

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ  
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE  
PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

**IRIS RABINOVICH**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DO FENÓTIPO CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> NOS DIFERENTES  
SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA**

**Curitiba**

**2011**

**IRIS RABINOVICH**

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DO FENÓTIPO CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> NOS DIFERENTES  
SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA**

**Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências Biológicas e da Saúde da Pontifícia Universidade Católica do Paraná como requisito parcial para a obtenção do Grau Acadêmico de Mestre.**

**Orientadora: Prof. Dra Andrea Novais Moreno**

**Co-orientadora: Prof. Dra Lúcia de Noronha**

**Curitiba**

**2011**

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

Rabinovich, Iris  
R116e Estado da expressão do fenótipo CD44+/CD24- nos diferentes subtipos  
2011 moleculares do câncer de mama / Iris Rabinovich ; orientadora, Andrea Novais  
Moreno ; co-orientadora, Lúcia de Noronha. -- 2011.  
x, 75 f. ; il. ; 30 cm

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Paraná,  
Curitiba, 2010  
Bibliografia: 56-66

1. Câncer de mama. 2. Células-tronco. 3. Antígenos CD44. 4. Antígenos C24.  
I. Moreno, Andréa Novais. II. Noronha, Lúcia de. III. Pontifícia Universidade  
Católica do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde.  
IV. Título.

CDD 20. ed. – 610



Pontifícia Universidade Católica do Paraná  
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde  
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**ATA DA SESSÃO PÚBLICA DE EXAME DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE EM NÍVEL DE MESTRADO DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ.**

Aos vinte e oito dias do mês de setembro de 2011, realizou-se a sessão pública de defesa de dissertação "ESTUDO DA EXPRESSÃO DO FENÓTIPO CD44\*/CD24\* COMO MARCADOR IMUNOHISTOQUÍMICO DE CÉLULA TRONCO NOS DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES DO CÂNCER DE MAMA" apresentada por ÍRIS RABINOVICH para obtenção do título de mestre; Área de Concentração: Medicina e áreas afins.

A Banca Examinadora foi composta pelos seguintes membros:

MEMBROS DA BANCA	ASSINATURA
Prof. Dr. Andréa Novais Moreno PUCPR - Presidente	
Prof. Dr. Almir Antonio Urbanetz UFPR	
Prof. Dr. César Cabello dos Santos UNICAMP	

De acordo com as normas regimentais a Banca Examinadora deliberou sobre os conceitos a serem distribuídos e que foram os seguintes:

Prof. Dr. Andréa Novais Moreno                      Conceito: APROVADA  
Prof. Dr. Almir Antonio Urbanetz                      Conceito: APROVADA  
Prof. Dr. César Cabello dos Santos                      Conceito: APROVADA  
Conceito Final: APROVADA

Observações da Banca Examinadora:

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Andréa Novais Moreno  
Presidente da Banca Examinadora

\_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Roberto Pecoits Filho  
Coordenador do PPGCS PUCPR

À minha filha Gabriela que ilumina a minha vida.

Ao meu esposo Rodrigo, pelo seu amor  
companheirismo, e apoio incondicional.

Aos meus pais Beatriz e Carlos pelo exemplo de  
estudo, dedicação e ética que sempre me deram e  
inspiraram o meu caminho.

## AGRADECIMENTOS

À Prof<sup>a</sup> Dra ANA PAULA M SEBASTIÃO pela sua amizade, incentivo, ajuda na confecção dos TMA's e na leitura das lâminas, e pelo material cedido da sua tese para o início deste trabalho.

À Prof<sup>a</sup> Dra ANDREA NOVAIS MORENO por haver me aceitado como sua aluna e pela sua dedicação e seriedade na orientação deste estudo.

À Prof<sup>a</sup> Dra LÚCIA DE NORONHA por haver me dado a oportunidade de fazer esta pesquisa, e pela sua grande ajuda em todas as fases deste trabalho como co-orientadora e como coordenadora do Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná.

Ao Prof. Dr. RUBENS SILVEIRA LIMA, chefe da Unidade da Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças por ser o meu exemplo de profissional, ético e dedicado ao estudo do câncer de mama, no qual eu me inspiro para o exercício da minha profissão. Obrigado pelo incentivo à realização deste trabalho e pela sua amizade.

Ao Prof. Dr. CICERO URBAN (Unidade da Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças) pelo seu apoio, incentivo, e ajuda na revisão deste estudo.

Aos queridos colegas mastologistas da Unidade da Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças: Prof. EDUARDO SCHUNEMANN, Prof. CLEVERTON SPAUTZ, Dra. KARINA FURLAN ANSELMINI, e Dra. FLAVIA KURODA pelo apoio neste período da minha vida, que foi muito importante para a realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná, em especial às biólogas ANA PAULA CAMARGO E MARINA LUISE VIOLA DE AZEVEDO pela ajuda na confecção dos TMA e na aplicação dos marcadores imunoistoquímicos.

Ao Laboratório de Patologia do HOSPITAL AC CAMARGO, em especial ao PROF DR RAFAEL MALAGOLI ROCHA pela sua gentileza e colaboração na aplicação de alguns marcadores imunoistoquímicos desta pesquisa em seu laboratório.

À Prof<sup>ª</sup> MARCIA OLANDOSKI pela realização da análise estatística deste estudo.

Ao meu esposo RODRIGO CANTU POLO e à minha filha GABRIELA RABINOVICH POLO por fazerem parte da minha vida e estarem sempre ao meu lado. Agradeço especialmente a paciência, incentivo e apoio que permitiram a minha dedicação a esta pesquisa.

À minha mãe Dra. OLGA BEATRIZ P RABINOVICH que sempre está ao meu lado, apoiando e incentivando todas as minhas atividades acadêmicas. Sem a sua ajuda não teria sido possível escrever esta dissertação.

Ao meu pai Dr. CARLOS RABINOVICH pela confiança, incentivo, apoio e carinho.

Aos meus sogros MARCO POLO E DALVA M. CANTÚ POLO pela sua colaboração e carinho.

## SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO .....	1
2.OBJETIVOS .....	6
2.1 Objetivo Geral .....	6
2.2. Objetivos específicos .....	6
3.REVISÃO BIBLOGRÁFICA .....	7
3.1.Fatores Prognósticos .....	7
3.2.Idade.....	7
3.3Tipos Histológicos .....	8
3.4Comprometimento linfonodal .....	9
3.5.Tamanho tumor.....	9
3.6.Grau Histológico.....	9
3.7.Invasão vascular .....	10
3.8.Expressão de Receptores Hormonais.....	10
3.9.Expressão de HER2 .....	11
3.10.Perfis de expressão gênica.....	11
3.11.Hipótese Células-Tronco Cancerosas .....	18
3.12.Células-Tronco Mamárias .....	19
3.13.Marcadores de Células-Tronco.....	20
4.MATERIAL E METODOS.....	23
4.1.VARIÁVEIS E CONCEITOS.....	24
4.2.DESCRICÃO DOS PROCEDIMENTOS TÉCNICOS .....	28
4.2.1.Construção dos Tissue Microarrays (TMAs) .....	28
4.2.1.1.Seleção dos Tecidos para a Construção do TMA.....	28
4.2.1.2.Montagem do TMA.....	28
4.2.1.3.Corte do Bloco de TMA.....	29
4.2.2.Método Imunoistoquímico.....	29
4.2.3.Controles .....	29
4.2.4.Análise Estatística .....	30
4.2.5.Aspectos éticos .....	30
5.RESULTADOS .....	31
5.1.Características da amostra.....	31
5.2.Análise da expressão do fenótipo CD44 <sup>+</sup> /CD24 <sup>-</sup> .....	34

5.3. Análise da expressão do marcador CD44 .....	37
5.4. Análise da expressão do marcador CD44v6 .....	39
5.5. Análise da expressão do marcador CD24 .....	42
6. DISCUSSÃO .....	45
6.1. Análise da amostra .....	46
6.2. Análise do fenótipo CD44+/CD24- .....	47
6.3. Análise de expressão dos marcadores CD44, CD44v6, e CD24. ....	54
7. CONCLUSÕES .....	57
REFERÊNCIAS .....	58
APÊNDICES .....	68
APÊNDICE A .....	69
APÊNDICE B .....	70
APÊNDICE C .....	71
APÊNDICE D .....	72
ANEXO .....	73

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ABCG2</b>	-ATP-obrigatória de ligação, membro 2 da subfamília G
<b>AC</b>	-Doxorrubicina/Ciclofosfamida
<b>AC-Doc</b>	-Doxorrubicina/Ciclofosfamida-Docetaxel
<b>AD</b>	-Doxorrubicina/Docetaxel
<b>AJCC</b>	- <i>American Joint Committee on Cancer</i>
<b>ALDH</b>	-Aldeído desidrogenase
<b>ALDH 1</b>	-Aldeído desidrogenase 1
<b>ANOVA</b>	-Análise de variância
<b>AP-Doc</b>	-Doxorrubicina/Pemetrexade.-Docetaxel
<b>APMS</b>	-Ana Paula Martins Sebastião
<b>Bcl-2</b>	- <i>B-cell CLL/ lymphoma 2</i>
<b>BRCA1</b>	-Gene do câncer de mama 1 ( <i>Breast cancer associated gene -1</i> )
<b>cDNA</b>	-DNA complementar
<b>CD14</b>	-Grupo de diferenciação ( <i>Cluster of differentiation</i> ) 14
<b>CD24</b>	-Grupo de diferenciação 24
<b>CD44</b>	-Grupo de diferenciação 44
<b>CD44v6</b>	-Grupo de diferenciação 44 isoforma variante 6
<b>CD49f</b>	-Alfa-6 integrina (grupo de diferenciação 49f)
<b>c-erbB2/neu protein</b>	-Proteína-2 do receptor epidérmico humano
<b>CD79a</b>	-Grupo de diferenciação 79a
<b>CK</b>	-Citoqueratinas
<b>CK14</b>	-Citoqueratina 14
<b>CK17</b>	-Citoqueratina 17
<b>CK5</b>	-Citoqueratina 5

<b>CK5/6</b>	-Citoqueratina 5/6
<b>CK8</b>	-Citoqueratina 8
<b>c-KIT</b>	- <i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
<b>CPC</b>	-Centro de Patologia de Curitiba
<b>CXCR4</b>	-C-X-C receptor de quimiocina tipo 4
<b>Doc</b>	-Docetaxel
<b>DP</b>	-Desvio padrão
<b>EC</b>	-Epirrubicina/Ciclofosfamida
<b>EGFR</b>	-Receptor do fator de crescimento epidérmico
<b>EMT</b>	-Transição epitélio mesênquima
<b>EP</b>	-Erro padrão
<b>EpCAM</b>	-Molécula de adesão de célula epitelial
<b>ERBB2</b>	- <i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2</i>
<b>EUA</b>	-Estados Unidos da América
<b>FISH</b>	-Hibridização <i>in situ</i> por fluorescência
<b>HE</b>	-Hematoxilina-Eosina
<b>HER2</b>	-Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano
<b>HNSG</b>	-Hospital Nossa Senhora das Graças
<b>IC</b>	-Intervalo de confiança
<b>INCA</b>	-Instituto Nacional do Câncer
<b>IR</b>	-Iris Rabinovich
<b>ISH</b>	-Hibridização <i>in situ</i>
<b>Ki-67</b>	-Antígeno KI-67
<b>LFBT</b>	-Luis Fernando Bleggi Torres
<b>mRNA</b>	-RNA mensageiro
<b>MUC1</b>	-Mucina 1
<b>nm23</b>	- <i>non-metastatic cells 1, protein (NM23A) expressed in (NME1)</i>

<b>NOD/SCID</b>	-Diabéticos não-obesos/ Imunodeficiência severa combinada
<b>OMS</b>	-Organização Mundial da Saúde
<b>OR</b>	- <i>Odds ratio</i>
<b>PUCPR</b>	-Pontifícia Universidade Católica do Paraná
<b>RH</b>	-Receptor hormonal
<b>RE</b>	-Receptor de estrogênio
<b>RP</b>	-Receptor de progesterona
<b>SOE</b>	-Sem outra especificação
<b>T</b>	-Docetaxel
<b>TMA</b>	-Microarranjo de tecido ( <i>tissue microarray</i> )
<b>TMA<sub>s</sub></b>	-Microarranjo de tecidos ( <i>tissue microarrays</i> )
<b>TNM</b>	- <i>Tumor-node-metastasis</i>
<b>TP53</b>	- <i>tumor protein p53</i>
<b>UM-HNSG</b>	-Unidade da Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças

## RESUMO

**Introdução:** O câncer de mama é o tumor mais comum entre as mulheres, com exceção dos tumores de pele não melanoma, e uma doença muito heterogênea. Na última década foram identificados basicamente 5 subtipos moleculares intrínsecos: Luminal A, Luminal B, HER2, Basal, *Claudina-low*, e o subgrupo Normal *breast-like*. A teoria das células-tronco cancerosas considera que o tumor se origina a partir de uma pequena população de células-tronco que perdem o mecanismo de auto-regulação, e passam a se diferenciar e proliferar indefinidamente. Muitos estudos têm demonstrado que células com o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> tem propriedades tumorigênicas e podem ser utilizadas como marcadores de células-tronco nas neoplasias de mama. O objetivo deste estudo é avaliar a correlação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os diferentes subtipos moleculares em amostras de carcinoma ductal invasor. **Material e Métodos:** Foram selecionados 133 casos de carcinomas ductais mamários submetidos a cirurgia na Unidade da Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças, no período de janeiro de 1998 a julho de 2009. Os casos foram selecionados se maneira não consecutiva, de modo a representar de maneira significativa os quatro subtipos moleculares intrínsecos com base nos critérios imunoistoquímicos (Luminal A, Luminal B, HER2, e Triplo negativo). As amostras foram distribuídas em doze microarranjos de tecidos (TMAs). Foi pesquisada a expressão imunoistoquímica dos marcadores CD44, CD44v6 e CD24. O fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os marcadores imunoistoquímicos isolados foram correlacionados com os subtipos moleculares intrínsecos e com os fatores prognósticos clássicos como idade, grau histológico, tamanho do tumor, e envolvimento linfonodal. **Resultados:** A partir da amostra final (n=133) obtivemos 42 (31,6%) casos Luminais A, 31 (23,3%) Luminais B, 21 (15,8%) HER2, e 39 (29,3%) Triplo negativos. Houve 50% de positividade para o marcador CD44 e 68,2% para o marcador CD44v6. A frequência do marcador CD24 foi 79,8%. Dezoito (14%) casos expressaram o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> ou CD44v6<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>), dos quais 11,1% foram Luminal A, 27,8% Luminal B, 38,9% HER2, e 22,2% Triplo negativos. Na comparação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os subtipos moleculares houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (p=0,02), sendo que o subtipo HER2 foi o que apresentou a maior frequência deste fenótipo. Foi observado também que o subtipo HER2 apresentou menor positividade do marcador CD24 em relação aos outros subtipos com significância estatística: Luminal A (p=0,018), Luminal B (p= 0,044), e Triplo negativo (p=0,031). **Conclusões:** Este estudo demonstrou uma correlação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e o subgrupo HER2. Ao contrário do que era esperado foi encontrado uma frequência maior do marcador CD44v6 (68,2%) em relação ao CD44 (50%), demonstrando uma maior sensibilidade da isoforma variante em relação à principal. A falta de expressão do CD24 esteve mais bem correlacionada aos subtipos moleculares do que a expressão isolada do CD44 ou CD44v6.

Palavras chave: Câncer de mama, fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, subtipos moleculares, células-tronco.

## ABSTRACT

**Introduction:** Breast cancer is the most frequent tumor in women, except skin tumors non melanoma, and is a very heterogeneous disease. In the last decade there were identified basically 5 intrinsic molecular subtypes: Luminal A, Luminal B, HER2, Basal, Claudin-low and a Normal breast-like group. The cancer stem cells model assumes that the tumor originates from a small population of stem cells that lose the regulation of the self-renewal process leading to differentiation and proliferation. Many studies has shown that cells with the phenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> have tumor-initiating properties and can be used as a stem cells marker in breast cancer. The aim of this study was to investigate the correlation of the phenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and the different molecular subtypes in ductal invasive breast cancer. **Methods:** We selected 133 non-consecutive samples of invasive ductal carcinoma, who underwent surgery at Breast Unit of the Hospital Nossa Senhora das Graças, in the period of January 1998 to July 2009. Cases were selected in a non-consecutive manner, in order to represent the four intrinsic molecular subtypes by immunohistochemical criteria (Luminal A, Luminal B, HER2, and Triple Negative) and distribute them in twelve tissue microarrays (TMAs). We tested by immunohistochemical staining the expression of CD44, CD44v6, and CD24. The phenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and the immunohistochemical markers were correlated with the intrinsic molecular subtypes, and the classic prognostic factors as age, histological grade, tumor size and lymph node. **Results:** From our sample (n=133), 42 (31,6%) cases were Luminal A, 31 (23,3%) Luminal B, 21 (15,8%) HER2, and 39 (29,3%) triple negative. There were 50% positivity for CD44, and 68,2% positivity for CD44v6. The frequency of CD24 was 79,8%. Eighteen (14%) cases present with the phenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> or CD44v6<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>), of which 11,1% were Luminal A, 27,8% were Luminal B, 38,9% were HER2 and 22,2% were triple negative. There was a difference statistically significant between the phenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and the molecular subtypes (p=0,02), being this phenotype more common in the HER2 subgroup. It was also observed that HER2 subtype was related to less CD24 expression in comparison to the other molecular subtypes: Luminal A (p=0,018), Luminal B (p= 0,044), and Triple negative (p=0,031). **Conclusions:** This is the first study that demonstrated a correlation between the phenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> and the subgroup HER2. On the contrary of what was expected we found a higher frequency of CD44v6 (68,2%) in spite of the CD44 (50%), demonstrating a major sensibility of the variant isoform instead of the principal. The lack of CD24 expression was better correlated to the molecular subtypes than the CD44 or CD44v6 isolated expression.

Key words: Breast cancer, phenotype CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, molecular subtypes, stem cells.

## 1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o segundo câncer mais frequente no mundo, e o tumor mais comum entre as mulheres<sup>1, 2</sup>, com exceção dos tumores de pele não melanoma. As taxas de incidência e mortalidade mundial da doença são bastante variáveis. Em muitos países desenvolvidos como EUA e alguns países da Europa, a mortalidade vem decrescendo nos últimos anos, provavelmente fruto de uma política ativa nos meios de detecção precoce da doença, assim como no tratamento adequado. Entretanto em outros países, como o Brasil, por exemplo, a incidência vem aumentando, e a mortalidade também. As taxas de mortalidade por câncer de mama no Brasil aumentaram em aproximadamente 20% entre 1995 e 2005.<sup>3</sup>

Segundo o Instituto Nacional do Câncer<sup>3</sup> (INCA), o câncer de mama é a sétima causa de morte em mulheres brasileiras e a primeira entre as neoplasias malignas, com taxa bruta de mortalidade de 11,49 a cada 100 mil, em 2007. O número de casos novos de câncer de mama no Brasil, estimados para o ano de 2010, foi de 49.240, com um risco estimado de 49 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sul, sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer de mama é o mais incidente entre as mulheres com um risco estimado de 64 casos novos por 100 mil mulheres. Sua incidência é mais que o dobro do que a segunda neoplasia (colo do útero). Isto pode ser decorrente das falhas que ainda existem no sistema de rastreamento mamográfico recomendado e adotado no nosso país. Por isso grandes esforços têm sido feitos para melhorar esta situação. Entretanto, nos deparamos com grandes dificuldades por estarmos lidando com uma doença extremamente heterogênea<sup>4</sup>.

Hoje, busca-se na pesquisa genética do tumor a identificação de diferenças que possam justificar esse comportamento heterogêneo do câncer de mama. O surgimento de novas técnicas de hibridização com microarranjos de cDNA ou oligonucleotídeos permitiram a avaliação do perfil da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo, provendo uma ferramenta poderosa para a caracterização das atividades transcricionais da célula<sup>5,6</sup>. O estudo da atividade transcricional da célula permite identificar assinaturas de expressão gênica que irão predizer o comportamento clínico de cada tumor<sup>7</sup>.

