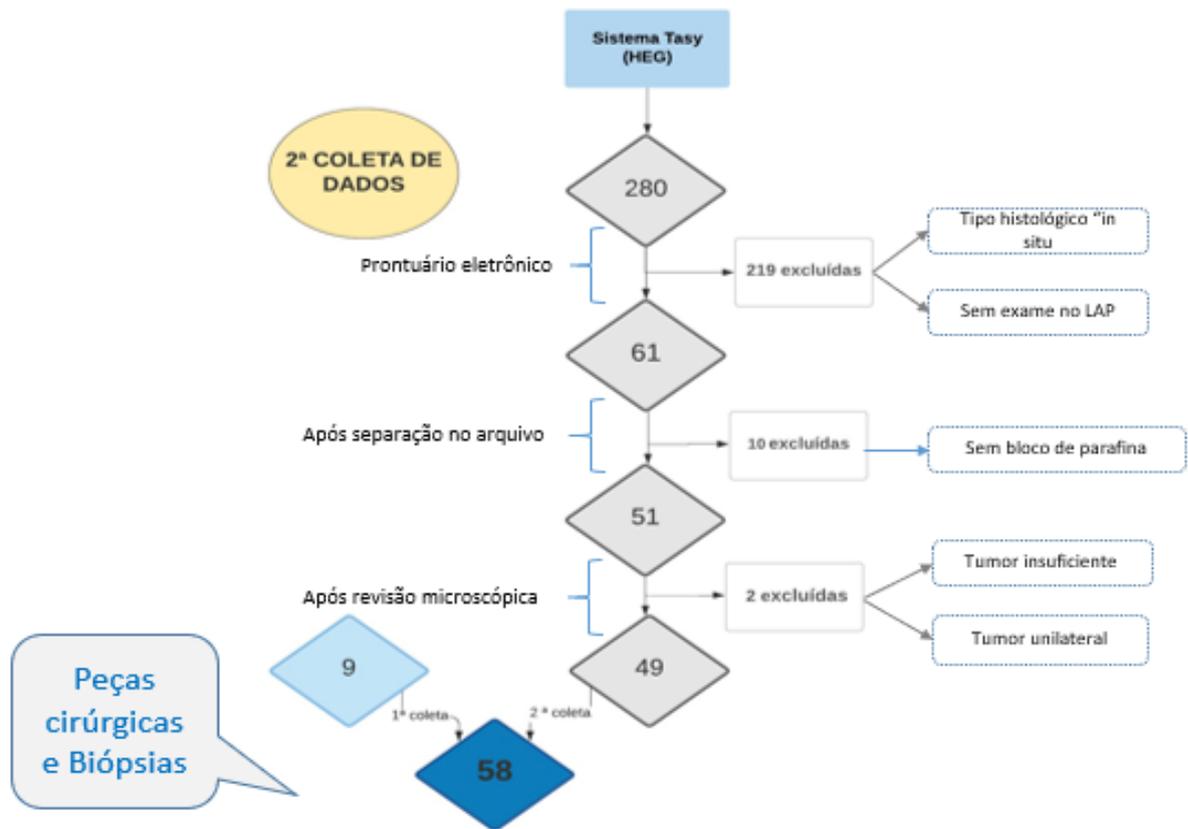
Figura 8: Coleta de dados 1



Fonte: a autora

Devida à redução significativa da quantidade de amostras optou-se por tentar outro método de coleta de dados, porém pelo próprio prontuário eletrônico do HEG, o sistema Tasy. Após discutir com o mastologista do HEG foi sugerido uma nova coleta a partir de códigos de procedimentos específicos e registrados no Tasy pelos cirurgiões após as cirurgias. Os códigos utilizados foram para os procedimentos de mastectomias com linfadenectomia, mastectomia simples, quadrantectomias e setorectomias em oncologia e procedimentos sequenciais em oncologia. Dessa lista, totalizaram 280 pacientes. Por ser tratar de câncer de mama bilateral, foram selecionadas apenas pacientes que tinham mais de um código e novamente foi realizada a segunda etapa da coleta de dados com as mesmas informações da primeira coleta. Após a segunda coleta, somadas as 9 pacientes iniciais, resultaram 70 pacientes, ressaltando que nessa segunda coleta para a análise das lâminas, foram incluídas pacientes que tinham também amostras de biópsias e não apenas peças cirúrgicas na tentativa de conseguir mais pacientes para o estudo (Figura 9).

Figura 9: Coleta de dados 2



Fonte: a autora

Todos os dados foram tabelados em planilha no Excel. As lâminas e os blocos de parafina dessas 70 pacientes foram novamente retiradas na empresa terceirizada com as devidas políticas e normas. 10 pacientes foram excluídas nessa etapa por não ter blocos de parafina das duas mamas. Após análise das 60 lâminas, 2 foram excluídas. Uma por não ter neoplasia em um dos lados da mama e a outra por não ter tumor suficiente para análise, resultando em 58 pacientes para o estudo.

#### 10.4 PROCEDIMENTO METODOLÓGICO

Para a realização do exame IHQ, optou-se pela técnica de arranjo em matriz, conhecido em inglês como *tissue microarray* (TMA) (Figura 10). É um método amplamente utilizado, validado e descrito na literatura. (JOURDAN et al., 2003). A partir de um molde, são feitos blocos de parafina com espaços cilíndricos de 3,0 mm de diâmetro, totalizando 35. Com punch dermatológico do mesmo diâmetro, é feito a

coleta das amostras de tumor, no bloco de parafina das pacientes. A área tumoral foi determinada a partir da análise da lâmina correspondente, sendo marcada com caneta de retroprojeter para comparação no bloco de parafina e extração exata do local. Os cilindros coletados são inseridos nos espaços vazios no bloco de parafina feito pelo molde. Foram coletadas de 2 a 4 áreas tumorais, de cada bloco de parafina (cada paciente tinha de 1 a 3 blocos com tumor), resultando 12 blocos de parafina (TMA). O registro de cada espaço no bloco de TMA foi tabelado no Excel.

Figura 10: TMA



Fonte: a autora

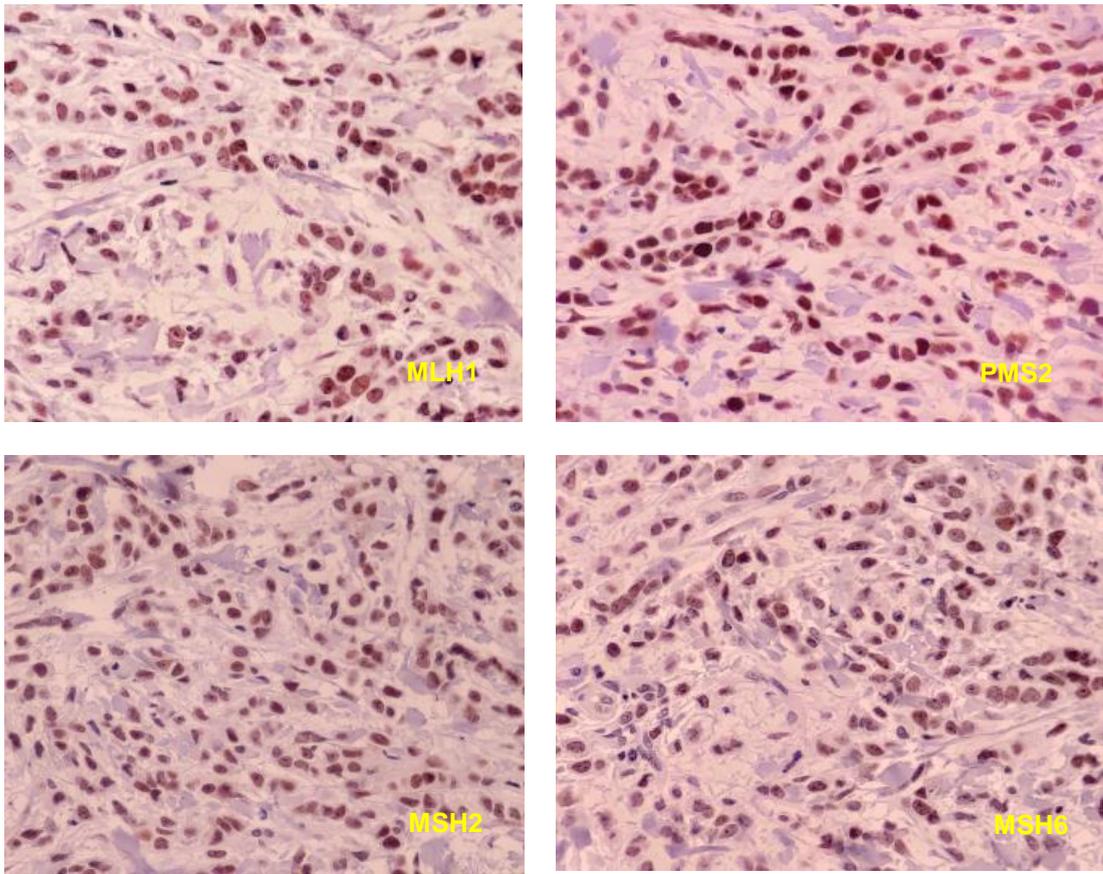
#### 10.4.1 Dados da Imuno-histoquímica

O método da IHQ realizado no bloco de parafina, com material previamente fixado em formalina tamponada. A partir do bloco de parafina, são feitos cortes com espessuras de 04 micrômetros, colocados em lâminas especiais (silanizadas e/ou eletricamente carregadas). Os anticorpos podem ser: monoclonais (camundongo e coelho) ou policlonais (coelhos, porcos, cabras, ovelhas entre outros). O método da IHQ é feito através do reconhecimento do local do antígeno utilizando o anticorpo. Essa ligação é amplificada por um sistema a base de polímeros que através de ligações enzimáticas (Peroxidase Horseradish) é visualizada com revelador DAB (3,3

diaminobenzidina tetracloreto) que em presença de peróxido de hidrogênio produz uma coloração castanho-dourado. Esse método é altamente sensível e inibidor de ligações inespecíficas. Ao final, as lâminas são coradas com hematoxilina para se obter o contraste do que não foi corado com o anticorpo. Ao analisar a lâmina de IHQ, deve-se estar atento ao controle, podendo ser interno (quando é positivo no próprio corte do material a ser analisado) ou externo (quando é feito um corte de outro material e colocado na mesma lâmina). Esse controle é importante no intuito de certificar que a reação realmente está correta e evitar exames falso-negativos.

Foi realizada a IHQ para detecção da dMMR, perfil hormonal, status HER2 e Ki67 nos 12 blocos de TMA, resultando em 96 lâminas. Os anticorpos utilizados foram: MLH1 (clone M1), PMS2 (clone A16-4), MSH2 (clone G219-1129), MSH6 (clone SP93), RE (clone SP1), RP (clone 1E2), HER2 (clone 4B5) e Ki67 (clone 43). Para confiança da análise dos marcadores, utilizou-se controle externo. Na figura 11 mostra a positividade das proteínas de reparo, ou seja, sem perda da expressão. Considerou-se sem perda da expressão das proteínas de reparo quando foi positiva em pelo menos 10% da amostra e com perda da expressão quando negativa em 100% da amostra. Para os receptores hormonais, seguiu-se o mesmo critério. Para o status do HER2, considerou-se positivo quando marcação positiva em toda membrana em mais de 10% da amostra, inconclusivo quando forte em menos de 10% da amostra ou fraca a moderada em toda a membrana e negativa quando não teve marcação em 100% da amostra. O índice proliferativo (Ki67) foi estimada a porcentagem das células positivas com relação a quantidade total de células tumorais na amostra e foi classificado em acima ou igual a 14% e abaixo de 14%.