Perou e colaboradores<sup>8</sup> (2000) propuseram a classificação molecular do câncer de mama baseada na identificação de basicamente quatro padrões de expressão gênica: Luminal; ERBB2, Basal e Normal *breast-like*. Vários estudos posteriores validaram esta classificação<sup>9-11</sup>.

Atualmente têm sido reconhecidos cinco subtipos moleculares intrínsecos: Luminal A; Luminal B; HER2; Basal; Claudina-low e o subgrupo Normal *breast-like*<sup>11, 12</sup>. O subtipo Luminal A é caracterizado pela alta expressão de genes de células luminiais e de receptores hormonais, sendo o subtipo que apresenta o melhor prognóstico. O subgrupo Luminal B se diferencia do Luminal A pela alta expressão de genes proliferativos, apresentando, portanto um prognóstico pior em relação ao Luminal A. Os subtipos HER2 e Basal são considerados os subtipos de pior prognóstico em termos de sobrevida global e sobrevida livre de doença.<sup>9-11</sup> O subgrupo *Claudina-low* é o subtipo mais recente e se caracteriza pela baixa expressão de genes envolvidos nas junções celulares e na adesão célula-célula (claudinas-3, 4 e 7 e E-caderina) e alta expressão de genes da matriz extracelular e do mesênquima.<sup>12</sup> Em relação a prognóstico, parece ser semelhante aos dos subgrupos HER2 e Basal. O subtipo Normal *breast-like* tem características de tecido mamário normal, apresentando alta expressão de genes de células adiposas e não epiteliais.<sup>8</sup>

Na linha de desenvolvimento mamário, cada subtipo molecular origina-se de uma célula em diferente fase de diferenciação. O subtipo *Claudina-low*, por ser rico em fatores mesênquimais, parece estar associado ao tipo celular mais primitivo, que seria a própria célula-tronco. Em seguida viria o subtipo basal, que seria originado das células progenitoras.<sup>13</sup> A classificação molecular é baseada, portanto, nos diferentes padrões de expressão gênica de cada tumor. Estes padrões irão se refletir por sua vez, em diferentes padrões de expressão imunoistoquímica. A análise imunoistoquímica pode refletir na grande maioria dos casos, porém não em todos, os padrões de expressão gênicos já descritos<sup>14,15</sup> (Tabela 1).

**Tabela 1. Correlação da Classificação Molecular do Câncer de Mama com a Expressão Gênica e a Análise Imunoistoquímica.**

CLASSIFICAÇÃO	EXPRESSÃO GÊNICA	IMUNOISTOQUÍMICA
LUMINAL A	↑ Expressão genes de células luminais e RH	RE <sup>+</sup> , RP <sup>+</sup> , HER-2 <sup>-</sup> CK luminais <sup>+</sup> (CK8/18)
LUMINAL B	↑ Expressão de genes RH e de genes proliferativos	RE <sup>+</sup> , RP <sup>+</sup> , HER-2 <sup>+</sup> , Ki67 <sup>+</sup>
HER-2	↓ Expressão genes RE ↑ Expressão genes HER-2	RE <sup>-</sup> , RP <sup>-</sup> , HER-2 <sup>+</sup>
BASAL	↓ Expressão genes RE, HER-2 ↑ Expressão genes células Basais	RE <sup>-</sup> , RP <sup>-</sup> , HER-2 <sup>-</sup> CKbasais <sup>+</sup> (CK5/6,14,17)
<i>CLAUDINA-LOW</i>	↓ Expressão genes RE, HER-2, claudinas 3,4e7 e E-caderina ↑ Genes da matriz e Mesênquima	RE <sup>-</sup> , RP <sup>-</sup> , HER-2 <sup>-</sup>
NORMAL <i>BREAST-LIKE</i>	↓ Genes células epiteliais luminais ↑ Expressão genes células adiposas e não epiteliais	RE <sup>-</sup> , RP <sup>-</sup> , HER-2 <sup>-</sup>

A identificação dos diferentes perfis de expressão gênica foi um grande avanço para a compreensão desta doença. Atualmente o tratamento leva em consideração aspectos da biologia tumoral e novas drogas estão sendo desenvolvidas para atuar em vias de sinalização intracelular específicas. Hoje é fundamental que o tratamento de cada paciente seja individualizado e baseado nas características moleculares de cada doença, e para isso, é importante que tenhamos marcadores na prática clínica que identifiquem adequadamente esse perfil a um custo acessível. A identificação dos diferentes subtipos intrínsecos é realizada através da avaliação do perfil de expressão gênica de cada tumor com a técnica de microarranjos de cDNA, porém na prática

clínica, esta técnica não é acessível devido ao alto custo. Outra dificuldade com essa técnica é a necessidade de utilização de material tumoral fresco. A técnica mais utilizada na atualidade por sua facilidade e custo acessível é a imunohistoquímica. Esta técnica é aplicada atualmente a todas as pacientes com diagnóstico de câncer de mama para a dosagem de receptores hormonais (receptor de estrogênio e receptor de progesterona) e a avaliação do HER2. Após esta avaliação são tomadas as decisões terapêuticas: a expressão de receptores hormonais indica a sensibilidade do tumor ao tratamento hormonal e a superexpressão do HER2 a sensibilidade ao tratamento com trastuzumab, um anticorpo monoclonal que se liga diretamente à proteína do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2). Além disso, a avaliação desses três marcadores imunohistoquímicos (RE, RP, e HER2) permite estabelecer uma correlação com os subtipos intrínsecos do câncer de mama,<sup>16</sup> que apesar de não corresponder em todos os casos à avaliação do perfil de expressão gênica realizada com a técnica de microarranjos de cDNA, pode auxiliar na compreensão da biologia tumoral de cada paciente.

O modelo clássico de carcinogênese, ou modelo estocástico, considera que qualquer célula de um órgão pode sofrer mutações e dar início a um clone de células malignas.<sup>17</sup> Neste caso, todas ou quase todas as células de um câncer seriam igualmente malignas, e deveriam, portanto, ser combatidas de maneira igual no tratamento.<sup>18</sup> A hipótese das células-tronco implica em uma mudança completa no pensamento clássico da oncogênese.<sup>19</sup> Neste modelo, o tumor se origina a partir de uma pequena população de células-tronco e/ou progenitoras, que perdem o mecanismo de regulação da auto-renovação,<sup>18,20</sup> levando à expansão dessa população, associada a alterações genéticas e epigenéticas. Esta pequena população de células-tronco é então chamada de células-tronco cancerosas. A natureza dessas mudanças genéticas e epigenéticas e o tipo de progenitor em que ocorrem, provavelmente contribuem para a heterogeneidade celular encontrada nos tumores.<sup>21</sup> Como consequência, os tumores apresentam um pequeno núcleo celular com propriedades de células-tronco, e capacidade de auto-renovação que faz com que elas possam se manter indefinidamente.<sup>19</sup> Neste caso nenhum tratamento alcançará a cura do câncer, se não for capaz de destruir essa pequena população de células, uma vez que estas costumam ser resistentes à quimioterapia e à radioterapia.<sup>22</sup>

Uma das grandes dificuldades de se estudar a teoria das células-tronco no câncer de mama foi a falta de métodos práticos e efetivos que identificassem e isolassem as células-tronco normais e malignas. Al-Hajj e colaboradores<sup>23</sup> foram os primeiros a diferenciar células

cancerosas tumorigênicas de não tumorigênicas através dos marcadores de superfície celular CD44 e CD24. Eles identificaram que o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> estava associado às células-tronco cancerosas, pois a inoculação de apenas 100 células tumorais com esse fenótipo foi capaz de formar tumor em ratos imunodeficientes, enquanto que outros fenótipos de CD44 e CD24 não demonstraram essa capacidade, mesmo quando a inoculação de células era de um número muito maior. Desde então, vários estudos demonstraram que as células que apresentavam este fenótipo teriam características de células-tronco.<sup>24-27</sup> Por outro lado, o significado clínico da prevalência de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> no tumor ainda não é definido. Outro marcador de célula tronco descrito na literatura é a expressão da enzima aldeído desidrogenase 1 (ALDH1). Esta enzima detoxificante é responsável pela oxidação dos aldeídos intracelulares.<sup>28</sup>

Seguindo o raciocínio da hipótese de células-tronco cancerosas podemos presumir que esse grupo de células irá se expandir e se diferenciar em linhagens diferentes e aberrantes, o que irá de alguma forma se traduzir nos subtipos moleculares do câncer de mama.<sup>10</sup> Além disso, como já citado anteriormente, cada subtipo molecular possivelmente deve ser originado de uma célula mamária em um diferente estágio de diferenciação. Neste caso, o subtipo molecular *claudina-low* seria o mais próximo da célula-tronco indiferenciada e o luminal o que seria originado de células luminais diferenciadas. Mudanças epigenéticas também devem influenciar essa diferenciação tumoral através do nicho onde as células crescem. A diferenciação tumoral também pode ser influenciada pelo evento oncogênico que ocorreu, isto é, a mutação que iniciou a transformação e os eventos adicionais que se seguiram a este evento inicial. Ao considerar o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> como um marcador de célula tronco, poderíamos supor que ele seria mais frequentemente associado aos subtipos intrínsecos do câncer de mama de origem celular mais primitiva como o subtipo basal e o *claudina-low*. De fato alguns estudos têm sugerido essa associação.<sup>29-31</sup>

Neste momento, as pesquisas se voltam ao entendimento de como a hipótese da célula-tronco cancerosa poderia ser integrada na nova taxonomia molecular do câncer de mama e como ela poderia ao menos explicar parcialmente a heterogeneidade deste tipo de tumor.<sup>4</sup> Motivados por esses avanços na biologia molecular do câncer de mama, e considerando que o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> é um marcador imunohistoquímico de células de tronco no câncer de mama, este estudo busca responder se existe uma relação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os diferentes subtipos moleculares do câncer de mama.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1.Objetivo Geral**

Estudar a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> em amostras de carcinomas ductais mamários utilizando a técnica de microarranjo de tecidos (TMA) e correlacionar a expressão deste fenótipo com os diferentes subtipos moleculares do câncer de mama.

### **2.2.Objetivos específicos**

- Estudar a frequência de expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.
- Estabelecer correlação entre a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os subtipos moleculares do câncer de mama.
- Estabelecer correlação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os fatores prognósticos clássicos como idade, grau histológico, tamanho do tumor e comprometimento linfonodal.
- Estudar a frequência de expressão dos marcadores imunoistoquímicos CD44, CD44v6 e CD24.
- Estabelecer correlação entre a expressão dos marcadores imunoistoquímicos CD44, CD44v6 e CD24 e os subtipos moleculares do câncer de mama.
- Estabelecer correlação entre os marcadores imunoistoquímicos CD44, CD44v6 e CD24 e os fatores prognósticos clássicos como idade, grau histológico, tamanho do tumor e comprometimento linfonodal.

### 3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1. Fatores Prognósticos

Fatores prognósticos são fatores clínicos, patológicos ou biológicos do câncer que predizem o resultado clínico assim como a sobrevida global ou sobrevida livre de doença, e são usados, portanto, para definir a necessidade de tratamento adjuvante.<sup>32, 33</sup> Fatores preditivos determinam a sensibilidade de um determinado tipo de tumor a um tratamento específico, e, portanto, definem qual tratamento será estabelecido. Os fatores prognósticos do câncer de mama há muito tempo vem sendo estudados. O comprometimento linfonodal é o fator prognóstico independente considerado mais importante. Além disso, são considerados fatores prognósticos bem estabelecidos: idade da paciente, tipo histológico, grau histológico, tamanho tumoral, presença de invasão vascular, expressão de receptores hormonais, e expressão de HER2.<sup>32</sup>

#### 3.2. Idade

A incidência do câncer de mama aumenta rapidamente com a idade durante os anos reprodutivos, e depois aumenta em uma velocidade menor ao redor dos 50 anos, que é a idade média da menopausa. A incidência cumulativa de câncer de mama em mulheres na Europa e América do Norte é em torno de 2,7% aos 55 anos, 5% aos 65 anos, e 7,7% em torno dos 75,2 anos.<sup>34</sup>

A maioria dos estudos indica que o diagnóstico de câncer de mama em idade jovem, é um fator prognóstico negativo independente. As mulheres jovens também estão associadas a um maior risco de terem comprometimento dos linfonodos axilares, tumores com alto grau histológico e receptores de estrogênio negativos. Parte da explicação das mulheres jovens terem doença mais agressiva e mais avançada no momento do diagnóstico poderia ser a possibilidade de um atraso no mesmo. A detecção de tumores em mamas de mulheres jovens e lactantes é difícil devido à densidade da glândula mamaria. Além disso, na idade jovem a mulher ainda não participa de nenhum programa de rastreamento.<sup>35</sup>

Por outro lado, o critério para determinar o que seria considerado como idade jovem varia bastante na literatura e ainda não há uma definição padrão. A maioria dos estudos tem considerado como mulheres jovens as mulheres que se encontram na pré-menopausa, com idade menor ou igual a 45, 40, ou 35 anos. Muitos estudos têm descrito o grupo “muito jovem” como sendo com idade menor que 35 anos ou ainda entre 20-29 anos.<sup>36</sup> Winchester e colaboradores<sup>37</sup> analisaram um total de 508.724 casos de câncer de mama em registros hospitalares, no banco de dados Nacional do câncer dos Estados Unidos, no período de 1985 a 1993 e encontraram que as mulheres com idade menor que 35 anos apresentavam tumores primários de maior grau histológico, estadio patológico ou clínico mais avançado e pior taxa de sobrevida em 5 anos no estadio II, do que as mulheres entre 35 e 49 anos. Também encontraram uma maior porcentagem de tumores de alto grau nas pacientes abaixo de 35 anos (66,1%) se comparadas com as mulheres acima de 50 anos (39,9%).

### **3.3. Tipos Histológicos**

Os tipos histológicos estão divididos basicamente em carcinomas ductais e subtipos especiais. A Organização Mundial de Saúde (OMS) reconhece 20 tipos morfológicos diferentes de carcinoma invasor da mama, além das chamadas lesões precursoras, que incluem a neoplasia lobular, as lesões proliferativas intraductais, o carcinoma microinvasor e as neoplasias intraductais papilares.<sup>38</sup> O carcinoma ductal sem outra especificação (SOE) é o tipo histológico mais comum, ocorrendo em aproximadamente 70 a 80% dos casos e engloba os tumores que não podem ser classificados em qualquer outro subtipo por não apresentarem características específicas em mais de 50% da massa tumoral.<sup>39, 40</sup> Os outros 19 tipos de carcinoma de mama enquadram-se nos chamados tipos especiais de carcinoma mamário. Vinte por cento deles correspondem ao carcinoma lobular, seguido pelos carcinomas tubulares e mucinosos, sendo os demais tipos vistos em menor frequência. Para estabelecer um diagnóstico de tipo especial de carcinoma mamário, o tumor precisa apresentar 90% do seu padrão característico.<sup>38</sup>

### 3.4. Comprometimento linfonodal

Pacientes com linfonodos positivos tem mortalidade aproximadamente 4 a 8 vezes maior se comparado com aqueles sem comprometimento linfonodal.<sup>41, 42</sup> Quanto maior o número de linfonodos comprometidos pior o prognóstico. O prognóstico para pacientes com 10 ou mais gânglios comprometidos mostrou mortalidade 70% maior em 10 anos, que aqueles com 1 a 3 gânglios.<sup>43</sup>

### 3.5. Tamanho tumor

O tamanho tumoral é um dos indicadores prognósticos mais fortes.<sup>44, 45</sup> Um tumor maior tem sido associado a uma maior quantidade de linfonodos positivos,<sup>43</sup> e essa interação influencia a sobrevida do câncer de mama. Para pacientes com linfonodos negativos e tumores entre 2-5 cm a sobrevida global em 10 anos é em torno de 66%, comparado com aqueles com tumores menores de 1 cm, cuja sobrevida é de 79%.<sup>46</sup>

### 3.6. Grau Histológico

O grau histológico também é considerado um dos fatores prognósticos mais importantes de avaliação, junto com o tamanho tumoral e o comprometimento de linfonodos. A sobrevida cumulativa em pacientes com tumores grau I foi de 90-94% em 10 anos após o diagnóstico, dependendo do *status* nodal e do tamanho do tumor.<sup>47, 48</sup> Entretanto, os tumores grau 3 têm sido consistentemente associados a sobrevidas menores.<sup>42, 44, 49</sup>

O sistema de graduação utilizado atualmente é o de Nottingham-Bloom-Richardson,<sup>50</sup> o qual tem sido endossado pelo Colégio Americano dos Patologistas e pela OMS. Ele consiste em uma pontuação para cada uma das seguintes características:

- a) **Formação Tubular:** score 1 (na maior parte do tumor, > 75%), score 2 (entre 10% e 75%) e score 3 (em menos de 10%).
- b) **Grau nuclear (pleomorfismo):** score 1 (núcleos pequenos, com pouco aumento ou variação no seu tamanho em comparação com os núcleos das células epiteliais ductais normais, com contornos regulares e uniformidade de cromatina nuclear), score 2 (núcleos maiores do que

os núcleos das células ductais normais, aspecto vesiculoso, nucléolos mais visíveis, geralmente únicos e com moderada variação no seu tamanho e forma) e escore 3 (variação acentuada no tamanho e forma nuclear; núcleos volumosos e bizarros, vesiculosos, com nucléolos grandes proeminentes, geralmente múltiplos).

- c) **Índice mitótico:** as figuras de mitose, contadas em dez campos de maior aumento na periferia do tumor, onde a atividade proliferativa é mais intensa.

Após a somatória dos valores dados para cada uma das características acima citadas, os carcinomas de mama invasivos serão classificados em três graus:

- **Grau I, baixo grau (bem diferenciado):** 3 a 5 pontos;
- **Grau II, grau intermediário (moderadamente diferenciado):** 6 a 7 pontos;
- **Grau III, alto grau (pouco diferenciado):** 8 a 9 pontos.

### 3.7. Invasão vascular

Em 2005, na conferência de *Saint Gallen*, a invasão linfovascular foi incluída oficialmente como fator de risco a ser considerado na decisão do tratamento adjuvante.<sup>51</sup> Atualmente, a presença de invasão linfovascular é considerada fator prognóstico independente para sobrevida global e sobrevida livre de doença.<sup>52</sup> Os vasos linfáticos ao redor do tumor são a principal rota para as células tumorais migrarem em direção aos linfonodos axilares.<sup>53</sup> A presença de invasão linfovascular é, portanto, pré-requisito para a disseminação tumoral via sistema linfático, e está associada a um maior risco de desenvolver metástases ganglionares.<sup>52</sup>

### 3.8. Expressão de Receptores Hormonais

Os receptores hormonais (RH) são marcadores prognósticos já bem estabelecidos, porém a sua principal vantagem está em determinar a sensibilidade ao tratamento hormonal.

A expressão de receptores de estrogênio (RE) acredita-se estar presente em dois terços dos tumores de mama.<sup>54</sup> O *status* do RE é fortemente relacionado ao grau histológico e ao tipo histológico.<sup>55</sup> Nadji e colaboradores<sup>56</sup> estudaram quase 6000 tumores e demonstraram que quase todos os tumores grau 1, os tubulares puros, os colóides e os lobulares clássicos são RE positivos.

A expressão dos receptores de progesterona (RP) tem um papel prognóstico independente em termos de recidiva de doença e sobrevida global. Os tumores RE<sup>+</sup>/RP<sup>+</sup>, portanto, tem um prognóstico melhor que os tumores RE<sup>+</sup>/RP<sup>-</sup>, que por sua vez tem um prognóstico melhor que os tumores RE<sup>-</sup>/RP<sup>-</sup>.<sup>57</sup>

### **3.9. Expressão de HER2**

A proteína-2 do receptor epidérmico humano (*c-erb B2/neu protein*; HER2) é uma glicoproteína transmembrana da família dos receptores de fator de crescimento epidérmico. Ela é expressa em níveis baixos, em uma variedade de epitélios normais, incluindo o epitélio ductal da mama. Entretanto, em 10-20% dos cânceres de mama ocorre a superexpressão desta proteína, decorrente da amplificação do gene do *HER2*.<sup>58</sup> A superexpressão HER2 e/ou amplificação gênica, é um marcador independente de mau prognóstico, tanto em pacientes com linfonodos negativos, como em pacientes com linfonodos positivos.<sup>59-62</sup> Entretanto, a maior utilidade do HER2 vem sendo como fator preditivo. Os tumores que superexpressam o HER2, tem mostrado maior sensibilidade a regimes de quimioterapia baseados em antraciclinas.<sup>63-66</sup> Além disso, esses tumores são sensíveis aos mais recentes tratamentos que tem surgido ultimamente: as terapias alvo, como por exemplo, o trastuzumab. O trastuzumab é um anticorpo monoclonal, que mostrou uma melhora importante na taxa de resposta da doença e nas taxas de sobrevida, tanto quando usado como monoterapia ou em conjunto com a quimioterapia.<sup>67-69</sup> Estudos recentes têm mostrado que o uso do trastuzumab no tratamento adjuvante do câncer de mama inicial pode reduzir o risco de recorrência pela metade e a mortalidade em um terço.<sup>70, 71</sup> A avaliação do HER2 é, portanto obrigatória hoje, para a definição do tratamento adjuvante.

### **3.10. Perfis de expressão gênica**

Perou e colaboradores<sup>8</sup> (2000) propuseram que a diversidade fenotípica dos tumores de mama deveria ser acompanhada por uma correspondente diversidade nos padrões de expressão gênica. Eles analisaram então, os diferentes padrões de expressão gênica em tecidos mamários normais ou malignos em 65 espécimes cirúrgicos de 42 indivíduos; foram analisados um total de 8.102 genes através de sondas de microarranjo de cDNA. Para isto, foi selecionado um subgrupo

de 496 genes, chamados genes intrínsecos, que apresentavam uma variação significativamente maior de expressão entre amostras de indivíduos diferentes, do que entre amostras pareadas de um mesmo indivíduo. Os padrões de expressão global destes genes intrínsecos mostraram que a principal distinção foi entre os tumores que expressavam os genes característicos das células epiteliais luminais, incluindo os receptores de estrogênio (RE) e aqueles que eram negativos para esses genes. Eles identificaram a princípio quatro grupos com diferentes perfis moleculares de expressão gênica, que seriam:

- 1) **Luminal/RE<sup>+</sup>**: apresenta expressão relativamente alta de muitos genes expressos por células luminais mamárias e de genes de receptores hormonais, o que foi confirmado por imunistoquímica, que mostra positividade de receptores de estrogênio e de citoqueratinas luminais 8/18.
- 2) **Basal**: caracterizado por expressar genes de células mioepiteliais ou basais e não expressar genes de receptores hormonais ou HER2. Na imunistoquímica, isso foi comprovado pela negatividade de receptores hormonais e da proteína HER2 e pela positividade de citoqueratinas basais como a 5/6 e a 17.
- 3) **ERBB2<sup>+</sup>**: caracterizado por uma superexpressão do oncogene *ERBB2* e uma baixa expressão dos genes associados aos receptores hormonais. Na imunistoquímica consequentemente os receptores hormonais foram negativos e a proteína HER2 positiva.
- 4) **Normal *breast-like***: este padrão ocorreu em algumas amostras de tumores, no único fibroadenoma testado e nas 3 amostras de tecidos normais. Observou-se alta taxa de expressão gênica de células adiposas e de outras células não epiteliais e baixa expressão de genes de células epiteliais luminais. Porém, não se pode definir ao certo se, se tratava de um tecido tumoral pobremente amostrado ou de um grupo clinicamente significativo.

Em outro estudo, Sorlie & Perou<sup>9</sup> (2001) ampliaram o tamanho da amostra do estudo anterior<sup>8</sup> e exploraram a importância clínica dos diferentes grupos propostos. Eles encontraram inicialmente, diferenças entre 5 ou 6 subgrupos, porque observaram uma divisão do grupo Luminal em: Luminal A, Luminal B, e Luminal C. O grupo Luminal A era o que possuía uma alta expressão dos genes dos receptores de Estrogênio e os grupos Luminal B e C possuíam uma baixa ou moderada expressão desses genes. O grupo Luminal C se distinguia por expressar um novo grupo de genes cuja função é desconhecida, mas que também se encontrava presente nos grupos Basal e HER2. Os autores analisaram a sobrevida global e a sobrevida livre de doença,

para comprovar se realmente existiria um papel prognóstico diferente nos diferentes grupos. As curvas de Kaplan-Meier mostraram uma diferença estatisticamente significativa em termos de sobrevida global e sobrevida livre de doença entre os grupos, sendo que o grupo basal e o ERBB2 foram associados com os menores intervalos de sobrevida e com o pior prognóstico.

Sorlie e colaboradores<sup>10</sup> (2003) analisaram usando sondas de microarranjos de cDNA, amostras de tumores provenientes de dois estudos independentes de resposta a quimioterapia em pacientes com câncer de mama localmente avançado. Foram analisadas 122 amostras de tecidos, sendo 115 carcinomas e 7 tecidos não malignos. Neste estudo, apesar de ser uma amostra diferente, foram identificados os mesmos 5 subgrupos moleculares de expressão gênica descritos anteriormente (Luminal A; Luminal B; Basal; HER2; e normal *breast-like*). A maior distinção foi observada entre os tumores que mostraram uma alta expressão de genes específicos do epitélio luminal (Luminal A) e todos os outros tumores que mostraram expressão baixa ou ausente destes genes. Foi analisado também neste estudo o tempo para o desenvolvimento de metástase e os autores encontraram resultados similares ao estudo anterior, com intervalos livres de doença mais curtos para os subtipos basal e HER2, mais longo para o Luminal A e intermediário para o Luminal B.

Assim, ao longo dos últimos dez anos muitos estudos validaram e consolidaram a classificação molecular do câncer de mama<sup>8-11</sup> e basicamente identificaram 4 subtipos moleculares intrínsecos: LUMINAL A, LUMINAL B, HER2, E BASAL. Como a análise molecular com microarranjo só pode ser realizada em material tumoral fresco, não permite a análise retrospectiva de grandes séries, então para tentar estabelecer um perfil epidemiológico dos subtipos moleculares propostos, alguns estudos realizaram a análise imunoistoquímica em blocos de parafina.

Ihemelandu e colaboradores<sup>14</sup> (2007) consideraram os grupos: **1) Luminal A:** RE e/ou RP<sup>+</sup> e HER2<sup>-</sup>; **2) Luminal B:** RE e/ou RP<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup>; **3) HER2:** RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, e HER2<sup>+</sup>; e **4) Basal:** RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>. O grupo Luminal A foi o mais prevalente (55,4%), comparado com Luminal B (11,8%), basal (21,2%) e HER2 (11,6%). Não houve diferença em relação ao status de menopausa, mas quando os grupos foram estratificados por idade, o subtipo basal foi o mais prevalente (57,1%) no grupo abaixo de 35 anos, comparado com o luminal A (25%), luminal B (14,3%) e HER2 (3,6%). Os autores observaram também uma diferença significativa de sobrevida (p<0,04) em relação aos subtipos moleculares, sendo os subtipos: basal e HER2 os que

apresentaram o pior prognóstico. Outro estudo de marcação imunistoquímica de 1424 casos de carcinoma invasor e *in situ*, de um estudo caso-controle populacional na Carolina do Norte,<sup>15</sup> foi realizado para avaliar o perfil epidemiológico dos subtipos moleculares de câncer de mama. Neste trabalho, os autores consideraram: **1) Luminal A:** RE e/ou RP<sup>+</sup>, HER2<sup>-</sup>; **2) Luminal B:** RE e/ou RP<sup>+</sup>, HER2<sup>+</sup>; **3) HER2:** RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>; e **4) Basal:** RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>, EGFR<sup>+</sup> e/ou CK 5/6<sup>+</sup> e **5) Não classificado:** quando apresentava todos os marcadores negativos. A frequência dos subtipos moleculares encontrada mostrou uma prevalência dos casos luminal A (56%), comparado com luminal B (10%), basal (16%), HER2 (8%), e não classificados (10%). Mulheres brancas na pós-menopausa mostraram a maior prevalência de casos luminal A, enquanto que mulheres afro-americanas na pré-menopausa mostraram a maior prevalência de carcinoma de mama basal.

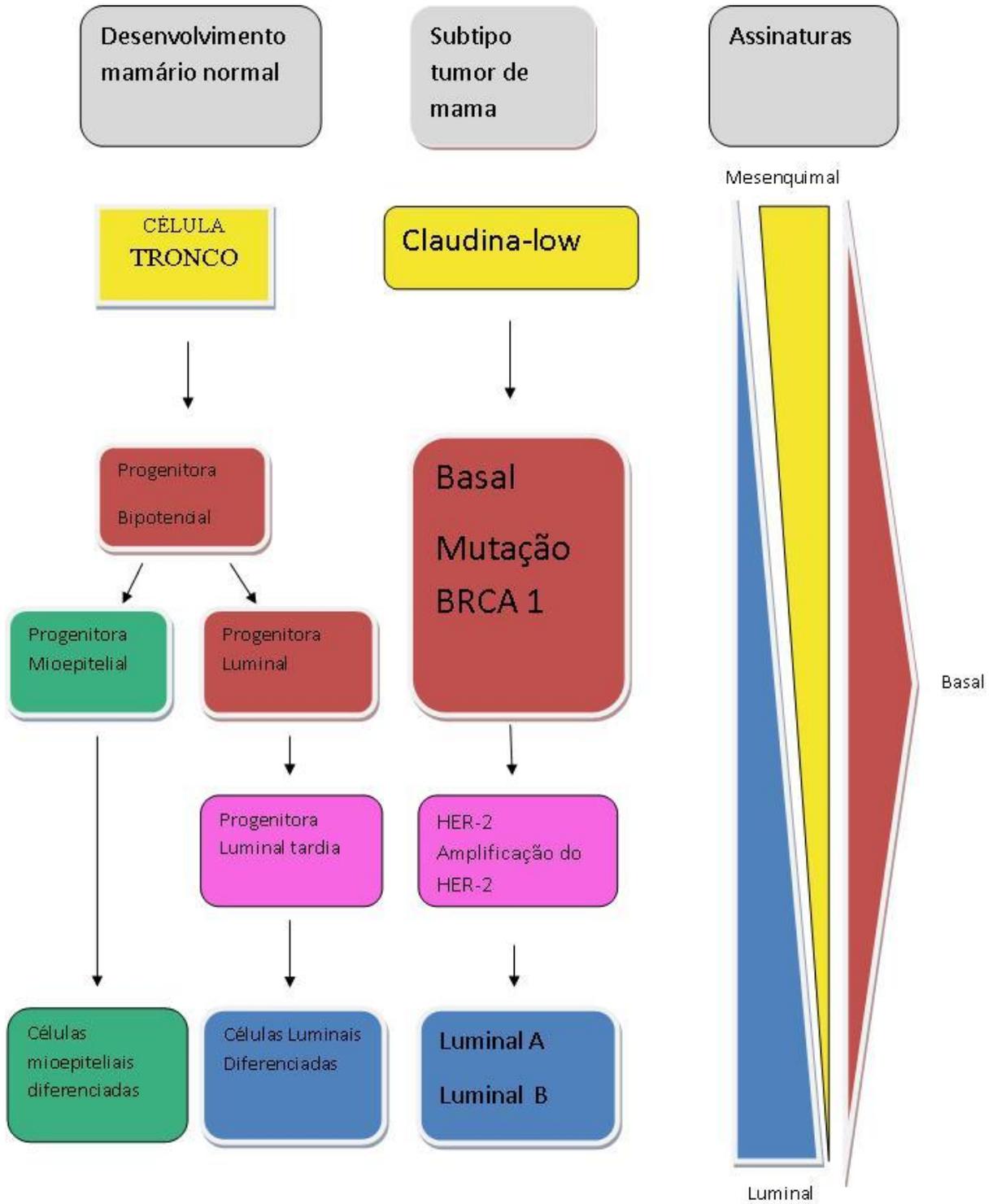
Herschkowitz e colaboradores<sup>12</sup> (2007) analisaram 232 amostras humanas e compararam os seus perfis de expressão gênica com 108 tumores mamários de modelos geneticamente construídos em ratos. Eles identificaram um novo subtipo molecular que se caracterizava pela baixa expressão de genes envolvidos nas junções celulares e nas moléculas de adesão célula-célula, como as claudinas 3,4 e 7 e a E-caderina, uma glicoproteína de adesão célula-célula dependente de cálcio. Esse novo subtipo estava presente tanto nas amostras tumorais de humanos como de ratos e foi denominado *Claudina-low*. Ele caracteriza-se na maioria dos casos, por ser RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>-</sup>, isto é triplo negativo e de mau prognóstico.

No intuito de caracterizar melhor o novo subgrupo *Claudina-low*, Prat et al<sup>72</sup> (2010) analisaram amostras de 320 tumores de mama e 17 tecidos mamários normais. Os autores utilizaram a mesma lista de aproximadamente 1900 genes intrínsecos relatada por Parker et al<sup>73</sup> (2009) para identificar os subtipos intrínsecos da amostra. Eles encontraram o subtipo *Claudina-low* muito próximo ao subtipo basal e observaram, portanto, que este novo subgrupo divide algumas características comuns com o subgrupo basal, como: baixa expressão gênica do HER2 e dos genes luminais, assim como das citoqueratinas luminais 8 e 18. Entretanto, este grupo possui algumas características únicas que o diferenciam como: a) baixa expressão de genes que atuam na adesão célula-célula, como as claudinas 3, 4, 7, cingulina e ocludina que estão presentes nas junções intercelulares, e a E-caderina que é uma proteína de adesão celular dependente dos canais de cálcio; b) alta expressão de genes de resposta do sistema imunológico. Muitos desses genes são expressos por células T e B (por exemplo: CD14 e CD79a), indicando um grande infiltrado

imune celular nesse subtipo tumoral; c) baixa expressão dos genes de proliferação celular, que costumam estar altos nos subtipos de pior prognóstico como o basal, HER2 e luminal B. Porém, esta expressão não é tão baixa como no subtipo luminal A e normal *breast-like*. Por isso esses tumores podem ser considerados de ciclo celular lento; d) Alta expressão de genes da matriz extracelular e do mesênquima (por exemplo: laminina, e integrina alpha 7), parecida com a expressão desses genes nos subtipo normal *breast-like*.

A prevalência dos tumores *Claudina-low* é baixa e foi descrita em torno de 12-14%.<sup>72</sup> Esses tumores caracterizam-se por ser de alto grau e de pior prognóstico, assim como por apresentar perfil imunoistoquímico triplo negativo. A maioria são carcinomas ductais, mas com uma alta frequência de diferenciação metaplásica e medular. Eles se caracterizam também por apresentar baixa expressão de marcadores de superfície das células luminas diferenciadas (CD24, EpCAM, e MUC 1) e alta expressão de marcadores como CD44 e CD49f se comparados com os tumores luminas diferenciados. Por isso o padrão de expressão desses marcadores é concordante com o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, que está associado a células tronco mamárias. Então esse tipo de tumor estaria enriquecido por características de mesênquima e de células-tronco. E corresponderia ao estágio mais indiferenciado na linha de origem mamária, antes mesmo do subtipo basal.

Desta forma, na linha de desenvolvimento mamário cada subtipo molecular estaria associado a um tipo de célula em uma determinada fase do desenvolvimento. A célula-tronco mais primitiva estaria fortemente associada ao subtipo *Claudina-low*, em seguida as células progenitoras basais e luminas estariam associadas ao subtipo Basal, as células progenitoras luminas tardias seriam associadas ao subtipo HER2, e as células luminas diferenciadas dariam origem aos subtipos Luminal A e Luminal B<sup>13</sup> (Figura 1).



**Figura 1 - Modelo da hierarquia epitelial mamária humana relacionada aos subtipos moleculares de câncer de mama.**

**Fonte: Mammary development meets cancer genomics.<sup>13</sup>**

Os tumores basais representam 10-25% de todos os tumores dependendo das características demográficas de cada população.<sup>74</sup> A maioria dos tumores triplo negativos (aproximadamente 80%) são também cânceres de mama do tipo basal e a maioria dos tumores basais são também triplo negativos. Por isso, acreditou-se no início que esses dois subtipos eram sinônimos.<sup>75</sup> Hoje sabe-se que isso não é verdade. Os tumores triplo negativos englobam pelo menos dois grupos: o grupo basal e o grupo não basal.<sup>76</sup> O grupo basal é o maior grupo e constitui cerca de 50-80%, sendo caracterizado pela alta expressão de marcadores basais (CK5/6, CK14, CK17, EGFR, c-KIT). No perfil genômico apresenta evidência de instabilidade genômica, perda frequente de 5q, mutação em *BRCA1*, e mutação frequente em *TP53*. O grupo de não basais é constituído por sua vez por pelo menos três subgrupos, que são o normal *breast-like*, o *claudina low*, e os marcadores múltiplos negativos. O grupo normal *breast-like* se caracteriza pela alta expressão de genes característicos da mama normal e tecido adiposo. O grupo *claudina low* apresenta baixa expressão de genes envolvidos nas junções celulares e na adesão célula-célula (claudinas 3, 4, 7, ocludina, E-caderina), baixa expressão de genes basais, alta expressão de linfócitos, marcadores de células endoteliais, marcadores de células-tronco e de EMT (transição epitélio mesênquima). O grupo de marcadores múltiplos negativos se caracteriza pela falta de expressão de marcadores basais (CK5/6, CK14, CK17, EGFR, c-KIT) e alta expressão de CK8.<sup>76</sup>

Os tumores basais podem ser identificados então pelo perfil de expressão gênica ou por critérios de imunoistoquímica. A avaliação do perfil de expressão gênica tem a dificuldade de não ser acessível na prática clínica. Por outro lado, não há consenso nos critérios de imunoistoquímica que definem o carcinoma basal. Os carcinomas basais são normalmente triplo negativos (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, e HER2<sup>-</sup>) e associados à expressão de um ou mais marcadores imunoistoquímicos basais como CK5 ou CK5/6, EGFR, CK14, p-caderina, e c-KIT.<sup>77</sup> Hoje muitos estudos têm estudado particularmente o grupo triplo negativo como representante dos tumores basais. Apesar de não serem sinônimos, o grupo de triplo negativos engloba a maioria dos tumores basais e tem a facilidade de serem facilmente identificados na prática clínica pela ausência de expressão dos receptores hormonais e da proteína HER2. Os tumores triplo negativos se caracterizam por um comportamento agressivo e estão associados a um pior prognóstico. Se comparados com os outros subgrupos, eles tem uma maior probabilidade de recorrência a distância e morte nos primeiros cinco anos do diagnóstico, sendo que o pico de recorrência encontra-se entre o primeiro e o terceiro ano, declinando rapidamente após.<sup>76, 78</sup> Eles representam

também um grande desafio de tratamento, porque são tumores agressivos, que respondem bem apenas ao tratamento quimioterápico, mesmo assim apresentam um intervalo livre de doença menor, e não possuem nenhum tipo de terapia alvo. Novas terapias para este grupo estão sendo desenvolvidas.