Figura 11 - Ilustração das proteínas de reparo sem perda da expressão



Fonte: a autora

## 11 ANÁLISE DOS RESULTADOS

Foram selecionados todos os registros duplicados, a partir dos códigos de procedimentos (mastectomias com linfadenectomia, mastectomia simples, quadrantectomias e setorectomias em oncologia e procedimentos sequenciais em oncologia) do setor de estatística do Hospital Erasto Gaertner no período entre 2005 a 2020. Após seleção de casos de câncer bilateral com material (blocos de parafina) disponível e revisão histológica, chegou-se ao número de 58 casos. 48 (50%) eram sincrônicos e 48 (50%) metacrônicos. Dessas 58 pacientes, em 4 foi detectada ausência de expressão de grupo de proteínas de reparo (expressão negativa), com frequência relativa de 6,9%. (Tabela 7)

Tabela 7 - Distribuição de frequência de perda de expressão de proteínas de reparo

	<b>Frequência</b>	<b>Porcentagem</b>
Expressão Positiva	54	93,1
Expressão Negativa	4	6,9
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>100,0</b>

A idade média das pacientes com expressão negativa foi de  $54.29 \pm 15.757$  anos. A paciente mais jovem tem 25 anos de idade e a mais idosa 87 anos. Do total de pacientes, 25% têm mais de 66,75 anos de idade. A maioria das pacientes estão abaixo do valor médio. As pacientes foram divididas em 4 grupos de faixa etária conforme a tabela 8.

Tabela 8 - Distribuição da Idade dividida em 4 grupos

	Frequência	Porcentagem
Idade abaixo dos 50 anos	28	48,3
Idade acima ou igual a 50 e abaixo dos 59 anos	8	13,8
Idade acima ou igual a 60 e abaixo dos 69 anos	8	13,8
Idade acima ou igual a 70 anos	14	24,1
<b>Total</b>	<b>58</b>	<b>100.0</b>

A partir dessa divisão foi realizado o teste chi quadrado para avaliar a instabilidade de microssatélites com a idade e não foi encontrada nenhuma correlação.

A tabela 9 correlaciona o tipo histológico, os receptores hormonais, o status do HER2 e o índice mitótico (Ki-67), entre tumores direitos e esquerdos. Com base nessas informações, conseguimos demonstrar que os tumores bilaterais possuem também fenótipos divergentes.

Tabela 9 - Comparação histológica entre tumores bilaterais

	Casos Totais	58 (n)	100%
	Sincrônicos	29	50.0%
	Metacrônicos	29	50.0%
Receptores hormonais	Positivo bilateral	45	77.6%
	Positivo Unilateral	6	10.3%
	Negativo bilateral	7	12.1%
Tipo histológico	Ductal bilateral	26	44.8%

	Lobular bilateral	6	10.3%
	Ducto-lobular Bilateral	2	3.4%
	Histologia discordante	24	41.4%
	Positivo bilateral	5	8.6%
	Positivo Unilateral	6	10.3%
Her 2	Inconclusivo Bilateral	1	1.7%
	Inconclusivo Unilateral	3	5.2%
	Negativo bilateral	43	74.1%
	> ou igual 14 % Bilateral	26	44.8%
Ki67	> ou igual 14% Unilateral	16	27.6%
	<14% Bilateral	16	27.6%

As 4 pacientes que foram detectadas com dMMR, 2 eram em ambas as mamas e 2 em apenas um lado, totalizando 6 mamas com dMMR. Analisando essas 6 mamas, 5 (83,3%) tinham receptores hormonais positivos e 1 (16,7%) negativos. O status do HER2, observamos negativo (escore 0) em 4 (66,66%) e 2 (33,33%) foram inconclusivos (escore +2).