### 3.11. Hipótese Células-Tronco Cancerosas

Células-tronco são definidas classicamente como células com capacidade constante de auto-renovação e de diferenciação em múltiplas linhagens celulares, tendo o potencial de formar, portanto, todos os tipos de células que são encontradas em um tecido maduro.<sup>18, 21, 79</sup> Todos os tecidos no corpo humano são derivados de células-tronco, sendo que cada célula-tronco irá se diferenciar de maneira específica para a formação de cada órgão.<sup>21</sup> A fim de manter essa habilidade indefinidamente, elas são capazes de se auto-renovar de forma simétrica e assimétrica.<sup>18</sup> Na forma simétrica elas se dividem para gerar duas células filhas iguais à célula mãe. Na forma assimétrica elas formam uma célula-tronco filha igual, e uma célula que sai e deixa o nicho da célula-tronco para se diferenciar.<sup>80</sup> Então a célula filha idêntica mantém o compartimento de células-tronco através do tempo; e a outra célula sofre uma série de divisões e transformações que resultam na formação de populações celulares diferenciadas. As células em estágio intermediário entre as células tronco e as células completamente diferenciadas, são chamadas normalmente de células progenitoras, ou células trânsito.<sup>81</sup> Apesar de ambas as células, tronco e progenitoras se dividirem e produzirem produtos finais similares (uma gama de progenitoras diferenciadas), elas diferem na sua habilidade de proliferar e de manter um estado indiferenciado por um longo período de tempo.<sup>82</sup>

A teoria das células-tronco considera que o tumor surge a partir de um pequeno núcleo de células-tronco ou progenitoras, que perdem o mecanismo de controle da auto-renovação passando a se diferenciar e crescer indefinidamente.<sup>18-20</sup> Ao contrário da teoria clássica que considera que o tumor pode se formar a partir de qualquer célula que passe a se diferenciar e crescer indefinidamente, formando um clone de células malignas.<sup>17</sup> Esta teoria das células-tronco pode explicar porque existe resistência a alguns tipos de tratamentos. Evidências recentes sugerem que as células-tronco do carcinoma mamário, assim como as células-tronco de outros tipos de tumores, são relativamente resistentes a radioterapia e quimioterapia.<sup>22</sup> Existem muitos

mecanismos possíveis para este fato. As células-tronco são de baixa proliferação, a maioria permanece na fase G0 do ciclo celular por longos períodos de tempo, o que as torna resistentes aos quimioterápicos ativos contra o ciclo celular. Além disso, estas células expressam um aumento das proteínas cassete de ligação à adenosina trifosfato, que são conhecidas por provocar o efluxo dos agentes quimioterápicos, como por exemplo, a proteína transporte ABCG2, ou proteína de resistência ao câncer de mama. Esta molécula é superexpressa nas células-tronco e funcionaria como um mecanismo de defesa para essas células.<sup>83</sup> Além disso, enzimas como a aldeído desidrogenase (ALDH), que são altamente expressas nas células-tronco, são capazes de metabolizar agentes quimioterápicos como a ciclofosfamida.<sup>84</sup> As células-tronco também podem expressar altos níveis de moléculas anti-apoptóticas como a survivina e proteínas da família Bcl-2.<sup>85</sup>

### 3.12. Células-Tronco Mamárias

A existência de células-tronco mamárias foi primeiramente sugerida por DeOme et al <sup>86</sup> (1959) em estudos de transplante. Foi demonstrado em ratos que epitélios extraídos de diversas regiões da glândula mamária, em vários estágios de desenvolvimento pós-natal, são capazes de gerar um epitélio mamário completamente funcional contendo ductos, lóbulos e células mioepiteliais. Desse modo, a glândula mamaria lembraria o sistema hematopoiético, no sentido de que ambos podem ser gerados por transplante. Além disso, foi também demonstrado que pode ser retirado um fragmento dessa glândula regenerada e com este podem ser realizados transplantes subsequentes para outros blocos de gordura mamária.<sup>87</sup> A célula-tronco mamária mostrou senescência do crescimento ductal apenas após seis gerações de transplantes seriados.<sup>88,89</sup>

Na glândula mamária as células-tronco se diferenciam em três linhagens celulares<sup>18</sup>:

- 1) **Células epiteliais ductais luminais:** Células que revestem os ductos.
- 2) **Células epiteliais alveolares:** Células produtoras de leite.
- 3) **Células mioepiteliais:** Células contráteis que se encontram nos ductos e nos alvéolos.

Boecker et al <sup>90</sup> (2003) identificaram células progenitoras das linhagens celulares luminal e mioepitelial, usando imunofluorescência para citoqueratina 5 (basal), citoqueratinas 8/18 (glandulares/luminais) e actina músculo liso (mioepitelial). Korsching e colaboradores<sup>91</sup> (2002)

propuseram que diferentes subgrupos celulares da glândula mamária dariam origem a diferentes subtipos de carcinomas mamários com diferentes expressões de proteínas, diferentes alterações citogenéticas e que poderia haver uma correlação entre estes subtipos e o comportamento clínico. Antes da classificação molecular baseada em perfis de expressão gênica ser publicada<sup>10</sup>, eles haviam proposto uma classificação de carcinomas mamários baseada na expressão de citoqueratinas relacionada ao impacto clínico. Outros grupos em todo mundo avaliaram o impacto da classificação baseada em citoqueratinas no prognóstico e taxonomia do câncer de mama.<sup>92-94</sup>

### 3.13. Marcadores de Células-Tronco

Hal Hajj et al<sup>23</sup> (2003) demonstraram uma população específica de células que tinha a capacidade de iniciar a formação de tumores de mama em ratos NOD/SCID, e as chamaram de células tumorigênicas ou células iniciadoras do câncer. Eles puderam identificar marcadores de superfície celular com capacidade de diferenciá-las da outra população de células que não era capaz de formar tumor, demonstrado pela presença ou ausência dos marcadores CD44 e CD24. A população celular que expressava CD44 e não expressava CD24 (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>) foi a única população que apresentou capacidade de formação tumoral. Esse fenótipo tumorigênico tem sido associado com características semelhantes às células-tronco,<sup>24</sup> como propriedades invasoras aumentadas,<sup>25</sup> resistência a radiação<sup>26</sup> e com diferentes perfis genéticos sugerindo correlação com um pior prognóstico.<sup>27</sup> A prevalência de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> entre os tumores mamários, entretanto, não tem sido significativamente associada com características clínicas, apesar de tumores com uma maior fração de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> serem mais comumente encontrados em pacientes diagnosticadas com metástase à distância.<sup>95</sup>

Ginestier et al<sup>28</sup> demonstraram que células mamárias humanas normais e cancerosas com aumento da atividade da aldeído desidrogenase (ALDH) apresentam propriedades de células tronco/progenitoras. Os autores também demonstraram que em uma série de 577 carcinomas mamários, a expressão de ALDH1 esteve associada a um pior prognóstico. Foi demonstrado, portanto, que tanto o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> como a expressão de ALDH1, podem ser utilizados como marcadores imunistoquímicos de células-tronco cancerosas mamárias.

CD44 é uma molécula de adesão envolvida na ligação das células ao ácido hialurônico, enquanto que CD24 é um regulador negativo do receptor de quimiocina *CXCR4*, uma molécula envolvida na metástase do câncer de mama <sup>95</sup>. A molécula CD44 é uma glicoproteína da membrana plasmática, codificada por um único gene no cromossomo 11. O gene humano CD44 consiste em pelo menos 20 exons, 10 dos quais são expressos juntos na forma standard do CD44. Os outros são exons variantes, sujeitos a *splicing* alternativo, que dão origem a muitas isoformas.

As glicoproteínas CD44 compreendem uma família de receptores da superfície celular que reconhecem a hialurana, um componente da matriz extracelular, como o seu principal ligante.<sup>96-98</sup> A ligação do CD44 à hialurana, não apenas media a adesão celular a esta abundante glicosaminoglicana da matriz extracelular, mas também, permite às células internalizar e degradar a hialurana.<sup>99</sup> Esse processo pode contribuir para o remodelamento do tecido e pode estimular proliferação e migração celular.<sup>97</sup> A isoforma *standard* CD44 é expressa em uma grande variedade de tecidos normais.<sup>100</sup> Existem muitas variantes de *splicing* do CD44 e essas variantes geralmente tem uma expressão mais restrita.<sup>101</sup> As isoformas variantes do *CD44* são formadas através de *splicing* alternativo de um ou mais exons, principalmente dos exons *standard* 5 e 6.<sup>98, 100</sup> As proteínas variantes CD44 contêm uma sequência de aminoácidos adicional no domínio extracelular entre a região transmembrana e a região de ligação à hialurana. Parece que a habilidade do CD44 em se ligar à hialurana é reduzida pela presença de seus exons variantes.<sup>102</sup> Tem sido proposto que a regulação aumentada de uma ou mais das variantes CD44 pode alterar a regulação, proliferação, e migração celular, levando à progressão de alguns tipos de tumores.<sup>97, 103</sup> As isoformas do CD44 que contêm o exon 6 (CD44v6) são as variantes que tem sido estudadas mais extensivamente. A isoforma CD44v6 tem demonstrado mediar o processo de metástase nas linhagens celulares do câncer de mama e câncer pancreático em ratos <sup>103</sup> e a sua expressão tem sido associada a um pior prognóstico no linfoma não-Hodgkin <sup>104</sup> e carcinoma colo retal.<sup>105</sup>

Alguns estudos têm demonstrado que a expressão de marcadores de células-tronco nos tumores mamários tem implicação prognóstica.<sup>18</sup> Estudos translacionais têm demonstrado que uma maior fração de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> está associada a um menor intervalo livre de doença e sobrevida global e a uma maior incidência de metástase à distância.<sup>95</sup> O fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> por ter sido considerado como um marcador de célula-tronco, conseqüentemente poderia estar relacionado ao fenótipo basal, e mais recentemente ao subtipo *claudina-low*, ambos ligados às

linhagens celulares mais primitivas,<sup>29-31</sup> e ambos tumores de pior prognóstico. Os tumores de fenótipo basal podem ser parecidos com as células-tronco, devido a um provável bloqueio na diferenciação, fazendo com que a maioria das células que constituem os tumores basais, sejam células não diferenciadas.<sup>4, 94</sup>

Entretanto, uma correlação específica entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os subtipos moleculares de câncer de mama ainda não foi bem definida em tumores mamários humanos,<sup>29</sup> e é campo constante de pesquisa atualmente.

#### 4. MATERIAL E METODOS

Foram selecionados 148 casos de carcinomas ductais mamários de mulheres submetidas à cirurgia na Unidade da Mama do Hospital Nossa Senhora das Graças (UM-HNSG), em Curitiba, no período de janeiro de 1998 a julho de 2009. Os casos foram selecionados a partir do banco de dados desta unidade, de maneira não consecutiva, de modo a representar de maneira significativa os quatro subtipos mamários intrínsecos com base nos critérios imunoistoquímicos (Luminal A, Luminal B, HER2, e Triplo Negativo).

A UM-HNSG é reconhecida pelo SenoNetwork, entidade ligada à Sociedade Europeia de Oncologia e Sociedade Europeia de Mastologia, por estar de acordo com o “*European Guidelines for quality assurance in breast cancer screening and diagnosis*”. Todos os casos foram operados pela mesma equipe de cirurgiões e o diagnóstico anatomopatológico e perfil imunoistoquímico realizado na época da cirurgia foi realizado no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças (HNSG) pelo mesmo grupo de patologistas.

Foram selecionados 148 casos de mulheres submetidas à mastectomia ou cirurgia conservadora da mama, com linfonodo sentinela ou esvaziamento axilar e diagnóstico histológico de carcinoma ductal invasor (SOE), que não tivessem sido submetidas à quimioterapia neoadjuvante, e cujos blocos pudessem ser utilizados sem que todo o material parafinado se esgotasse. Após essa seleção inicial, foram excluídos 15 casos, por não apresentarem disponíveis os dados de idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo nos laudos anatomopatológicos ou nos prontuários das pacientes, ou porque não haviam realizado o exame imunoistoquímico dos receptores hormonais e da expressão do HER2 no serviço de Anatomia Patológica do Hospital Nossa Senhora das Graças, pelo mesmo patologista (LFBT). A amostra ficou então constituída por 133 casos, distribuída da seguinte maneira em relação aos subtipos moleculares intrínsecos:

- 1) 42 casos Luminal A, que apresentam receptor de estrogênio e/ou receptor de progesterona positivos e HER2 negativo;
- 2) 31 casos Luminal B, que apresentam receptor de estrogênio e/ou receptor de progesterona positivos e HER2 positivo.
- 3) 21 casos HER2, que apresentam os receptores hormonais de estrogênio e progesterona negativos e HER2 positivo;

- 4) 39 casos triplo negativos, que apresentam os receptores hormonais de estrogênio e progesterona negativos e HER2 negativo.

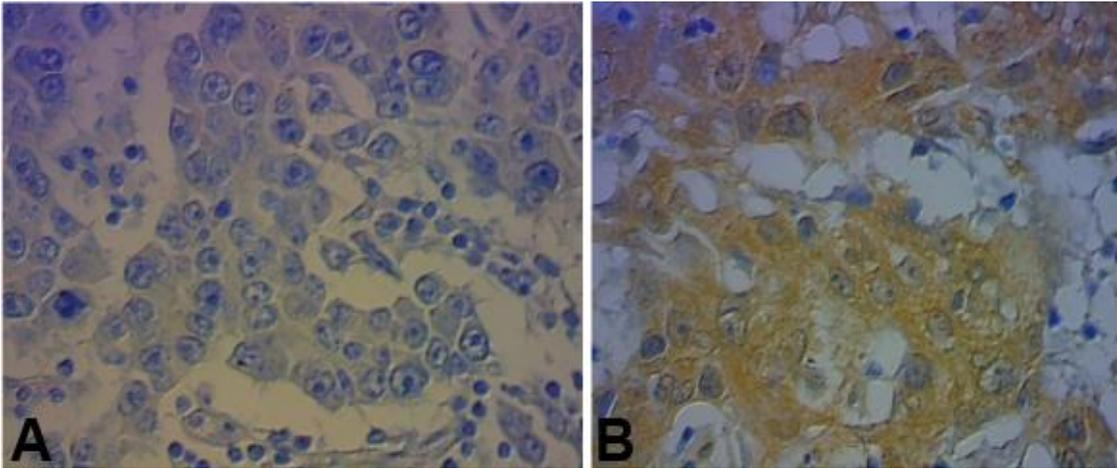
A partir dos casos selecionados, foram procurados os blocos de parafina nos Arquivos do Serviço de Anatomia Patológica do HNSG, e utilizando esses blocos como doadores, foram construídos 12 bancos de tecidos pela técnica de Microarranjos de Tecido Artesanal (TMA), no laboratório de Patologia Experimental da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR). Depois foi realizada a marcação imunoistoquímica com a utilização dos anticorpos anti-CD44, -CD44v6 e -CD24 com o intuito de identificar os casos que expressavam o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e assim, correlacioná-lo com os diferentes subtipos moleculares do câncer de mama. Foi considerado como fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> os casos que expressavam tanto o CD44 como o CD44v6, mas que não expressavam o CD24. Foi realizada também, a correlação desse fenótipo com as variáveis prognósticas: idade, grau histológico, tamanho do tumor e comprometimento do linfonodo, e a análise individual destes marcadores com relação à frequência e a todas as variáveis. Foram excluídos da análise individual de expressão de cada marcador, os casos em que após a marcação imunoistoquímica o corte descolou ou que não havia tumor residual na lâmina.

#### **4.1.VARIÁVEIS E CONCEITOS**

Neste estudo foram avaliadas as seguintes variáveis:

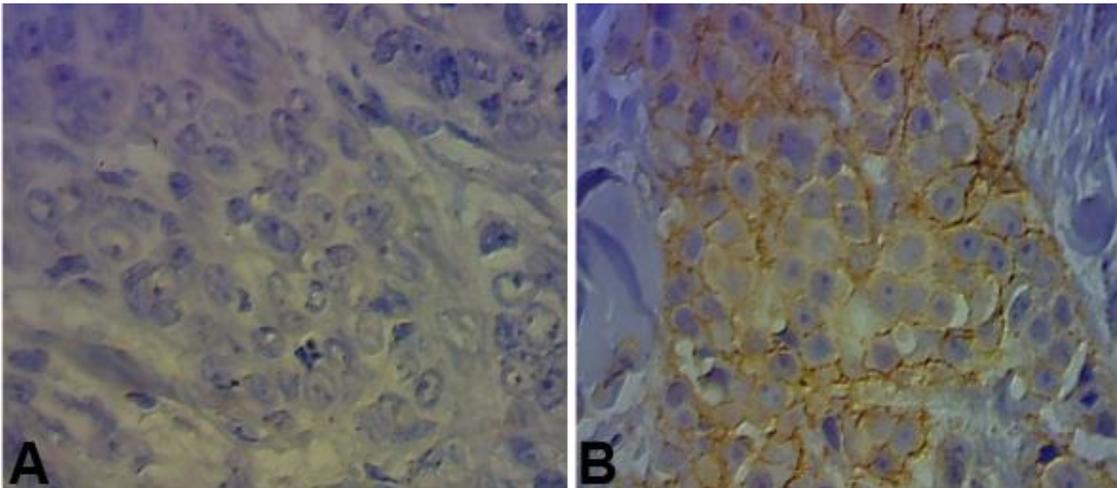
- 1) Análise Imunoistoquímica: Para todos os marcadores utilizados foram realizadas avaliações quantitativas em porcentagem da marcação imunohistológica. Foram considerados positivos os casos que apresentaram imunomarcação citoplasmática ou membrana  $\geq 1\%$ .

A) Expressão de CD44:



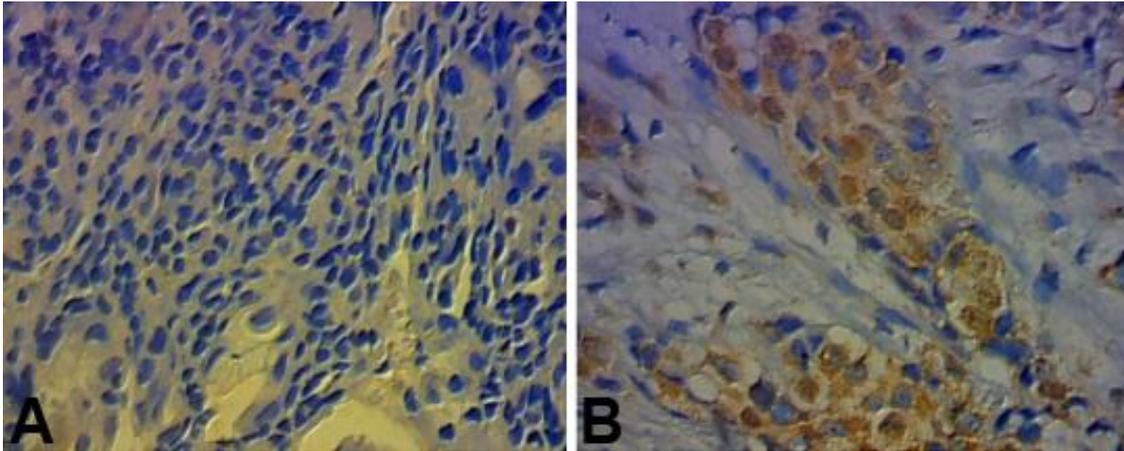
**Figura 2- Imunomarcção (A) negativa e (B) positiva para CD44 em amostra de carcinoma ductal invasor. Aumento 40x**

B) Expressão de CD44v6:



**Figura 3 – Imunomarcção (A) negativa e (B) positiva para CD44v6 em amostras de carcinoma ductal invasor. Aumento 40 x**

## C) Expressão de CD24



**Figura 4 – Imunomarcacão (A) negativa e (B) positiva para CD24 em amostras de carcinoma ductal invasor. Aumento 40x**

- 2) Idade: Foi avaliada de maneira quantitativa através da média e desvio padrão.
- 3) Tamanho do tumor: Quanto ao tamanho do tumor os tumores foram classificados segundo a classificação TNM- 6ª edição – 2004, <sup>106</sup> que é igual à classificação utilizada pela American Joint Committee on Cancer (AJCC) e divide os tumores de mama em:
  - T1: Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão;
  - T2: Tumor com mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão;
  - T3: Tumor com mais de 5 cm em sua maior dimensão;
  - T4: Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica e/ou à pele, ou carcinoma inflamatório.

Nota: A parede torácica inclui costelas, músculos intercostais, músculo serrátil anterior, mas não inclui o músculo peitoral.
- 4) Grau histológico (GI, GII, GIII): O grau histológico foi determinado segundo o Sistema de Graduação de Nottingham-Bloom-Richardson, <sup>50</sup> que já foi descrito na revisão bibliográfica (páginas 9 e 10).
- 5) Linfonodos: Positivo - Presença de células neoplásicas em pelo menos um linfonodo; Negativo - Ausência de células neoplásicas nos linfonodos avaliados.

- 6) Fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>: Foram considerados dentro desse fenótipo os casos que apresentaram imunomarcção positiva para o CD44 e/ou CD44v6 e imunomarcção negativa para o CD24.
- 7) Luminal A: Foram considerados os casos que apresentavam marcação imunoistoquímica para Receptor de Estrogênio (RE) e/ou Receptor de Progesterona (RP) positivo e expressão de HER2 negativa.
- 8) Luminal B: Foram considerados os casos que apresentavam marcação imunoistoquímica para Receptor de Estrogênio (RE) e/ou Receptor de Progesterona (RP) positivo e expressão de HER2 positiva.
- 9) HER2: Foram considerados os casos que apresentavam marcação imunoistoquímica para Receptor de Estrogênio (RE) negativa, Receptor de Progesterona (RP) negativa, e expressão de HER2 positiva.
- 10) Triplo Negativo: Foram considerados os casos que apresentavam marcação imunoistoquímica para Receptor de Estrogênio (RE) negativa, Receptor de Progesterona (RP) negativa, e expressão de HER2 negativa.
- 11) Receptor de Estrogênio (RE), Receptor de Progesterona (RP) e HER2: Foram utilizados os resultados dos exames imunoistoquímicos para RE, RP e HER2 realizados na época do diagnóstico original, no Serviço de Anatomia Patológica do HNSG, pelo método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase, analisados pelo mesmo patologista (LFBT).