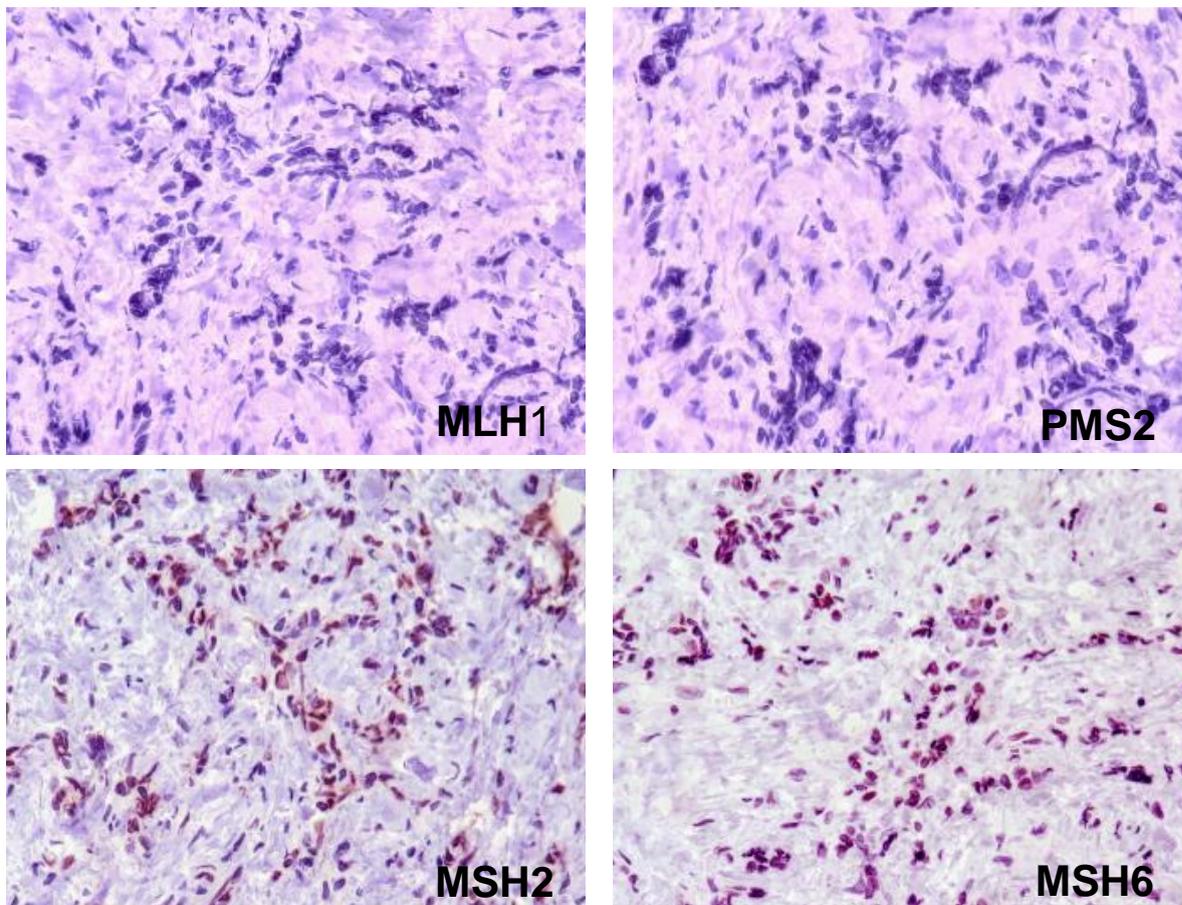
A análise detalhada dos tumores com dMMR é demonstrada na tabela 10 (50%) pacientes com dMMR em ambas as mamas e 2 (50%) em apenas um lado da mama. A faixa etária foi prevalente nas pacientes abaixo dos 50 anos (50%) e não foi observado em nenhuma paciente igual ou acima dos 70 anos. Analisando a classificação do câncer de mama bilateral, 3 (75%) eram sincrônicos e apenas 1 (25%) metacrônico. Com relação à expressão das proteínas de reparo, 3 (75%) teve perda da expressão nas proteínas MLH1 e PMS2 (Figura 9) e 1 (25%) com perda da expressão apenas da proteína PMS2. Dentre os tipos histológicos, nenhum

prevaleceu entre os tumores instáveis.

Tabela 10 - Descrição dos casos com dMMR

Idade	Classificação	MMR		Histologia	
		Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo
48	Sincrônico	Perda da expressão do PMS2	Perda da expressão do PMS2	Lobular	Lobular
45	Metacrônico	Perda da expressão do MLH1 e PMS2	Perda da expressão do MLH1 e PMS2	Ductal	Ductal
52	Sincrônico	Normal	Perda da expressão do MLH1 e PMS2	Lobular	Ductal e Lobular
62	Sincrônico	Normal	Perda da expressão do MLH1 e PMS2	Ductal	Outros

Figura 12 - Ilustração das proteínas de reparo com perda da expressão do MLH1 e PMS2, e sem perda da expressão do MSH2 e MSH6



Fonte: a autora.

## 12 DISCUSSÃO

O câncer de mama bilateral é uma doença rara. O risco para as mulheres com câncer de mama de desenvolver uma segunda neoplasia primária é de 2 a 6 vezes maior do que o risco da população em geral (GONG, et al., 2007; NITA, et al., 2009; DÍAZ, et al., 2012; BAKER, et al., 2013; LIZARRAGA, et al., 2013).

Com o avanço de novas tecnologias para detecção precoce do câncer de mama, assim como novos estudos, melhores tratamentos estão sendo propostos. Antigamente muitas mulheres morriam dessa doença ou tinham um tempo de sobrevida muito curto. Hoje, esse cenário vem se alterando e muitas pacientes que são tratadas do câncer de mama evoluem com boa resposta e algumas até respondem completamente ao tratamento, permitindo com que tenham uma sobrevida mais longa, porém, por outro lado existe chance maior de desenvolver um segundo tumor (ROBINSON et al., 1993; NAROD S. A., 2014).

As instabilidades de microsátélites são encontradas esporadicamente no câncer colorretal e endometrial, já no câncer de mama é um evento raro. Apesar de não serem frequentes no câncer de mama, estudos apontam que, no câncer de mama bilateral essa incidência pode ser mais alta. Kuligina et al., em 2007, realizou um estudo com 71 pacientes com diagnóstico de câncer de mama bilateral, comparando com grupo controle de 52 pacientes com diagnóstico de câncer de mama unilateral. Os resultados foram próximos do que encontramos, 10% em comparação com 6,89%. Diferente do nosso estudo, o método de detecção foi por PCR, que possui uma acurácia de 100% comparado com a IHQ que possui 89 a 95% (KULIGINA et al., 2006, KI et al. 2020). A hipótese dessa diferença encontrada pode ser decorrente do método utilizado, portanto estudos posteriores que façam a comparação desses métodos poderia auxiliar a esclarecer essa questão.