A expressão imunoistoquímica para os marcadores moleculares RE e RP foi considerada positiva quando observada marcação nuclear de intensidade fraca, moderada ou forte em mais de 10% das células marcadas.

Para a avaliação da marcação do HER2 levou-se em consideração a porcentagem de células com marcação de membrana. A positividade do HER2 foi avaliada de acordo com o método recomendado pelo kit Herceptest (DAKO) que divide os resultados em quatro categorias (0, +, ++, +++). São considerados positivos os casos com resultado +++. Os casos

que apresentam ++ de positividade são encaminhados para FISH, para definir se são positivos ou não. Os casos que apresentam + ou 0 são considerados negativos.

## **4.2.DESCRICÃO DOS PROCEDIMENTOS TÉCNICOS**

### **4.2.1. Construção dos *Tissue* Microarrays (TMAs)**

#### **4.2.1.1. Seleção dos Tecidos para a Construção do TMA**

A partir dos blocos de tecidos doadores, foram realizados cortes histológicos de 4 mm para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE). As novas lâminas foram sequencialmente analisadas ao microscópio óptico por uma patologista (APMS), e uma ou duas áreas morfológicamente significativas do componente tumoral foram selecionadas na lâmina de vidro. Posteriormente, foram delimitados dois círculos (correspondentes às áreas significativas) em cada bloco doador sobrepondo as lâminas marcadas, para assim marcar a área de extração do material dos blocos doadores.

#### **4.2.1.2. Montagem do TMA**

A partir do número de áreas selecionadas em cada bloco doador, foram construídos mapas com as coordenadas de localização de cada caso nos blocos receptores seguindo criteriosamente a confecção dos TMAs. Os blocos receptores do TMA foram construídos manualmente no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR, composto por um molde de 15 cilindros e por uma “seringa extratora” (*punch-extractor*). De cada bloco doador foram extraídos um ou dois cilindros de 4 mm de diâmetro e depositados nos blocos receptores, previamente preparados. Depois de depositados todos os cilindros, os blocos receptores, agora TMAs, foram colocados na estufa a 37°C durante 1 hora com a face de corte virada para baixo e sobre uma lâmina de vidro. A cada intervalo de uma hora, os blocos foram pressionados para promover a homogeneização dos mesmos. Deste modo, os cilindros de tecido ficaram aderidos às paredes do bloco receptor e a superfície de corte ficou homogênea através do contato com a lâmina.

#### **4.2.1.3. Corte do Bloco de TMA**

Antes de realizar os cortes histológicos, os TMAs foram resfriados a  $-10^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos para após, realizar-se o corte sequencial de 4mm de espessura. Foi feita a coloração HE do primeiro corte de cada TMA para controle morfológico da presença de tumor. Foram utilizados uma placa fria (Leica EG1130, Germany) e um micrótomo (Reichert-Jung 2030, Bicut, Germany) para a realização dos cortes histológicos. Foram usados dois tipos de lâminas, conforme o destino dos cortes histológicos: para coloração com Hematoxilina-Eosina (HE) (Marienfeld, Germany) ou para imunistoquímica (Superfrost®Plus, Germany), apresentando estas um maior poder de adesão dos cortes histológicos.

#### **4.2.2. Método Imunistoquímico**

Todos os casos foram processados de acordo com o método da Estreptavidina-Biotina-Peroxidase. Foi realizada neste estudo a marcação imunistoquímica para CD44, CD24, e CD44v6. A marcação do CD44 foi realizada no Laboratório de Patologia do Hospital AC Camargo em São Paulo. A marcação do CD24 e CD44v6 foi realizada no Laboratório de Patologia Experimental da PUCPR segundo um protocolo estabelecido e padronizado pelo setor de imunistoquímica deste laboratório<sup>107</sup>. As lâminas foram analisadas pela pesquisadora (IR) e por uma Patologista (APMS) simultaneamente, em microscópio de multiobservação (Olimpus).

A marcação dos Receptores Hormonais (RH), e HER2 (Herceptest), já haviam sido realizadas no Serviço de Anatomia Patológica do HNSG na época do diagnóstico .

#### **4.2.3. Controles**

Em cada bloco receptor foi colocado um caso para servir de controle interno (um fragmento de tecido mamário normal). Estas amostras foram processadas da mesma forma, uma vez que pertencem ao TMA e apresentam expressão relevante do antígeno.

#### **4.2.4. Análise Estatística**

Para a comparação de grupos em relação à idade, foi considerado o teste t de Student para amostras independentes ou o modelo de análise de variância (ANOVA) com um fator. Para avaliação da associação entre variáveis qualitativas foi considerado o teste de Qui-quadrado ou o teste exato de Fisher. Para as comparações múltiplas entre mais de dois grupos, em relação a variáveis qualitativas, foi ajustado um modelo de Regressão Logística. Este modelo também foi considerado para a avaliação dos subtipos em relação aos resultados do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e dos marcadores CD44, CD44v6 e CD24, ajustando-se para idade, grau histológico e tamanho do tumor. Valores de  $p < 0,05$  indicaram significância estatística. Os dados foram analisados com o programa computacional Statistica v.8.0.

#### **4.2.5. Aspectos éticos**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), em 2009. Protocolo número: 5365 (cópia em Anexo).

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Características da amostra

A amostra deste estudo foi constituída por 133 casos, sendo: 42 casos Luminal A (RE<sup>+</sup> e/ou RP<sup>+</sup> e HER2<sup>-</sup>), 31 casos Luminal B (RE<sup>+</sup> e/ou RP<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup>), 21 casos HER2<sup>-</sup> (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup>) e 39 casos triplo negativos (RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, e HER2<sup>-</sup>) conforme demonstrado na Tabela 2.

**Tabela 2. Frequência dos subtipos moleculares na amostra**

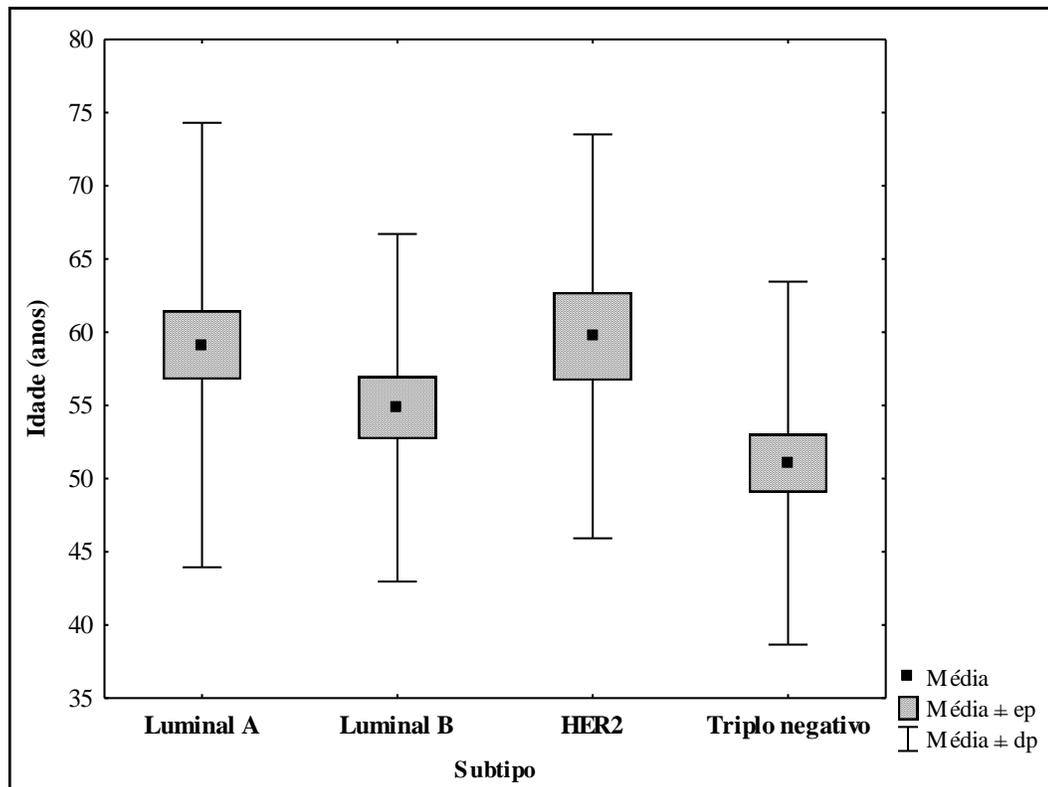
<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Número de casos (n=133)</b>	<b>%</b>
Luminal A	42	31,6
Luminal B	31	23,3
HER2	21	15,8
Triplo Negativo	39	29,3

A média e a mediana de idades foram de 55,8 anos (com intervalo de 27-88 anos, desvio padrão 13,8) e 54 anos, respectivamente. A maioria das pacientes apresentava tumores grau II (48,1%) e grau III (38,3%), T2 (51,9%) e T1 (42,1%), e com linfonodo negativo (56,4%), conforme descrito na Tabela 3.

Tabela 3. Distribuição da amostra em relação ao grau histológico, tamanho do tumor, e linfonodo.

	Número de Casos (n=133)	%
<b>Grau histológico</b>		
I	18	13,5
II	64	48,1
III	51	38,3
<b>Tamanho do tumor</b>		
T1	56	42,1
T2	69	51,9
T3	8	6,0
T4	0	0,0
<b>Linfonodo</b>		
Negativo	75	56,4
Positivo	58	43,6

Ao compararmos os subtipos moleculares desta amostra em relação à idade, foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,028$ ), sendo o subtipo triplo negativo o que apresentou a menor média de idade (Gráfico 1, e Tabela 4). Na comparação dos grupos dois a dois, observa-se que a média de idade do subtipo triplo negativo foi significativamente inferior à média de idade dos subtipos Luminal A ( $p= 0,008$ ) e HER2 ( $p=0,019$ ).



**Gráfico 1- Distribuição da idade em relação aos subtipos moleculares**

A comparação dos subtipos moleculares com o grau histológico demonstrou diferença estatisticamente entre os grupos ( $p < 0,001$ ), sendo que, nos grupos HER2 e triplo negativo houve uma maior frequência de tumores grau III (Tabela 4). Na comparação dois a dois entre os subtipos, encontramos que o subtipos HER2 e o triplo negativo apresentaram uma maior frequência de tumores grau III, em relação aos subtipos luminal A ( $p = 0,003$ , e  $p < 0,001$ , respectivamente), e luminal B ( $p = 0,007$ , e  $p < 0,001$ , respectivamente). Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ao compararmos os subtipos moleculares com o tamanho do tumor e o comprometimento do linfonodo (Tabela 4).

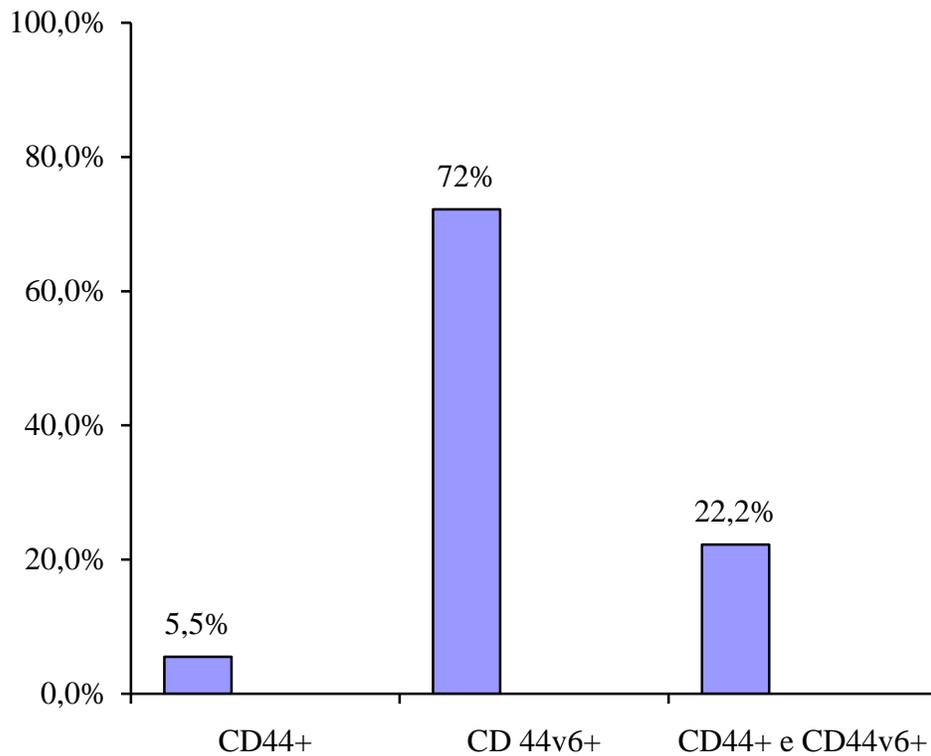
**Tabela 4. Comparação entre os subtipos moleculares em relação à idade, grau histológico, tamanho do tumor, e linfonodo.**

	<b>Luminal A</b> (n=42)	<b>Luminal B</b> (n=31)	<b>HER2</b> (n=21)	<b>Triplo Negativo</b> (n=39)	<b>p*</b>
<b>Idade</b>	59,1 ± 15,2	54,8 ± 11,9	59,7 ± 13,8	51,1 ± 12,4	0,028
<b>Grau</b>					
I	9 (21,4)	7 (22,6)	1 (4,8)	1 (2,6)	<0,001
II	25 (59,5)	18 (58,1)	8 (38,1)	13 (33,3)	
III	8 (19,0)	6 (19,4)	12 (57,1)	25 (64,1)	
<b>Tamanho</b>					
T1	19 (45,2)	14 (45,2)	10 (47,6)	13 (33,3)	0,618
T2	22 (52,4)	16 (51,6)	9 (42,9)	22 (56,4)	
T3	1 (2,4)	1 (3,2)	2 (9,5)	4 (10,3)	
<b>Linfonodo</b>					
Negativo	24 (57,1)	21 (67,7)	12 (57,1)	18 (46,2)	0,348
Positivo	18 (42,9)	10 (32,3)	9 (42,9)	21 (53,8)	

\*Teste de Qui-quadrado (variáveis categóricas) ou o modelo de análise de variância (ANOVA) para a idade; p<0,05.

## 5.2. Análise da expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>

Para análise do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> foram excluídos quatro casos do grupo do CD24: dois por não terem tumor residual na lâmina e dois porque o corte descolou da lâmina. Foram considerados positivos para esse fenótipo todos os casos que apresentaram expressão de CD44 e/ou CD44v6 positiva e expressão negativa de CD24. Dezoito casos preencheram esse critério, o que correspondeu a 14% da amostra (n=129), sendo que destes casos, treze apresentavam expressão positiva de CD44v6, um apresentou expressão positiva de CD44, e quatro apresentaram expressão positiva de ambos marcadores, como demonstrado no Gráfico 2.



**Gráfico 2- Expressão do CD44 e CD44v6 na formação do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>**

Em relação a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> nos diferentes subtipos moleculares, encontramos uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,02$ ), sendo que o subtipo HER2 foi o que apresentou a maior frequência do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (Tabela 5). Na comparação dos subtipos dois a dois, observamos que o subtipo HER2 apresentou frequência maior do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> em relação aos subtipos luminal A ( $p=0,008$ ) e triplo negativo ( $p= 0,044$ ), com significância estatística. Na comparação entre os outros subtipos não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 6).

**Tabela 5. Comparação entre os subtipos moleculares do câncer de mama e o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.**

<b>Fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (n=129)</b>			
<b>Subtipo Molecular</b>	<b>Negativo (n=111)</b>	<b>Positivo (n=18)</b>	<b>Valor de p*</b>
Luminal A	39 (95,1)	2 (4,9)	
Luminal B	25 (83,3)	5 (16,7)	
HER2	14 (66,7)	7 (33,3)	0,02
Triplo Negativo	33 (89,2)	4 (10,8)	

\*Teste de Qui-quadrado; p&lt;0,05

**Tabela 6. Comparação dos subtipos moleculares dois a dois em relação à expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.**

<b>Comparação entre os subtipos moleculares</b>	<b>Valor de p*</b>
Luminal A x Luminal B	0,120
Luminal A x HER2	0,008
Luminal A x Triplo Negativo	0,338
Luminal B x HER2	0,174
Luminal B x Triplo Negativo	0,488
HER2 x Triplo Negativo	0,044

\*p&lt;0,05

Após realizar a análise multivariada para comparar os subtipos em relação à expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, ajustando para idade, grau histológico e tamanho do tumor, continuou se observando maior frequência do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> no subtipo HER2 do que nos subtipos luminal A (p=0,016; OR=8,59; IC95%:1,48-49,44), com significância estatística e triplo negativo (p=0,050; OR=4,22; IC95%:0,98-18,05) com tendência a significância, como pode ser visto na Tabela 7. Na comparação entre os outros subtipos não houve diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 7. Análise multivariada dos subtipos moleculares em relação ao fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, ajustada para idade, grau histológico (\*\*), e tamanho do tumor (\*\*).**

<b>Fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (n=129)</b>				
<b>Comparação dos Subtipos</b>	<b>Valor de p*</b>	<b>OR</b>	<b>IC95%</b>	
Luminal A x Luminal B	0,115	4,00	0,70	22,86
Luminal A x HER2	0,016	8,59	1,48	49,94
Luminal A x Triplo negativo	0,450	2,04	0,32	13,12
Luminal B x HER2	0,292	0,47	0,11	1,96
Luminal B x Triplo negativo	0,382	1,96	0,43	9,08
HER2 x Triplo negativo	0,050	4,22	0,98	18,05

\* p<0,05

\*\*Para poder aplicar o modelo de regressão logística para análise multivariada, foi agrupado o grau histológico em Grau I e Grau II versus Grau III, e o tamanho do tumor em T1 versus T2 e T3

Ao analisarmos a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> em relação ao tamanho do tumor, encontramos que os tumores T3 tenderam a apresentar maior frequência do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> em relação aos tumores T1 e T2, com um nível de significância limítrofe (p=0,076). Ao comparar as variáveis: idade, grau histológico, e comprometimento do linfonodo em relação à expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos. A tabela que mostra a comparação entre a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e as variáveis prognósticas: idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo encontra-se no Apêndice A.

### **5.3. Análise da expressão do marcador CD44**

Para a análise do marcador imunoistoquímico CD44, foi excluído um caso em que o corte descolou da lâmina. Em um total de 132 casos, encontramos 50% de positividade para a expressão deste marcador (66 casos). Ao comparar os subtipos moleculares com a expressão do

CD44, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, conforme descrito na Tabela 8.

**Tabela 8. Comparação entre os subtipos moleculares do câncer de mama e a expressão de CD44.**

<b>CD44 (n=132)</b>			
<b>Subtipos Moleculares</b>	<b>Negativo (n=66)</b>	<b>Positivo (n=66)</b>	<b>Valor de p*</b>
Luminal A	19 (46,3)	22 (53,7)	0,612
Luminal B	14 (45,2)	17 (54,8)	
HER2	10 (47,6)	11 (52,4)	
Triplo Negativo	23 (59)	16 (41)	

\*Teste de Qui-quadrado;  $p < 0,05$ .

Após realizar a análise multivariada para comparar os subtipos em relação à expressão do CD44, ajustando para idade, grau histológico e tamanho do tumor nenhuma correlação entre os subtipos moleculares e a expressão do CD44 foi observada (Tabela 9).

**Tabela 9. Análise multivariada dos subtipos moleculares em relação à expressão do CD44, ajustada para idade, grau histológico (\*\*), e tamanho do tumor (\*\*).**

<b>CD44 (n=132)</b>				
<b>Comparação dos Subtipos</b>	<b>Valor de p*</b>	<b>OR</b>	<b>IC 95%</b>	
Luminal A x Luminal B	0,954	0,97	0,37	2,53
Luminal A x HER2	0,996	1,00	0,33	3,06
Luminal A x Triplo negativo	0,386	1,53	0,58	4,08
Luminal B x HER2	0,959	1,03	0,32	3,37
Luminal B x Triplo negativo	0,381	1,58	0,56	4,42
HER2 x Triplo negativo	0,449	0,65	0,21	1,99

\*p<0,05.

\*\*Para poder aplicar o modelo de regressão logística para análise multivariada, foi agrupado o grau histológico em Grau I e Grau II versus Grau III, e o tamanho do tumor em T1 versus T2 e T3.

A comparação do tamanho do tumor com a expressão do marcador CD44 revelou uma associação estatisticamente significativa entre os tumores T3 e a negatividade deste marcador (p=0,012), ressalta-se que em nossa amostra todos os tumores T3 foram negativos para a expressão do CD44). Não houve associação estatisticamente significativa entre as variáveis: idade, grau histológico e comprometimento do linfonodo, e a expressão do marcador CD44. A tabela que mostra a comparação entre a expressão do CD44 e as variáveis prognósticas: idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo encontra-se no Apêndice B.

#### **5.4. Análise da expressão do marcador CD44v6**

Para a análise do marcador imunoistoquímico CD44v6 foram excluídos quatro casos: dois por não apresentarem tumor residual na lâmina e dois porque o corte descolou. Desta forma, dos 129 casos válidos e analisados para este marcador, 88 (68,2%) casos foram positivos, sendo 41

casos (31,8%) negativos. Ao compararmos os subtipos moleculares em relação à expressão do CD44v6, houve tendência a haver diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p=0,078$ ), sendo que os subtipos Luminal B e HER2 foram os que apresentaram maior expressão deste marcador (Tabela 10). Ao comparar os grupos dois a dois observou-se que o subtipo Luminal B apresentou maior frequência de expressão do CD44v6 em relação ao subtipo Luminal A, com significância estatística ( $p=0,033$ ) e que o subtipo HER2 também mostrou a tendência de apresentar maior frequência de expressão deste marcador em relação ao subtipo Luminal A ( $p=0,052$ ). Na comparação entre os outros subtipos não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 11).

**Tabela 10. Comparação entre os subtipos moleculares do câncer de mama e a expressão de CD44v6.**

<b>CD44v6 (n=129)</b>			
	<b>Negativo (n=41)</b>	<b>Positivo (n=88)</b>	<b>Valor de p*</b>
Luminal A	18 (45)	22 (55)	
Luminal B	6 (20)	24 (80)	0,078
HER2	4 (19)	17 (81)	
Triplo Negativo	13 (34,2)	25 (65,8)	

\*Teste de Qui-quadrado ;  $p<0,05$

**Tabela 11- Comparação dos subtipos moleculares dois a dois em relação à expressão do CD44v6**

<b>Comparação entre os subtipos moleculares</b>	<b>Valor de p*</b>
Luminal A x Luminal B	0,033
Luminal A x HER2	0,052
Luminal A x Triplo Negativo	0,332
Luminal B x HER2	0,933
Luminal B x Triplo negativo	0,199
HER2 x Triplo Negativo	0,224

\* $p<0,05$

Após realizar a análise multivariada para comparar os subtipos em relação à expressão do CD44v6, ajustando para idade, grau histológico e tamanho do tumor, novamente observou-se maior frequência de positividade do marcador CD44v6 no subtipo Luminal B em relação ao Luminal A ( $p=0,032$ ;  $OR=3,35$ ;  $IC95\%: 1,10-10,19$ ), com significância estatística. Entretanto, não se encontrou tendência de associação entre o subtipo HER2 e o Luminal A ( $p=0,118$ ;  $OR=2,82$ ;  $IC95\%: 0,76-10,50$ ), como demonstra a Tabela 12. Na comparação entre os outros subtipos não houve diferença estatisticamente significativa.

**Tabela 12. Análise multivariada dos subtipos moleculares em relação à expressão do CD44v6, ajustada para idade, grau histológico (\*\*), e tamanho do tumor (\*\*).**

<b>CD44v6 (n=129)</b>				
<b>Comparação dos Subtipos</b>	<b>Valor de p*</b>	<b>OR</b>	<b>IC95%</b>	
Luminal A x Luminal B	0,032	3,35	1,10	10,19
Luminal A x HER2	0,118	2,82	0,76	10,50
Luminal A x Triplo negativo	0,665	1,25	0,45	3,49
Luminal B x HER2	0,818	1,19	0,27	5,17
Luminal B x Triplo negativo	0,106	2,68	0,80	8,94
HER2 x Triplo negativo	0,226	2,26	0,60	8,52

\* $p<0,05$

\*\*Para poder aplicar o modelo de regressão logística para análise multivariada, foi agrupado o grau histológico em Grau I e Grau II versus Grau III, e o tamanho do tumor em T1 versus T2 e T3.

Ao compararmos as variáveis prognósticas: idade, grau histológico, tamanho do tumor e comprometimento do linfonodo, com a expressão do marcador CD44v6, não houve associação estatisticamente significativa entre os grupos. A tabela que demonstra esta comparação encontra-se no Apêndice C.

### 5.5. Análise da expressão do marcador CD24

Para a análise do marcador CD24 foram excluídos quatro casos: dois porque não apresentavam tumor residual na lâmina e dois porque o corte descolou. Dos 129 casos válidos analisados, 103 (79,8%) casos foram CD24 positivos e 26 (20,2%) casos negativos. Na análise da comparação entre os subtipos moleculares com a expressão do CD24, observamos diferença estatisticamente significativa entre os subtipos ( $p=0,044$ ), sendo que o subtipo HER2 foi o que apresentou menor positividade para este marcador conforme demonstrado na Tabela 13. Após fazer a comparação dos subtipos dois a dois observamos que o subtipo HER2 apresentou menor positividade do CD24, em relação aos outros subtipos [Luminal A ( $p=0,018$ ), Luminal B ( $p=0,044$ ), e Triplo Negativo ( $p=0,031$ )], com significância estatística em todas as comparações. Na comparação entre os outros subtipos não houve diferença estatisticamente significativa (Tabela 14).

**Tabela 13. Comparação entre os subtipos moleculares do câncer de mama e a expressão de CD24.**

<b>CD24 (n=129)</b>			
	<b>Negativo (n=26)</b>	<b>Positivo (n=103)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Luminal A</b>	6 (14,6)	35 (85,4)	
<b>Luminal B</b>	5 (16,7)	25 (83,3)	0,044
<b>HER2</b>	9 (42,9)	12 (57,1)	
<b>Triplo Negativo</b>	6 (16,2)	31 (83,8)	

\*Teste de Qui-quadrado;  $p<0,05$ .

**Tabela 14. Comparação dos subtipos moleculares dois a dois em relação à expressão do CD24**

Comparação entre os subtipos moleculares	Valor de p*
Luminal A x Luminal B	0,815
Luminal A x HER2	0,018
Luminal A x Triplo Negativo	0,847
Luminal B x HER2	0,044
Luminal B x Triplo Negativo	0,960
HER2 x Triplo Negativo	0,031

\*p<0,05

A análise multivariada para comparar os subtipos em relação à expressão do CD24, ajustando para idade, grau histológico e tamanho do tumor revelou menor positividade do marcador CD24 no subtipo HER2 em relação aos subtipos: Luminal A (p= 0,031; OR=0,24; IC95%:0,07-0,89) e Triplo Negativo ( p=0,026; OR=0,23; IC95%:0,06-0,85) com significância estatística e tendência a significância entre os subtipos HER2 e o Luminal B (p=0,060; OR=0,27; IC95%:0,07-1,07), conforme demonstrado na Tabela 15. Entre os outros subtipos não houve significância estatística.

**Tabela 15. Análise multivariada dos subtipos moleculares em relação à expressão do CD24, ajustada para idade, grau histológico (\*\*), e tamanho do tumor (\*\*).**

<b>CD24 (n=129)</b>				
<b>Subtipos comparados</b>	<b>Valor de p*</b>	<b>OR</b>	<b>IC95%</b>	
Luminal A x Luminal B	0,865	0,89	0,24	3,32
Luminal A x HER2	0,031	0,24	0,07	0,89
Luminal A x Triplo negativo	0,948	0,96	0,25	3,66
Luminal B x HER2	0,060	0,27	0,07	1,07
Luminal B x Triplo negativo	0,823	1,17	0,29	4,70
HER2 x Triplo negativo	0,026	0,23	0,06	0,85

\*p<0,05

\*\*Para poder aplicar o modelo de regressão logística para análise multivariada, foi agrupado o grau histológico em Grau I e Grau II versus Grau III, e o tamanho do tumor em T1 versus T2 e T3.

Não houve nenhuma associação estatisticamente significativa entre os grupos após a comparação das variáveis prognósticas: idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo com a expressão do marcador CD24. A tabela que demonstra a comparação entre a expressão do marcador CD24 e as variáveis prognósticas encontra-se no Apêndice D.

## 6. DISCUSSÃO

O grande desafio do câncer de mama consiste na heterogeneidade que esta doença apresenta. Essa heterogeneidade ocorre tanto entre um tumor e outro, o que é chamado de heterogeneidade intertumoral, como em grupos de células dentro do mesmo tumor, que seria a heterogeneidade intratumoral e é uma das principais dificuldades encontradas em termos de tratamento.<sup>30</sup> Ao se entender que cada tumor apresenta uma biologia tumoral diferente, e, portanto, se comporta de maneira diferente, assume-se que o tratamento também não pode ser o mesmo para todos os tipos de tumores. A identificação dos subtipos moleculares intrínsecos do câncer de mama é muito importante para a avaliação individual de cada tumor, e pode contribuir muito para a instituição de um tratamento adequado. A possibilidade de avaliação desses parâmetros com técnicas mais acessíveis e práticas, com custo acessível, que possam ser incorporadas no dia a dia do tratamento dessas pacientes, continua sendo o maior desafio na união entre o campo da pesquisa molecular gênica e a prática clínica. No presente estudo utilizamos os critérios de imunistoquímica para distinguir os quatro subtipos moleculares do câncer de mama, conforme já foi descrito em outros estudos<sup>14-16</sup> e correlacionar com o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.

Com o avanço dos estudos na biologia molecular, a hipótese das células-tronco cancerosas começou a ganhar espaço. Esta hipótese pode explicar porque encontramos resistência ao tratamento em alguns casos. Acredita-se que esta pequena população de células-tronco dentro do tumor apresenta propriedades intrínsecas que as torna resistentes a quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia.<sup>108</sup> A falta de marcadores específicos de superfície celular dificultou no início o estudo desta teoria. A partir do estudo de Al-Hajj e colaboradores<sup>23</sup> (2003), passou-se a utilizar o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> como marcador de célula-tronco. Neste estudo realizamos a marcação imunistoquímica com os anticorpos anti-CD44, -CD44v6, e -CD24 para identificar o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Nosso trabalho se diferenciou por incluir a marcação imunistoquímica do CD44v6 para a avaliação do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Escolhemos este marcador por ser uma das isoformas variantes mais estudadas e mais comuns do CD44, e estar relacionada em alguns trabalhos a migração e proliferação celular, podendo levar à progressão e metástase do câncer.<sup>103,97</sup> Além disso, acredita-se que o anticorpo CD44 possa reconhecer tanto a isoforma *standard* da proteína como as suas variantes, mas por outro lado, o anticorpo CD44v6 reconhece apenas a

sua isoforma variante. Assim, ao utilizá-lo poderíamos estar identificando uma fração específica de proteínas CD44, que podem se comportar de maneira diferente e se correlacionar de maneira individual com as outras variáveis deste estudo como os subtipos moleculares, idade, grau histológico, tamanho do tumor ou linfonodo. Por outro lado quando outros estudos<sup>29, 30</sup> utilizaram o anticorpo CD44, este provavelmente reconheceu tanto as isoformas standard como as isoformas variantes desta proteína.

### **6.1. Análise da amostra**

Foi objetivo de este estudo comparar os subtipos moleculares em relação à expressão dos marcadores imunoistoquímicos, por isso foram selecionados propositalmente casos que representassem de maneira significativa os quatro subgrupos. A seleção da amostra não foi realizada de maneira consecutiva, portanto não representa todos os casos atendidos na Unidade da Mama do HNSG neste período, e também não reflete a proporção real que existe entre os subtipos moleculares dentro de uma população.

Foi utilizada a técnica de microarranjos de tecidos (TMA) por ser esta técnica de menor custo e maior praticidade para fazer a marcação imunoistoquímica em um grande número de casos, pois permite a leitura de vários casos em uma só lâmina. A marcação imunoistoquímica em TMA já foi validada em outros estudos e está sendo cada vez mais utilizada em pesquisa, uma vez que apresenta resultados comparáveis à técnica convencional.<sup>107, 109, 110</sup>

No intuito de obter uma maior homogeneidade da amostra foram selecionados apenas os casos de carcinoma ductal. Da mesma maneira, contribuem para a homogeneidade desta amostra o fato dos casos selecionados terem sido operados pela mesma equipe de cirurgiões e analisados no mesmo laboratório, sendo submetidos, portanto, às mesmas condições de fixação e processamento. Além disso, a marcação imunoistoquímica para a dosagem de receptores hormonais e HER2, que utilizamos neste estudo, foi a realizada na época do diagnóstico original, sendo executada pelo mesmo patologista (LFBT) e sendo o Serviço de Anatomia Patológica do HNSG regularmente certificado para a realização deste procedimento. A escolha da área mais representativa do tumor pelo patologista (APMS) para ser amostrada no TMA, também aumentou a qualidade de amostragem nos TMA.

Durante a realização das reações imunoistoquímicas pode ocorrer descolamento do tecido das lâminas. Este descolamento do corte da lâmina pode ocorrer em 5 a 20% nos TMA.<sup>110, 107</sup> Em nosso estudo ocorreu em 3,76% da amostra (5/133).

Em relação às características dos subtipos moleculares na amostra, foi encontrado que o subtipo triplo negativo apresentou uma média inferior de idade em relação ao subtipo HER2 e Luminal A e maior frequência de tumores grau III, em relação ao subtipo Luminal A e Luminal B. Isto já era esperado e esta de acordo com a literatura, pois os tumores triplo negativos tendem a ocorrer normalmente em pacientes mais jovens, especialmente abaixo dos 40 anos e, em muitos casos, estão associados à mutação do gene *BRCA1*. Estes tumores também se caracterizam por serem normalmente tumores de alto grau, a com altas taxas de proliferação.<sup>76, 78</sup>

Neste estudo também se encontrou que os tumores do subtipo HER2 apresentavam maior frequência de tumores grau III, em relação ao Luminal A e Luminal B. Os tumores do subtipo HER2 são tumores de pior prognóstico e de comportamento biológico agressivo, por isso são normalmente tumores pouco diferenciados e de alto grau.<sup>14, 61</sup>

## **6.2. Análise do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>**

Neste estudo foi encontrado que o subtipo HER2 foi o grupo que expressou com maior frequência o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Essa diferença foi estatisticamente significativa em comparação ao Luminal A e se manteve mesmo após ajustar para a idade, grau histológico e tamanho do tumor. Esta correlação entre o subtipo HER2 e o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> não havia sido descrita até o momento. Ao considerar o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> como um marcador de célula tronco, deveríamos supor que ele seria mais frequentemente associado aos subtipos intrínsecos do câncer de mama de origem celular mais primitiva como o subtipo basal e o *claudina-low*. De fato vários estudos têm demonstrado essa associação. Honeth et al<sup>29</sup> (2008) estudaram 240 tumores de uma coorte de 445 pacientes tratadas cirurgicamente por câncer de mama estadio II. Os autores encontraram que a ocorrência desse fenótipo foi elevada nos tumores basais, especialmente nos tumores hereditários BRCA1. Creighton et al<sup>31</sup> (2009) identificaram uma assinatura gênica comum às células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e às células cancerosas formadoras de mamíferas *in vitro* (CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-MS</sup>), ambos relacionados às células tronco e identificaram uma associação clara dessa assinatura gênica comum a essas células com o subtipo molecular

*claudina-low*. Os autores também encontraram que o subtipo molecular *claudina-low* apresentava alta expressão de mRNA de CD44 e baixa expressão de mRNA de CD24.

Além disso, foi relatado maior frequência de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> associadas ao subtipo basal por Park et al.<sup>30</sup> (2010). Ricardo e colaboradores<sup>111</sup> (2011), analisaram 466 casos de carcinomas mamários invasores e 8 linhagens celulares de câncer de mama e observaram correlação estatisticamente significativa entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os subtipos moleculares do câncer de mama, estando este fenótipo particularmente enriquecido nos tumores basais. Recentemente, Giatromanolaki et al.<sup>112</sup> (2011), descreveram uma associação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os tumores triplo negativos.

Por outro lado, embora alguns estudos correlacionem o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> aos subtipos moleculares de origem mais primitiva, ainda existem muitas dúvidas sobre esta associação. Em um estudo recente, 60 casos de carcinoma ductal invasor, 30 fibroadenomas, 30 tecidos mamários normais e 3 linhagens celulares de câncer de mama foram avaliados e não encontrou-se correlação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os subtipos moleculares do câncer de mama, sugerindo que as células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> sejam células progenitoras em trânsito e não apresentam qualquer relação com subtipos moleculares ou com os parâmetros clínico-patológicos no carcinoma ductal invasor.<sup>113</sup>

Para tentar esclarecer a relação que existe entre a ativação do HER2 e o estímulo das células tronco cancerosas mamárias, Wang et al.<sup>114</sup> (2010) compararam as diferenças fenotípicas de duas linhagens de células derivadas de uma célula-tronco epitelial mamária comum em um contexto celular homogêneo, dentro das mesmas condições de cultivo celular, cuja única diferença entre elas era baseada na expressão do HER2. Após análise por citometria de fluxo, foi demonstrada maior frequência de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> na linhagem de células que expressavam o HER2 quando comparado com a linhagem de células que não expressavam esta proteína. Este estudo, portanto, provê evidência clara que o HER2 tem a habilidade de aumentar a frequência de células-tronco CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, podendo ser responsável pela potente função tumorigênica do HER2 na carcinogênese da mama. Ao aumentar a frequência de células-tronco cancerosas CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, o HER2 pode também manter o crescimento tumoral e promover a metástase à distância.

A relação do subtipo intrínseco HER2 com as células-tronco cancerosas mamárias, também já foi amplamente descrita em associação a outro marcador de célula-tronco mamária, o

ALDH1. Ginestier et al<sup>28</sup> (2007) descreveram o ALDH1 como um marcador de células tronco no tecido mamário normal e no câncer de mama após a análise da expressão deste marcador em modelos *in vitro* e *in vivo*. Neste estudo foram analisados também 577 carcinomas mamários humanos e os autores encontraram uma associação entre a expressão positiva de ALDH1 e a superexpressão de *ERBB2*. Além disso, a expressão do ALDH1 foi relacionada à falta de expressão de receptores hormonais (RE e RP), expressão positiva de citoqueratinas basais (CK5/6 e CK14) e a presença de um alto grau histológico. Entretanto, quando os autores procuraram analisar a sobreposição entre a população celular aldefluor-positiva e a população CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, em um modelo de xenotransplante, observaram que a sobreposição foi extremamente baixa, estando em torno de 1%, mas, por outro lado, constataram que as poucas células que expressavam os dois fenótipos, demonstraram uma capacidade tumorigênica muito maior, sendo capazes de gerar tumores com apenas 20 células.