Nosso estudo detectamos 4 pacientes com dMMR de 58 diagnosticadas com câncer de mama bilateral, uma prevalência de 6,89%. Correlacionamos os tumores com deficiência com as seguintes variáveis: tumores sincrônicos e metacrônicos, tipo histológico, índice proliferativo (Ki67), idade, status dos receptores hormonais, status do HER2. 48 (50%) das pacientes tinham tumores sincrônicos e 48 (50%) metacrônicos. 3 (75%) dos tumores com deficiência eram sincrônicos e apenas 1 (25%) metacrônico. Esse achado difere de outros estudos que mostram uma maior

incidência da dMMR nos tumores metacrônicos (ROBINSON et al., 1993). A hipótese, com relação aos outros estudos, (CONTEGIACOMO et al., 1995) de que o tipo histológico lobular invasor poderia estar correlacionado, foi nula em nosso estudo. Não encontramos nenhum tipo histológico que prevaleceu entre os tumores com deficiência. O baixo índice proliferativo (Ki67) analisado no estudo do Contegiacomo et al. foi observado com maior frequência, já no estudo feito por Cheng et al., tumores com deficiência com Ki67 acima de 14% prevaleceram. Em nosso estudo observamos esse índice mais elevado. Das 6 mamas com deficiência, 4 (66,66%) apresentaram o índice acima de 14%: 80%, 70% e dois com 30%, e 2 (33,33%) com 10%. Tumores com índice proliferativo (Ki67) mais elevado indicam um comportamento mais agressivo. Com relação a idade média das pacientes com deficiência em nosso estudo foi de 54.29. A paciente mais jovem com 25 anos de idade e a mais idosa 87 anos. A faixa etária foi prevalente nas pacientes abaixo dos 50 anos (50%), diferente do encontrado por Cheng et al., onde a maioria das pacientes eram acima dos 50 anos. Ainda em comparação com o estudo analisado por Cheng et al., o receptor de progesterona foi negativo e o receptor de estrogênio positivo na maioria dos tumores com deficiência. Em nosso estudo, a diferença foi com relação ao receptor de progesterona que foi negativo e positivo em proporções iguais, e o receptor de estrogênio obteve o mesmo resultado, positivo na maioria dos casos. Essa estratificação dos dados dos receptores hormonais, progesterona e estrogênio, não foi demonstrada na tabela da análise estatística, porém foi realizada. Em relação ao status do HER2, os resultados também foram semelhantes, sendo a maioria negativo para esse biomarcador. Importante ressaltar que o método de detecção desse estudo também foi feito pela IHQ, porém foi abordado pacientes de uma província do Canadá, sendo a maioria europeus, ou seja, a ancestralidade é distinta da nossa população analisada.

Estudos sobre câncer de mama unilateral e bilateral, apontam alguns fatores como sendo fatores prognósticos negativos, como receptores hormonais e HER2 negativo, nomeados como triplo negativo (RAKHA et al., 2007), idade (OZER et al., 2002) e tumores sincrônicos (JOBSEN et al., 2015). Nosso estudo correlacionou esses fatores prognósticos com os tumores com deficiência encontrados e não observou significância relativa (YEE et al., 1994; TOYAMA et al., 1996).

Em 2017, o tratamento com pembrolizumab, um inibidor de *checkpoint*, teve

aprovação pelo Departamento de Saúde e Serviços Humanos dos Estados Unidos (*US Food and Drug Administration FDA*) em qualquer tumor que tenha dMMR ou MSI-H comprovada por algum método de detecção (FDA, 2017; LI et al., 2020). Após essa aprovação, é extremamente relevante a importância da pesquisa das proteínas de reparo em tumores. Nosso estudo, demonstrou que existe essa deficiência no câncer de mama bilateral, portanto a detecção deve ser feita, pois pacientes com esse diagnóstico podem se beneficiar com outros tratamentos que atualmente são preconizados. O método de detecção pela IHQ é validado possuindo 89 a 95% de acurácia, além de ser um exame que está disponível em diversos serviços e com um melhor custo monetário comparado aos exames moleculares (LI et al., 2020). Para o diagnóstico dos tumores com deficiência pelo método da IHQ, a pesquisa pode ser feita com 4 anticorpos que correspondem às proteínas de reparo: MLH1, PMS2, MSH2 e MSH6. Como atuam como heterodímeros, a análise é feita sempre em pares MLH1 com o PMS2 e MSH2 com o MSH6. Se há perda da expressão do MLH1, o PMS2 também perde sua expressão e da mesma forma ocorre com o outro par MSH2 e MSH6. A perda isolada da expressão pode ocorrer com o PMS2 e MSH6 e não são consideradas como MSI-H (HENDRIKS et al., 2006; PENA-DIAZ et al., 2016). Apenas em alguns casos, a pesquisa pelo PCR ou outro exame molecular será necessária, para confirmação do resultado quando a IHQ for inconclusiva (LI et al., 2020).

Observando os resultados em conjunto com outros estudos, chegamos ao resultado de que a dMMR não tem correlação com nenhuma das variáveis propostas nesse estudo, possuindo patogenicidade distinta da maioria dos cânceres de mama e levantando a hipótese de que o perfil ancestral deve ser levado em consideração devido aos distintos fenótipos encontrados. Mutações que levam o câncer de mama bilateral como BRCA1 e BRCA2, assim como mutações que levam a Síndrome de Lynch nos tumores colorretais instáveis, podem não ter conexão entre ambas, ou seja, o câncer de mama bilateral com deficiência das proteínas de reparo não está correlacionada com essas mutações acima citadas. Já as mutações somáticas, as que são adquiridas ao longo da vida, devem ser levadas em consideração. Como limitação desse estudo foi o pequeno número de pacientes com tumores bilaterais e como consequência um baixo número de tumores deficientes, impossibilitando uma melhor correlação estatística com as variáveis definidas para correlação.

## 13 CONCLUSÃO

Concluindo, este estudo mostrou que apesar da baixa incidência no câncer de mama, a dMMR pode ser detectada no câncer de mama bilateral. A perda da expressão dessas proteínas são considerados como dMMR, condição encontrada nos MSI. Demostramos que não existem padrões estatísticos, histológicos e moleculares associados, quando estamos diante de um câncer de mama bilateral com dMMR. Nesse estudo comprovamos que o método da IHQ é detectável e obtemos resultados semelhantes aos estudos que utilizaram métodos moleculares, além ser um exame de fácil acesso à toda a população brasileira e bom custo benefício. Importante que a pesquisa das MMR seja sempre feita em ambas as mamas, pois como mostramos nesse estudo, os fenótipos podem ser distintos. O tratamento e a conduta das pacientes com câncer de mama bilateral devem ser analisadas de maneira individualizada e personalizada, sempre lembrando da pesquisa das MMR, pois se resultarem deficientes, essas pacientes podem se beneficiar com a imunoterapia.

## REFERÊNCIAS

- Abreu, E.; Koifman, S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 1, p. 113–131, 2002.
- Allan JM, Travis LB. Mechanisms of therapy-related carcinogenesis. **Nature Review Cancer** V. 5, n. 12, p. 943-55, 2005.
- Amin MB, Edge S, Greene F, Byrd DR, Brookland RK, Washington MK, Gershenwald JE, Compton CC, Hess KR, et al. (Eds.). **AJCC Cancer Staging Manual** 8 ed. Springer International Publishing: American Joint Commission on Cancer; 2017.
- Anbazhagan R, Fujii H, Gabrielson E. Microsatellite instability is uncommon in breast cancer. **Clinical Cancer Research** v. 5, n. 4, p. 839-844, 1999.
- Andrade, V.P. et al, O arranjo em matriz em amostras teciduais (*tissue microarray*): larga escala e baixo custo ao alcance do patologista. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 43, n. 1, p. 55-60, 2007.
- Baker, B. et al. Histo-biological comparative analysis of bilateral breast cancer. **Medical Oncology**, v. 30, p. 711–718, 2013.
- Baykara, M. et al. Clinicopathological features in bilateral breast cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 13, n. 9, p. 4571–4575, 2012.
- Bernstein JL, Lapinski RH, Thakore SS, Doucette J, Thompson WD. The descriptive epidemiology of second primary breast cancer. **Epidemiology** v. 14, n. 5, p. 552–8, 2013.
- Boland CR, Thibodeau SN, Hamilton SR, Sidransky D, Eshleman JR, Burt RW, Meltzer SJ, Rodriguez-Bigas MA, Fodde R, Ranzani GN, Srivastava S. A National Cancer Institute Workshop on microsatellite instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer. **Cancer Research** v. 58, p. 5248–5257, 1998.
- Bonneville R, Krook MA, Kautto EA, Miya J, Wing MR, Chen HZ, Reeser JW, Yu L, Roychowdhury S. Landscape of Microsatellite Instability Across 39 Cancer Types. **JCO Precision Oncology** PO.17.00073, 2017.

BRASIL. INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer** 6 ed. Rio de Janeiro: Inca, 2019. 54 p.

Bray F., et al. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**. v. 68, n. 6, p. 394-424, 2018.

CANCER GENOME ATLAS. **Câncer de mama**. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/breast/patient/breast-treatment-pdq>. Acesso em: 15 jan. 2020.

Cheah PL, Li J, Looi LM, et al. Screening for microsatellite instability in colorectal carcinoma: practical utility of immunohistochemistry and PCR with fragment analysis in a diagnostic histopathology setting. **The Malaysian Journal of Pathology** v. 41, n. 2, p. 91–100, 2019.

Cheang M.C.U., Chia S.K., Voduc D., et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute** v. 101, n. 10, p. 736–750, 2009.

Cheng AS, Leung SCY, Gao D, Burugu S, Anurag M, Ellis MJ, Nielsen TO. Mismatch repair protein loss in breast cancer: clinicopathological associations in a large British Columbia cohort. **Breast Cancer Research Treatment**. v. 179, n.1, p 3-10, 2020.

Contegiacomo A, Palmirotta R, De Marchis L, Pizzi C, Mastranzo P, Delrio P, Petrella G, Figliolini M, Bianco AR, Frati L, et al. Microsatellite instability and pathological aspects of breast cancer. **Internacional Journal of Cancer** v. 64, n. 4, p. 264-8., 1995.

Diaz R., et al. Synchronous and metachronous bilateral breast cancer: a long-term singleinstitution experience. **Medical Oncology**, v. 29, p. 16–24, 2012.

Dietmaier W, Wallinger S, Bocker T, Kullmann F, Fishel R, Rüschoff J. Diagnostic microsatellite instability: definition and correlation with mismatch repair protein expression. **Cancer Research**. v. 21, n. 57, p. 4749-4756, 1997.

Dowsett M, Nielsen TO, A'Hern R, et al. Assessment of Ki67 in breast cancer: recommendations from the International Ki67 in breast cancer working group. **Journal of National Cancer Institute**. v. 103, n. 22, p. 1656-1664, 2011.

FDA FOOD AND DRUG ADMINISTRATION FDA approves first cancer treatment for any solid tumor with a specific genetic feature Disponível

em: [https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm560167.](https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm560167.htm)

[htm](https://www.fda.gov/NewsEvents/Newsroom/PressAnnouncements/ucm560167.htm) Acesso em: 20 jan. 2021

Fisher B, Redmond C, Brown A, Wolmark N, Wittliff J, Fisher ER, et al. Treatment of Primary Breast Cancer with Chemotherapy and Tamoxifen. **The New England Journal of Medicine** v. 305, n. 1, p. 1–6, 1981.