Morimoto et al<sup>115</sup> (2009) confirmaram os achados iniciais de Ginestier et al<sup>28</sup> após análise de 203 casos de câncer de mama. Os autores relataram que os tumores ALDH1<sup>+</sup> eram mais frequentemente RE<sup>-</sup>, RP<sup>-</sup>, HER2<sup>+</sup> e Ki67<sup>+</sup>. Ao analisar a frequência de tumores ALDH1<sup>+</sup> em relação aos subtipos intrínsecos do câncer de mama, os autores encontraram que os tumores que apresentavam RH<sup>+</sup> e HER2<sup>-</sup> (luminais A) apresentaram menor frequência de ALDH1<sup>+</sup> (3%). Por outro lado, os tumores RH<sup>-</sup> e HER2<sup>+</sup> (HER2) foram os que obtiveram maior expressão de ALDH1 chegando a 35%. Os tumores RH<sup>+</sup> e HER2<sup>+</sup> (luminais B) e RH<sup>-</sup> e HER2<sup>-</sup> (triplo negativos) apresentaram frequências intermediárias de 23% e 14%, respectivamente. Além disso, constatou-se que os tumores HER2<sup>+</sup> eram mais prováveis de serem ALDH1<sup>+</sup>, independente do status do receptor hormonal. O mesmo estudo de Park et al,<sup>30</sup> descrito anteriormente, também encontrou maior expressão de ALDH1 nos subtipos basal e HER2.

Zhou et al<sup>116</sup> (2010), publicaram uma meta análise que visou determinar a associação entre os marcadores de células-tronco e fatores clínicos e patológicos do câncer de mama, assim como a associação com o prognóstico da doença. Foram selecionados 12 estudos com 898 casos e 1853 controles. Seis estudos utilizaram o ALDH1 como marcador de célula-tronco. Quatro estudos consideraram as células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> como marcadoras de células-tronco, enquanto dois estudos utilizaram os perfis de expressão gênica alternativamente às células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> para a avaliação. Os autores encontraram que os tumores de mama com a presença de células-tronco cancerosas, especialmente aqueles com células ALDH1<sup>+</sup>, estavam associados com fenótipos

biologicamente mais agressivos, como alto grau histológico (OR= 1,83, 95% IC: 1,23-2,75,  $p=0,001$ ), RE negativo (OR= 0,45, 95% IC: 0,30-0,67,  $p<0,001$ ) e RP negativo (OR= 0,53, 95% IC:0,36-0,79,  $p=0,002$ ). Apesar do status do HER2 (OR= 1,58,95% IC: 0,81-3,08,  $p=0,182$ ) não estar associado com os marcadores de células tronco, ao analisar o subgrupo ALDH1 houve diferença significativa em relação à positividade deste marcador (OR= 2,33, 95% IC: 1,62-3,35,  $p<0,001$ ). A presença de células ALDH1<sup>+</sup> (RR=2,83, 95% IC: 2,16-3,67,  $p< 0,001$ ) e células tumorais CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (RR= 2,32, 95% IC: 1,51-3,60,  $p<0,001$ ) estavam significativamente associadas a uma pior sobrevida global.

Se a teoria de células-tronco estiver correta, estas células seriam resistentes à quimioterapia, e teríamos, portanto, um aumento dos marcadores de células tronco como, por exemplo, das células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> após o término do tratamento quimioterápico. Este aumento ocorreria porque a quimioterapia estaria eliminando os outros compartimentos de células proliferativas tumorais, havendo um aumento proporcional das células resistentes. Atualmente vem sendo desenvolvidas algumas drogas que atuam em determinadas vias de sinalização e que teriam a capacidade de atingir as células-tronco, que a quimioterapia convencional não atinge. Um exemplo disto é o Lapatinib, que atua como inibidor específico da via de sinalização EGFR/HER2.

Li et al <sup>117</sup> (2008) analisaram amostras de carcinomas mamários localmente avançados submetidos a quimioterapia neoadjuvante. Pacientes que apresentavam HER2<sup>-</sup> foram randomizadas para serem submetidas a 12 semanas de Docetaxel (T) ou Doxorubicina e Ciclofosfamida (AC), e as pacientes HER2<sup>+</sup> foram tratadas com Lapatinib durante 6 semanas seguido de T e trastuzumab durante 12 semanas. Nas pacientes HER2<sup>-</sup> a porcentagem de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> medidas por citometria de fluxo aumentou após a quimioterapia, de uma média de 4,7% para 13,6% após 12 semanas ( $p< 0,001$ ), corroborando a teoria das células-tronco tumorais, que seriam resistentes à quimioterapia. O potencial tumorigênico dessas células remanescentes após o tratamento foi comprovado pela maior habilidade dessas células de formar mamosferas e pela maior capacidade de crescimento tumoral após a realização de transplante em ratos imunossuprimidos. Já no grupo HER2<sup>+</sup> que foi tratado com Lapatinib não houve esse aumento de células tumorigênicas, sendo observado pelo contrário, uma diminuição destas células, mas a diferença não foi estatisticamente significativa, o que é compatível com a hipótese de que os agentes terapêuticos que alcançam a via de sinalização do EGFR/HER2, seriam capazes de

combater essas células tumorigênicas que são resistentes à quimioterapia. Outro fato curioso foi que o número basal de células  $CD44^+/CD24^-$  foi maior no grupo de tumores  $HER2^+$  do que no  $HER2^-$ , entretanto, não houve diferença entre os tumores  $RE^+$  e  $RE^-$ .

Creighton et al <sup>31</sup> (2009) também corroboraram a hipótese das células-tronco cancerosas ao avaliar a expressão da assinatura gênica comum  $CD44^+/CD24^{-MS}$  após o tratamento neoadjuvante com hormonioterapia (letrozol) ou quimioterapia (docetaxel) e observar um aumento da assinatura gênica após o tratamento com ambas medicações. Esses resultados estariam de acordo então com a teoria de que as células tumorais que resistem ao tratamento quimioterápico ou endócrino têm características de células-tronco, por apresentarem um potencial de inicialização de tumores e de auto-renovação, além de uma maior expressão de fatores mesenquimais.

Lee et al <sup>118</sup> (2011) estudaram amostras pareadas (antes e após o tratamento com quimioterapia neoadjuvante) em 92 pacientes com estadió clínico II ou III, submetidas a quimioterapia neoadjuvante com o esquema de doxorubicina e docetaxel (AD) (n=50), ou doxorubicina e ciclofosfamida (AC) (n=42), seguido de cirurgia, e também observaram um aumento da proporção de células tumorais  $CD44^+/CD24^-$  e  $ALDH1^+$  após o tratamento quimioterápico. Além disso, os casos que apresentaram este aumento do fenótipo marcador de células tronco, também estiveram associados a um menor intervalo livre de doença.

Por outro lado, no estudo de Aulmann et al<sup>119</sup> (2010) os resultados foram bastante diferentes e contrariam a hipótese do fenótipo  $CD44^+/CD24^-$  estar associado às células-tronco. Neste estudo foram analisadas duas séries de pacientes tratados com esquemas quimioterápicos diferentes e foi observada uma redução do número de células  $CD44^+/CD24^-$  após o tratamento quimioterápico em ambos grupos. Considerando que o fenótipo  $CD44^+/CD24^-$  esteja associado às células-tronco cancerosas mamárias, a frequência destas células deveria aumentar após o tratamento quimioterápico em tumores com resposta parcial. Os autores avaliaram 50 casos tratados com 6 ciclos de Epirrubicina/Ciclofosfamida (EC) entre 1995 e 1999 e depois analisaram uma segunda série de 16 pacientes tratados em um estudo randomizado que recebiam 4 ciclos de Doxorubicina/Pemetrexade, seguidos de 4 ciclos de Docetaxel (AP-Doc, 10 pacientes) ou 4 ciclos de Doxorubicina/Ciclofosfamida, seguidos de 4 ciclos de Docetaxel (AC-Doc, 12 pacientes). Após o término da quimioterapia com EC, a frequência das células  $CD44^+/CD24^-$  diminuiu de uma média de 4,4% para apenas 2% ( $p=0,0079$ ). No grupo AP/AC-Doc houve

também uma redução do número de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, de uma média de 8,7% antes da quimioterapia para 1,1% após o tratamento. Um fato interessante foi que na série tratada com EC, um alto número de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (considerado arbitrariamente como  $\geq 10\%$ ) foram significativamente mais frequentes em tumores que superexpressavam o oncogene *HER2* (7 de 19 [37%] tumores *HER2* comparados com apenas 2 dos 29 [7%] casos restantes com status *HER2* conhecido,  $p=0,019$ ), nenhum dos tumores triplo negativos continham mais do que 10% de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>. Os tumores com maior número de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> também não mostraram nenhuma associação com a sobrevida global ou sobrevida livre de doença. Por outro lado, esses casos mostraram uma associação com o desenvolvimento de metástases ósseas (4 dos 9 [44%] casos informados comparados com 5 dos 40 [12,5%] tumores restantes,  $p=0,046$ ). Este estudo sugere, portanto, que o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> não seja um marcador verdadeiro de células-tronco cancerosas mamárias, mas por outro lado, que a expressão desse fenótipo pode sim estar relacionado à adesão celular e metástase. A positividade de CD44, um receptor de hialurana, pode favorecer a adesão na medula óssea, como já havia sido sugerido em estudos prévios. Deve-se levar em consideração que a adesão celular e o microambiente em um modelo de xenotransplante não são necessariamente iguais às situações que ocorrem no câncer de mama em um paciente real, portanto, a capacidade de células tumorais CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> crescerem e formarem tumores na gordura mamária de ratos imunocomprometidos pode mostrar simplesmente a habilidade dessas células de se aderirem e sobreviverem no local da injeção ao invés de sofrer apoptose.

Nosso estudo revelou maior frequência de tumores T3 no fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> com um nível de significância limítrofe. Este fato pode ser devido à predominância do subtipo *HER2* na amostra, que como já comentado, apresenta um comportamento mais agressivo, de crescimento mais rápido, podendo consequentemente estar associado ao diagnóstico do tumor com um tamanho maior. Em nosso estudo não houve correlação entre a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e o grau histológico. Apesar da meta análise de Zhou et al.<sup>116</sup> haver demonstrado uma relação entre os marcadores de células-tronco e um alto grau histológico, essa relação foi principalmente vista nos estudos com ALDH1. Se analisarmos apenas os estudos que utilizaram como marcador de células-tronco as células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> não encontramos essa associação.<sup>95, 120</sup> Nossa análise também não mostrou relação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e o comprometimento do linfonodo.

Tiezzi et al <sup>121</sup> (2011) analisaram com citometria de fluxo 40 amostras de carcinomas ductais invasores estadios I e II, e 10 linfonodos metastáticos, e observaram que a porcentagem média das células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> foi maior na metástase linfonodal do que no carcinoma ductal invasor, e que houve um aumento significativo de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> nos pacientes com linfonodos positivos. Os autores observaram também que a porcentagem de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> no carcinoma ductal invasor não foi associada com a idade, tamanho do tumor, grau histológico e HER2. Já o trabalho de Mylona et al <sup>120</sup> (2008) demonstrou uma correlação inversa entre a prevalência de células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e a presença de metástase linfonodal. Os autores analisaram 155 amostras de tumores mamários em blocos de parafina para avaliar os fenótipos CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> e assim, estabelecer a correlação com características clínico-patológicas e a sua importância prognóstica. Eles encontraram que a prevalência de células tumorais CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> esteve inversamente associada à presença de metástase linfonodal (p=0,019) e tenderam a se associar inversamente com o estadio da doença (p=0,068) apesar desta última relação não ser estatisticamente significativa. Não houve correlação entre este fenótipo e os outros parâmetros clínico-patológicos ou em relação à sobrevida global ou sobrevida livre de doença. Por outro lado, curiosamente os autores encontraram que o fenótipo CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> esteve associado a uma piora da sobrevida livre de doença e da sobrevida global, especialmente no subgrupo de pacientes com carcinoma invasor e grau histológico II (p=0,009 para sobrevida livre de doença e p= 0,046 para sobrevida global). Esses resultados contradizem a teoria de que o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> estaria ligado às células-tronco, pois associam este fenótipo com um fenótipo mais favorável e com tendência a uma melhora da sobrevida livre de doença.

Com exceção destes dois estudos, os outros não demonstraram nenhuma correlação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e o status do linfonodo. <sup>29, 95, 113</sup> Mesmo na meta análise de Zhou et al <sup>116</sup> (2010) que analisaram vários tipos de marcadores de células-tronco mamárias como ALDH 1, expressão gênica e células CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, não foi encontrada nenhuma relação entre os marcadores de células-tronco e alguns parâmetros clínicos-patológicos do tumor como o status do linfonodo ou o tamanho tumoral. No presente estudo também não foi observado nenhuma relação entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e a idade das pacientes. Outros estudos também não encontraram associação entre estes parâmetros. <sup>29, 95, 113, 120</sup> Entretanto, Giartromanolaki et al <sup>112</sup> (2011) encontraram idade média mais baixa nas pacientes com o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, mas esse

achado pode estar relacionado a maior frequência de tumores triplo negativos encontrados nessas pacientes.

### 6.3. Análise de expressão dos marcadores CD44, CD44v6, e CD24.

Em nosso estudo encontramos 50% de positividade para o marcador CD44 e uma expressão ainda maior do CD44v6 (68,2%). Ao contrário do que poderíamos imaginar, a sensibilidade do marcador CD44v6 foi maior que a do CD44. Era esperado que o anticorpo CD44 reconhecesse não apenas o CD44 como as suas isoformas variantes, pois as variantes do CD44 contém os exons *standard* do CD44 e um ou mais exons variantes resultantes de *splicing* alternativo. Já o anticorpo CD44v6 reconheceria apenas as isoformas com o exon 6 variante. Em nosso estudo, entretanto, encontramos casos que foram positivos para o CD44v6, mas não foram positivos para o CD44. Outros estudos já encontraram essa inversão<sup>122, 123</sup> e uma das explicações para este fato é que a reatividade de alguns anticorpos anti-CD44 pode ser afetada pela glicosilação.<sup>124</sup> Está descrito também na literatura que modificações pós traducionais de algumas variantes podem esconder epítomos reconhecidos pelos anticorpos anti-CD44.<sup>97, 122</sup> Pode-se ainda encontrar alguns exons variantes que codificam sequências de proteínas que interferem no sítio de ligação da hialurana e podem do mesmo modo esconder epítomos que são reconhecidos pelos anticorpos anti-CD44.<sup>97, 125</sup>

Liu et al<sup>123</sup> (2005) investigaram a relação entre oncogênese, grau histológico, invasão e metástase tumoral, e a expressão de CD44, CD44v6, e nm23 mRNA em casos de adenocarcinoma gástrico e coloretal, carcinoma intraductal da mama, câncer de pulmão e também em tecidos normais adjacentes ao câncer, utilizando as técnicas de TMA com imunoistoquímica e hibridização *in situ* (ISH). Eles encontraram uma expressão de 45,8% para CD44 e de 53,3% para CD44v6 no carcinoma intraductal mamário, e não houve expressão de nenhum dos dois marcadores no tecido mamário normal. Eles encontraram também que a expressão de CD44 estava relacionada à invasão e a presença de metástase linfonodal, mas não ao grau histológico. A expressão de CD44v6, por outro lado, esteve associada à presença de invasão, metástase linfonodal e a um pior grau histológico. Diaz et al<sup>125</sup> (2005) estudaram uma coorte de 230 pacientes linfonodo negativas submetidas a tratamento cirúrgico por câncer de mama, que não foram submetidas a hormonioterapia ou quimioterapia adjuvante. Eles

encontraram 60% de positividade moderada ou alta para o marcador CD44, na maioria dos casos citoplasmática, e em 31% dos casos houve marcação citoplasmática e membranar. Para o marcador CD44v6, a expressão positiva moderada ou alta ocorreu em 42% dos casos, mas a marcação foi predominantemente membranar.

Nossos resultados revelam positividade maior para o CD24 (79,8%), em relação ao CD44 (50%) ou CD44v6 (68,2%), e a marcação foi predominantemente citoplasmática em todos os marcadores. Ao correlacionar individualmente estes marcadores com as variáveis deste estudo, especialmente os subtipos moleculares, podemos observar que o marcador CD44v6 foi novamente um pouco mais sensível que o CD44, mas que a negatividade para o marcador CD24 foi ainda melhor para demonstrar a correlação com os subtipos moleculares do câncer de mama. A negatividade para este marcador esteve relacionada ao subtipo HER2, com significância estatística, na comparação com todos os outros subtipos, e mesmo após o ajuste para idade, grau histológico e tamanho do tumor, essa diferença permaneceu significativa em relação aos grupos Luminal A, e Triplo negativo, e limítrofe em relação ao Luminal B. Ao correlacionar os marcadores CD44, CD44v6, e CD24 individualmente com as variáveis prognósticas clássicas como idade, grau histológico, tamanho do tumor e comprometimento do linfonodo, não observamos associações significativas entre essas variáveis, com exceção do tamanho do tumor T3 x expressão de CD44. Surpreendentemente, foi encontrada uma associação entre os tumores T3 e a negatividade deste marcador.

Park et al <sup>30</sup> (2010) encontraram 57% de positividade do marcador CD44 nos casos de carcinomas ductais invasores e frequência ainda maior de 85% nos casos de carcinomas ductais *in situ* puros, sugerindo que a frequência de expressão do CD44 diminui à medida que o tumor progride. Os autores encontraram o marcador CD24 positivo em 28% dos carcinomas ductais invasores puros, 38% dos carcinomas ductais invasores com carcinoma ductal *in situ* e 62% dos carcinomas ductais *in situ* puros. Células com características de células-tronco CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> por imunistoquímica dupla foram detectadas em 64% dos carcinomas ductais invasores.

Honeth et al <sup>29</sup> (2008) encontraram frequência de 32% de positividade para o CD44, considerando expressão citoplasmática ou membranar em 1% ou mais das células e frequência de 46% de positividade para o marcador CD24. Os autores encontraram marcação predominantemente de membrana no CD44 e predominantemente citoplasmática no CD24. Em relação ao fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, os autores encontraram células tumorais CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> em

31% dos tumores, com a proporção de células variando de apenas algumas células com esse fenótipo, a quase todas as células tumorais. Destes, 13% foram positivos para mais de um dos fenótipos CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>, CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup>, e CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>+</sup>, com 5% dos tumores apresentando células tumorais dos três fenótipos.

Giatromanolaki et al<sup>112</sup> (2011), analisando 139 carcinomas mamários encontraram uma prevalência de tumores CD44<sup>+</sup> e CD24<sup>+</sup> na amostra de 51,8%, e 41,7% respectivamente. Foram considerados positivos os tumores com células cancerosas CD44 e CD24 >10%. Neste estudo, a falta de expressão do CD44 foi associada com comprometimento do linfonodo, independentemente do status do CD24 e a falta de expressão de ambos marcadores CD44 e CD24 foi relacionada a um alto grau histológico e prognóstico desfavorável. Ricardo et al<sup>111</sup> (2011) encontraram 51,2% de positividade para o CD44, com coloração de membrana, mas apenas 11,4% de positividade para o CD24. A maioria dos casos (88,7%) foi considerada baixa/negativa para a marcação de membrana do CD24. Ao comparar os marcadores de células-tronco com os fatores prognósticos clássicos, a expressão do CD44 foi significativamente associada com metástase para o linfonodo e com a expressão de marcadores basais como: EGFR, CK5, P-caderina, CK14, e vimentina. Entretanto, não houve associação entre estes fatores e a expressão de CD24. A expressão de ALDH1 foi predominantemente citoplasmática e esteve relacionada ao alto grau histológico, negatividade do RE, e expressão dos marcadores basais: EGFR, CK5, P-caderina, CK14, e vimentina, mas não foi encontrada nenhuma associação entre a expressão de ALDH1 e a superexpressão do HER2.

## 7. CONCLUSÕES

- A expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> na amostra deste estudo foi de 14%.
- Foi demonstrada uma associação estatisticamente significativa entre o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e os subtipos moleculares do câncer de mama ( $p=0,02$ ), sendo que o subtipo HER2 foi o que apresentou a maior frequência do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.
- Não foi encontrada associação estatisticamente significativa entre os fatores prognósticos (idade, grau histológico, tamanho do tumor e linfonodo) e o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>.
- Foi encontrada maior frequência de marcação com o anticorpo CD44v6 (68,2%) em relação ao CD44 (50%) e frequência de 79,8% para o marcador CD24.
- O marcador CD24 foi o único deste estudo que ao ser analisado isoladamente foi capaz de demonstrar uma associação estatisticamente significativa entre a sua negatividade e os subtipos moleculares do câncer de mama ( $p=0,044$ ), sendo que o subtipo HER2 foi o que apresentou a menor positividade de CD24.
- Houve associação estatisticamente significativa entre a negatividade do marcador CD44 e os tumores T3 ( $p=0,012$ ). Não houve associação estatisticamente significativa entre os marcadores CD44, CD44v6, e CD24 e os outros fatores prognósticos como: idade, grau histológico, e comprometimento do linfonodo.