Fragomeni S. M., Sciallis A., Jeruss J. S Molecular subtypes and local-regional control of breast cancer **Surgical Oncology Clinics** v. 7, n. 1, p. 95-120, 2018.

Fusco N, Lopez G, Corti C, Pesenti C, Colapietro P, Ercoli G, Gaudio G, Favarsani A, Gambini D, Michelotti A, Despini L, Blundo C, Vaira V, Miozzo M, Ferrero S, Bosari S. Mismatch Repair Protein Loss as a Prognostic and Predictive Biomarker in Breast Cancers Regardless of Microsatellite Instability. **JNCI Cancer Spectrum** v. 2, n. 4, pky056, 2018

Gong, S. J. et al. Bilateral Breast Cancer: Differential Diagnosis Using Histological and Biological Parameters. **Japanese Journal of Clinical Oncology**, v. 37, n. 7, p. 487–492, 2007.

Gryfe R, Kim H, Hsieh ET, Aronson MD, Holowaty EJ, Bull SB, Redston M, Gallinger S. Tumor microsatellite instability and clinical outcome in young patients with colorectal cancer. **The New England Journal of Medicine** v. 342, n. 2p. 69-77, 2000.

Hadi Yaziji, MD, et al Consensus Recommendations on Estrogen Receptor Testing in Breast Cancer By Immunohistochemistry **Breast Care** v.5, n.3, p. 185-187, 2010.

Hammond ME., Hayes DF., Dowsett M., et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for Immunohistochemical Testing of Estrogen and Progesterone Receptors in Breast Cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 6, n. 134, p. 907-922, 2010.

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

Hause, R. J., Pritchard, C. C., Shendure, J., & Salipante, S. J.. Classification and characterization of microsatellite instability across 18 cancer types. **Nature Medicine**, v. 22, n. 11, p. 1342–1350, 2016.

Hendriks, Y. M. C. et al. Diagnostic approach and management of Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma): a guide for clinicians. **CA: a Cancer Journal for Clinicians**. v. 56, p. 213–225, 2006.

Herman, J. G. et al. Incidence and functional consequences of hMLH1 promoter hypermethylation in colorectal carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA** v. 95, p. 6870–6875, 1998.

Hoening MJ, Aleman BM, Hauptmann M, Baaijens MH, Klijn JG, Noyon R, Stovall M, van Leeuwen FE. Roles of radiotherapy and chemotherapy in the development of contralateral breast cancer. **Journal of Clinical Oncology** v. 26, n. 34, p. 5561-5568, 2008.

Huo D, Melkonian S, Rathouz PJ, Khramtsov A, Olopade OI. Concordance in histological and biological parameters between first and second primary breast cancers. **Cancer** v. 117, n. 5, p. 907-915, 2011.

Huiyan M.A., et al. Reproductive factors and breast cancer risk according to joint estrogen and progesterone receptor status: a meta-analysis of epidemiological studies. **Breast Cancer Research**, v. 8, n. 4, p. 1–11, 2006.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Câncer de mama**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/tipos-de-cancer/cancer-de-mama>. Acesso em: 08 jan.2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Detecção precoce e prevenção primária**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//cartilha-cancer-de-mama-vamos-falar-sobre-isso2016.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estatísticas de câncer**. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>. Acesso em: 08 jan. 2020.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. **Estimativa | 2018. Incidência de Câncer no Brasil**. Disponível em: <http://www1.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018.pdf>. Acesso em: 08 jan. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **Cancer today**. Disponível em: <http://gco.iarc.fr/today/home>. Acesso em: 08 jan. 2020.

INTERNATIONAL AGENCY FOR RESEARCH ON CANCER. **International Women's Day 2020**. Disponível em: <https://www.iarc.fr/news-events/iarc-scientists-offer-advice-to-help-women-to-reduce-their-cancer-risk/> Acesso em: 07 mar. 2020.

Intra M., et al. Clinicopathologic characteristics of 143 patients with synchronous bilateral invasive breast carcinomas treated in a single institution. **Cancer**, v. 101, n. 5, p. 905–912, 2004.

Jobsen JJ, van der Palen J, Ong F, Riemersma S, Struikmans H. Bilateral breast cancer, synchronous and metachronous; differences and outcome. **Breast Cancer Research and Treatment** v. 153, n. 2, p. 277-283, 2015.

Jourdan F, Sebbagh N, Comperat E, Mourra N, Flahault A, Olschwang S, Duval A, Hamelin R, Flejou JF. Tissue microarray technology: validation in colorectal carcinoma and analysis of p53, hMLH1, and hMSH2 immunohistochemical expression. **Virchows Archiv** v. 443, n. 2, p. 115-21, 2003.

Kawakami H, Zaanani A, Sinicrope FA. Microsatellite instability testing and its role in the management of colorectal cancer. **Current Treatment Options in Oncology**. v. 16, n. 7, p. 30, 2015.

Kuligina, E. S., et al Microsatellite instability analysis of bilateral breast tumors suggests treatment-related origin of some contralateral malignancies. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology** v. 33, n. 1, p. 57–64, 2006.

Lyndsay Harris, et al American Society of Clinical Oncology 2007 Update of Recommendations for the Use of Tumor Markers in Breast Cancer. **Journal of clinical oncology**, v. 3, n. 6, p. 336-339, 2007.

Le DT, Durham JN, Smith KN, et al. Mismatch repair deficiency predicts response of solid tumors to PD-1 blockade **Science** v. 357, n. 6349, p. 409-413, 2017.

Li, K., Luo, H., Huang, L., Luo, H., & Zhu, X. Microsatellite instability: a review of what the oncologist should know. **Cancer cell international** v.20, p. 16, 2020.

Lizarraga, I. M. et al. Review of risk factors for the development of contralateral breast cancer. **The American Journal of Surgery**, v. 206, p. 704–708, 2013.

Lu W, Schaapveld M, Jansen L, Bagherzadegan E, Sahinovic MM, Baas PC, Hanssen LM, van der Mijle HC, Brandenburg JD, Wiggers T, De Bock GH. The value of surveillance mammography of the contralateral breast in patients with a history of breast cancer. **European Journal of Cancer** v. 45, n. 17, p. 3000-7, 2009.

Lu WL, Jansen L, Post WJ, et al. Impact on survival of early detection of isolated breast recurrences after the primary treatment for breast cancer: a meta-analysis. **Breast Cancer Research and Treatment** v. 114, p. 403–12, 2009.

Mueller J, Gazzoli I, Bandipalliam P, Garber JE, Syngal S, Kolodner RD. Comprehensive molecular analysis of mismatch repair gene defects in suspected Lynch syndrome (hereditary nonpolyposis colorectal cancer) cases. **Cancer Research** v. 69, n. 17, p. 7053-7061, 2009.

Narod, S. A. Bilateral breast cancers. **Nature Publishing Group**, v. 11, n. 10, p. 157–1663, 2014.

Nita, M. E. et al. Métodos de pesquisa em avaliação de tecnologia em saúde. **Arquivos de Gastroenterologia**, v. 46, n. 252, p. 252–255, 2009.

Ozer E, Yuksel E, Kizildag S, Sercan O, Ozen E, Canda T, Sakizli M. Microsatellite instability in early-onset breast cancer. **Pathology Research and Practice** v. 198, n. 8, p. 525-530, 2002.

Padmanabhan, N.; Subramanyan, A.; Radhakrishna, S. Synchronous bilateral breast cancers. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v. 9, n. 9, p. 5–8, 2015.

Pena-Diaz J, Rasmussen LJ. Approaches to diagnose DNA mismatch repair ~ gene defects in cancer. **DNA Repair (Amst)** v. 38, p. 147–154, 2016.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. **Cancer** v. 109, n. 1, p. 25-32, 2007.

Robinson E, Rennert G, Rennert HS, Neugut AI. Survival of first and second primary breast cancer. **Cancer** v. 71, n. 1, p. 172-176, 1993.

Rosenbaum MW, Bledsoe JR, Morales-Oyarvide V, et al. PD-L1 expression in colorectal cancer is associated with microsatellite instability, BRAF mutation, medullary morphology and cytotoxic tumor-infiltrating lymphocytes. **Modern Pathology** v. 29, p. 1104–1112, 2016.

Rutqvist LE, Cedermark B, Glas U, et al. Contralateral primary tumors in breast cancer patients in a randomized trial of adjuvant tamoxifen therapy. **Journal of the National Cancer Institute** v. 83, p. 1299–306, 1991.

Samant RS, Olivotto IA, Jackson JS, Mates D. Diagnosis of metachronous contralateral breast cancer. **The Breast Journal** v. 7, p. 405–10, 2001.

Sloan EA, Ring KL, Willis BC, Modesitt SC, Mills AM. PD-L1 Expression in Mismatch Repair-deficient Endometrial Carcinomas, Including Lynch Syndrome-associated and MLH1 Promoter Hypermethylated Tumors. **The American Journal of Surgical Pathology** v. 41, n. 3, p. 326-333, 2017.

Soerjomataram I, Louwman WJ, Lemmens VE, et al. Risks of second primary breast and urogenital cancer following female breast cancer in the south of The Netherlands, 1972– 2001. **European Journal of Cancer** v. 41, p. 2331–7, 2005.

Souza, N. H. A. et al. Câncer de mama em mulheres jovens: estudo epidemiológico no Nordeste brasileiro. **SANARE - Revista de Políticas Públicas**, v. 16, n. 2, p. 60–67, 2017.

Steward LT, Gao F, Taylor MA, Margenthaler JA. Impact of radiation therapy on survival in patients with triple-negative breast cancer. **Oncology Letters** v. 7, n. 2, p. 548-552, 2014.

Toyama T, Iwase H, Yamashita H, Iwata H, Yamashita T, Ito K, Hara Y, Suchi M, Kato T, Nakamura T, Kobayashi S. Microsatellite instability in sporadic human breast cancers. **International Journal of Cancer** v. 68, n. 4, p. 447-441, 1996.

Vaittinen P, Hemminki K. Risk factors and age-incidence relationships for contralateral breast cancer. **International Journal of Cancer** v. 88, n. 6, p. 998-1002, 2000.

Wolff A.C., Hammond M.E.H., Allison K.H., et al. HER2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Clinical Practice Guideline Focused Update Summary. **Journal of oncology practice**, v. 14, n. 7, p. 437-441, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Diagnóstico precoce e prevenção**. Disponível em: <https://www.who.int/cancer/prevention/diagnosis-screening/breast-cancer/en/>  
Acesso em: 08 jan. 2020.

Yee CJ, Roodi N, Verrier CS, Parl FF. Microsatellite instability and loss of heterozygosity in breast cancer. **Cancer Research** v. 54, n. 7, p. 1641-1644, 1994.

Yildiz-Aktas I.Z., Dabbs D.J., Bhargava R. The effect of cold ischemic time on the immunohistochemical evaluation of estrogen receptor, progesterone receptor, and HER2 expression in invasive breast carcinoma. **Modern Pathology** v. 25, p. 1098–1105, 2012.