## REFERÊNCIAS

1. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Estimating the world cancer burden: Globocan 2000. *Int J Cancer*. 2001 Oct 15;94(2):153-6.
2. Kamangar F, Dores GM, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol*. 2006 May 10;24(14):2137-50.
3. Estimativas 2010: Incidência de Câncer no Brasil/Instituto Nacional de Câncer. . Rio de Janeiro:INCA; 2009.
4. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):791-9.
5. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9212-7.
6. Golub TR, Slonim DK, Tamayo P, Huard C, Gaasenbeek M, Mesirov JP, et al. Molecular classification of cancer: class discovery and class prediction by gene expression monitoring. *Science*. 1999 Oct 15;286(5439):531-7.
7. Ahr A, Holtrich U, Solbach C, Scharl A, Strebhardt K, Karn T, et al. Molecular classification of breast cancer patients by gene expression profiling. *J Pathol*. 2001 Oct;195(3):312-20.
8. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
9. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
10. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
11. Sorlie T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. *Eur J Cancer*. 2004 Dec;40(18):2667-75.
12. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
13. Prat A, Perou CM. Mammary development meets cancer genomics. *Nat Med*. 2009 Aug;15(8):842-4.

14. Ithemelandu CU, Leffall LD, Jr., Dewitty RL, Naab TJ, Mezghebe HM, Makambi KH, et al. Molecular breast cancer subtypes in premenopausal and postmenopausal African-American women: age-specific prevalence and survival. *J Surg Res.* 2007 Nov;143(1):109-18.
15. Millikan RC, Newman B, Tse CK, Moorman PG, Conway K, Dressler LG, et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2008 May;109(1):123-39.
16. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
17. Martinez-Climent JA, Andreu EJ, Prosper F. Somatic stem cells and the origin of cancer. *Clin Transl Oncol.* 2006 Sep;8(9):647-63.
18. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem-cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. *J Clin Oncol.* 2008 Jun 10;26(17):2813-20.
19. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1883-90; discussion 95-6.
20. Graziano A, d'Aquino R, Tirino V, Desiderio V, Rossi A, Pirozzi G. The stem cell hypothesis in head and neck cancer. *J Cell Biochem.* 2008 Feb 1;103(2):408-12.
21. Charafe-Jauffret E, Monville F, Ginestier C, Dontu G, Birnbaum D, Wicha MS. Cancer stem cells in breast: current opinion and future challenges. *Pathobiology.* 2008;75(2):75-84.
22. Tang C, Chua CL, Ang BT. Insights into the cancer stem cell model of glioma tumorigenesis. *Ann Acad Med Singapore.* 2007 May;36(5):352-7.
23. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8.
24. Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, et al. Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res.* 2005 Jul 1;65(13):5506-11.
25. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R59.
26. Phillips TM, McBride WH, Pajonk F. The response of CD24(-/low)/CD44+ breast cancer-initiating cells to radiation. *J Natl Cancer Inst.* 2006 Dec 20;98(24):1777-85.
27. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell.* 2007 Mar;11(3):259-73.

28. Ginestier C, Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, et al. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. *Cell Stem Cell*. 2007 Nov;1(5):555-67.
29. Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res*. 2008;10(3):R53.
30. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 1;16(3):876-87.
31. Creighton CJ, Li X, Landis M, Dixon JM, Neumeister VM, Sjolund A, et al. Residual breast cancers after conventional therapy display mesenchymal as well as tumor-initiating features. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009 Aug 18;106(33):13820-5.
32. Lonning PE. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? *Ann Oncol*. 2007 Sep;18 Suppl 8:viii3-7.
33. Patani NR, Dwek MV, Douek M. Predictors of axillary lymph node metastasis in breast cancer: a systematic review. *Eur J Surg Oncol*. 2007 May;33(4):409-19.
34. Key TJ, Verkasalo PK, Banks E. Epidemiology of breast cancer. *Lancet Oncol*. 2001 Mar;2(3):133-40.
35. Kroman N, Jensen MB, Wohlfahrt J, Mouridsen HT, Andersen PK, Melbye M. Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study. *BMJ*. 2000 Feb 19;320(7233):474-8.
36. Yankaskas BC. Epidemiology of breast cancer in young women. *Breast Dis*. 2005;23:3-8.
37. Winchester DP, Osteen RT, Menck HR. The National Cancer Data Base report on breast carcinoma characteristics and outcome in relation to age. *Cancer*. 1996 Oct 15;78(8):1838-43.
38. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: World Health Organization, International Agency for Research on Cancer. 2003.
39. Northridge ME, Rhoads GG, Wartenberg D, Koffman D. The importance of histologic type on breast cancer survival. *J Clin Epidemiol*. 1997 Mar;50(3):283-90.
40. Gamel JW, Meyer JS, Feuer E, Miller BA. The impact of stage and histology on the long-term clinical course of 163,808 patients with breast carcinoma. *Cancer*. 1996 Apr 15;77(8):1459-64.
41. Fisher ER, Anderson S, Tan-Chiu E, Fisher B, Eaton L, Wolmark N. Fifteen-year prognostic discriminants for invasive breast carcinoma: National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocol-06. *Cancer*. 2001 Apr 15;91(8 Suppl):1679-87.

42. Arriagada R, Le MG, Dunant A, Tubiana M, Contesso G. Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period. *Cancer*. 2006 Feb 15;106(4):743-50.
43. Weiss RB, Woolf SH, Demakos E, Holland JF, Berry DA, Falkson G, et al. Natural history of more than 20 years of node-positive primary breast carcinoma treated with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil-based adjuvant chemotherapy: a study by the Cancer and Leukemia Group B. *J Clin Oncol*. 2003 May 1;21(9):1825-35.
44. Aebi S, Gelber S, Castiglione-Gertsch M, Gelber RD, Collins J, Thurlimann B, et al. Is chemotherapy alone adequate for young women with oestrogen-receptor-positive breast cancer? *Lancet*. 2000 May 27;355(9218):1869-74.
45. Vorgias G, Koukouras D, Paleogianni V, Tzoracoeleftherakis E. Prognostic significance of factors affecting disease free interval and overall survival for Stage II breast cancer in Greece. A multivariate cohort study. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2001 Mar;95(1):100-4.
46. Chia SK, Speers CH, Bryce CJ, Hayes MM, Olivotto IA. Ten-year outcomes in a population-based cohort of node-negative, lymphatic, and vascular invasion-negative early breast cancers without adjuvant systemic therapies. *J Clin Oncol*. 2004 May 1;22(9):1630-7.
47. Kollias J, Murphy CA, Elston CW, Ellis IO, Robertson JF, Blamey RW. The prognosis of small primary breast cancers. *Eur J Cancer*. 1999 Jun;35(6):908-12.
48. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Trihia H, Elston CW, Gelber RD, et al. The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer*. 1998 Oct 15;83(8):1529-39.
49. Warwick J, Tabar L, Vitak B, Duffy SW. Time-dependent effects on survival in breast carcinoma: results of 20 years of follow-up from the Swedish Two-County Study. *Cancer*. 2004 Apr 1;100(7):1331-6.
50. Meyer JS, Alvarez C, Milikowski C, Olson N, Russo I, Russo J, et al. Breast carcinoma malignancy grading by Bloom-Richardson system vs proliferation index: reproducibility of grade and advantages of proliferation index. *Mod Pathol*. 2005 Aug;18(8):1067-78.
51. Goldhirsch A, Glick JH, Gelber RD, Coates AS, Thurlimann B, Senn HJ. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol*. 2005 Oct;16(10):1569-83.
52. Schoppmann SF, Bayer G, Aumayr K, Taucher S, Geleff S, Rudas M, et al. Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer. *Ann Surg*. 2004 Aug;240(2):306-12.
53. Nathanson SD, Zarbo RJ, Wachna DL, Spence CA, Andrzejewski TA, Abrams J. Microvessels that predict axillary lymph node metastases in patients with breast cancer. *Arch Surg*. 2000 May;135(5):586-93; discussion 93-4.
54. Allred DC, Harvey JM, Berardo M, Clark GM. Prognostic and predictive factors in breast cancer by immunohistochemical analysis. *Mod Pathol*. 1998 Feb;11(2):155-68.

55. Anderson WF, Chatterjee N, Ershler WB, Brawley OW. Estrogen receptor breast cancer phenotypes in the Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Breast Cancer Res Treat.* 2002 Nov;76(1):27-36.
56. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005 Jan;123(1):21-7.
57. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol.* 2003 May 15;21(10):1973-9.
58. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. *Mod Pathol.* 2008 May;21 Suppl 2:S8-S15.
59. Slamon DJ, Godolphin W, Jones LA, Holt JA, Wong SG, Keith DE, et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. *Science.* 1989 May 12;244(4905):707-12.
60. Tandon AK, Clark GM, Chamness GC, Ullrich A, McGuire WL. HER-2/neu oncogene protein and prognosis in breast cancer. *J Clin Oncol.* 1989 Aug;7(8):1120-8.
61. Paik S, Hazan R, Fisher ER, Sass RE, Fisher B, Redmond C, et al. Pathologic findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project: prognostic significance of erbB-2 protein overexpression in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1990 Jan;8(1):103-12.
62. Press MF, Bernstein L, Thomas PA, Meisner LF, Zhou JY, Ma Y, et al. HER-2/neu gene amplification characterized by fluorescence in situ hybridization: poor prognosis in node-negative breast carcinomas. *J Clin Oncol.* 1997 Aug;15(8):2894-904.
63. Villman K, Sjostrom J, Heikkila R, Hultborn R, Malmstrom P, Bengtsson NO, et al. TOP2A and HER2 gene amplification as predictors of response to anthracycline treatment in breast cancer. *Acta Oncol.* 2006;45(5):590-6.
64. Pritchard KI, Shepherd LE, O'Malley FP, Andrulis IL, Tu D, Bramwell VH, et al. HER2 and responsiveness of breast cancer to adjuvant chemotherapy. *N Engl J Med.* 2006 May 18;354(20):2103-11.
65. Cardoso F, Durbecq V, Larsimont D, Paesmans M, Leroy JY, Rouas G, et al. Correlation between complete response to anthracycline-based chemotherapy and topoisomerase II-alpha gene amplification and protein overexpression in locally advanced/metastatic breast cancer. *Int J Oncol.* 2004 Jan;24(1):201-9.
66. Thor AD, Berry DA, Budman DR, Muss HB, Kute T, Henderson IC, et al. erbB-2, p53, and efficacy of adjuvant therapy in lymph node-positive breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 1998 Sep 16;90(18):1346-60.

67. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol*. 2002 Feb 1;20(3):719-26.
68. Slamon D, Pegram M. Rationale for trastuzumab (Herceptin) in adjuvant breast cancer trials. *Semin Oncol*. 2001 Feb;28(1 Suppl 3):13-9.
69. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol*. 1999 Sep;17(9):2639-48.
70. Piccart-Gebhart MJ, Procter M, Leyland-Jones B, Goldhirsch A, Untch M, Smith I, et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1659-72.
71. Romond EH, Perez EA, Bryant J, Suman VJ, Geyer CE, Jr., Davidson NE, et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2005 Oct 20;353(16):1673-84.
72. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Sep 2;12(5):R68.
73. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7.
74. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2010;15 Suppl 5:39-48.
75. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2010 Nov 11;363(20):1938-48.
76. Carotenuto P, Roma C, Rachiglio AM, Botti G, D'Alessio A, Normanno N. Triple negative breast cancer: from molecular portrait to therapeutic intervention. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*. 2010;20(1):17-34.
77. Fadare O, Tavassoli FA. The phenotypic spectrum of basal-like breast cancers: a critical appraisal. *Adv Anat Pathol*. 2007 Sep;14(5):358-73.
78. Chacon RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12 Suppl 2:S3.
79. Seaberg RM, van der Kooy D. Stem and progenitor cells: the premature desertion of rigorous definitions. *Trends Neurosci*. 2003 Mar;26(3):125-31.
80. Al-Hajj M, Clarke MF. Self-renewal and solid tumor stem cells. *Oncogene*. 2004 Sep 20;23(43):7274-82.

81. Potten CS, Loeffler M. Stem cells: attributes, cycles, spirals, pitfalls and uncertainties. Lessons for and from the crypt. *Development*. 1990 Dec;110(4):1001-20.
82. Clarke MF, Fuller M. Stem cells and cancer: two faces of eve. *Cell*. 2006 Mar 24;124(6):1111-5.
83. Kim M, Turnquist H, Jackson J, Sgagias M, Yan Y, Gong M, et al. The multidrug resistance transporter ABCG2 (breast cancer resistance protein 1) effluxes Hoechst 33342 and is overexpressed in hematopoietic stem cells. *Clin Cancer Res*. 2002 Jan;8(1):22-8.
84. Smalley MJ, Clarke RB. The mammary gland "side population": a putative stem/progenitor cell marker? *J Mammary Gland Biol Neoplasia*. 2005 Jan;10(1):37-47.
85. Litingtung Y, Lawler AM, Sebald SM, Lee E, Gearhart JD, Westphal H, et al. Growth retardation and neonatal lethality in mice with a homozygous deletion in the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Mol Gen Genet*. 1999 Feb;261(1):100-5.
86. Deome KB, Faulkin LJ, Jr., Bern HA, Blair PB. Development of mammary tumors from hyperplastic alveolar nodules transplanted into gland-free mammary fat pads of female C3H mice. *Cancer Res*. 1959 Jun;19(5):515-20.
87. Hoshino K, Gardner WU. Transplantability and life span of mammary gland during serial transplantation in mice. *Nature*. 1967 Jan 14;213(5072):193-4.
88. Smith GH, Strickland P, Daniel CW. Putative epithelial stem cell loss corresponds with mammary growth senescence. *Cell Tissue Res*. 2002 Dec;310(3):313-20.
89. Young LJ, Medina D, DeOme KB, Daniel CW. The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland. *Exp Gerontol*. 1971 Feb 1;6(1):49-56.
90. Boecker W, Buerger H. Evidence of progenitor cells of glandular and myoepithelial cell lineages in the human adult female breast epithelium: a new progenitor (adult stem) cell concept. *Cell Prolif*. 2003 Oct;36 Suppl 1:73-84.
91. Korsching E, Packeisen J, Agelopoulos K, Eisenacher M, Voss R, Isola J, et al. Cytogenetic alterations and cytokeratin expression patterns in breast cancer: integrating a new model of breast differentiation into cytogenetic pathways of breast carcinogenesis. *Lab Invest*. 2002 Nov;82(11):1525-33.
92. Abd El-Rehim DM, Ball G, Pinder SE, Rakha E, Paish C, Robertson JF, et al. High-throughput protein expression analysis using tissue microarray technology of a large well-characterised series identifies biologically distinct classes of breast cancer confirming recent cDNA expression analyses. *Int J Cancer*. 2005 Sep 1;116(3):340-50.
93. Laakso M, Tanner M, Nilsson J, Wiklund T, Erikstein B, Kellokumpu-Lehtinen P, et al. Basoluminal carcinoma: a new biologically and prognostically distinct entity between basal and luminal breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Jul 15;12(14 Pt 1):4185-91.

94. Charafe-Jauffret E, Ginestier C, Monville F, Fekairi S, Jacquemier J, Birnbaum D, et al. How to best classify breast cancer: conventional and novel classifications (review). *Int J Oncol.* 2005 Nov;27(5):1307-13.
95. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1154-9.
96. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res.* 1997;71:241-319.
97. Sneath RJ, Mangham DC. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol.* 1998 Aug;51(4):191-200.
98. Thorne RF, Legg JW, Isacke CM. The role of the CD44 transmembrane and cytoplasmic domains in co-ordinating adhesive and signalling events. *J Cell Sci.* 2004 Jan 26;117(Pt 3):373-80.
99. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell.* 1990 Jun 29;61(7):1303-13.
100. Fox SB, Fawcett J, Jackson DG, Collins I, Gatter KC, Harris AL, et al. Normal human tissues, in addition to some tumors, express multiple different CD44 isoforms. *Cancer Res.* 1994 Aug 15;54(16):4539-46.
101. Mackay CR, Terpe HJ, Stauder R, Marston WL, Stark H, Gunthert U. Expression and modulation of CD44 variant isoforms in humans. *J Cell Biol.* 1994 Jan;124(1-2):71-82.
102. Culty M, Shizari M, Thompson EW, Underhill CB. Binding and degradation of hyaluronan by human breast cancer cell lines expressing different forms of CD44: correlation with invasive potential. *J Cell Physiol.* 1994 Aug;160(2):275-86.
103. Gunthert U, Hofmann M, Rudy W, Reber S, Zoller M, Hausmann I, et al. A new variant of glycoprotein CD44 confers metastatic potential to rat carcinoma cells. *Cell.* 1991 Apr 5;65(1):13-24.
104. Stauder R, Eisterer W, Thaler J, Gunthert U. CD44 variant isoforms in non-Hodgkin's lymphoma: a new independent prognostic factor. *Blood.* 1995 May 15;85(10):2885-99.
105. Mulder JW, Kruyt PM, Sewnath M, Oosting J, Seldenrijk CA, Weidema WF, et al. Colorectal cancer prognosis and expression of exon-v6-containing CD44 proteins. *Lancet.* 1994 Nov 26;344(8935):1470-2.
106. TNM Classificação de Tumores Malignos Ministério da Saúde - Instituto Nacional de Câncer - UICC- União Internacional Contra o Câncer  
6a Edição ed; 2004.

107. Sebastiao A. Estudo da expressão do fenótipo basal com marcação imunoistoquímica para EGFR, CK5/6, e CK14 em carcinomas ductais da mama luminais A e triplo negativos. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2010.
108. Nicolini A, Ferrari P, Fini M, Borsari V, Fallahi P, Antonelli A, et al. Stem cells: their role in breast cancer development and resistance to treatment. *Curr Pharm Biotechnol*. 2011 Feb 1;12(2):196-205.
109. Van den Eynden GG, Van der Auwera I, Van Laere S, Colpaert CG, van Dam P, Merajver S, et al. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 May;85(1):13-22.
110. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*. 2001 Dec;159(6):2249-56.
111. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol*. 2011 Jun 16.
112. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol*. 2011 Sep;28(3):745-52.
113. Lu X, Xu K, Lu H, Yin Y, Ma C, Liu Y, et al. CD44(+)/CD24(-) cells are transit progenitors and do not determine the molecular subtypes and clinical parameters in breast carcinomas. *Ultrastruct Pathol*. 2011 Apr;35(2):72-8.
114. Wang KH, Kao AP, Chang CC, Lee JN, Hou MF, Long CY, et al. Increasing CD44+/CD24(-) tumor stem cells, and upregulation of COX-2 and HDAC6, as major functions of HER2 in breast tumorigenesis. *Mol Cancer*. 2010;9:288.
115. Morimoto K, Kim SJ, Tanei T, Shimazu K, Tanji Y, Taguchi T, et al. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. *Cancer Sci*. 2009 Jun;100(6):1062-8.
116. Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, et al. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;122(3):795-801.
117. Li X, Lewis MT, Huang J, Gutierrez C, Osborne CK, Wu MF, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. *J Natl Cancer Inst*. 2008 May 7;100(9):672-9.
118. Lee HE, Kim JH, Kim YJ, Choi SY, Kim SW, Kang E, et al. An increase in cancer stem cell population after primary systemic therapy is a poor prognostic factor in breast cancer. *Br J Cancer*. 2011 May 24;104(11):1730-8.

119. Aulmann S, Waldburger N, Penzel R, Andrulis M, Schirmacher P, Sinn HP. Reduction of CD44(+)/CD24(-) breast cancer cells by conventional cytotoxic chemotherapy. *Hum Pathol.* 2010 Apr;41(4):574-81.
120. Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2008 Jul;39(7):1096-102.
121. Tiezzi DG, Valejo FA, Marana HR, Carrara HH, Benevides L, Antonio HM, et al. CD44(+)/CD24 (-) cells and lymph node metastasis in stage I and II invasive ductal carcinoma of the breast. *Med Oncol.* 2011 Jun 29.
122. Lyzak JS, Yaremko ML, Recant W, Baunoch DA, Joseph L. Role of CD44 in nonpalpable T1a and T1b breast cancer. *Hum Pathol.* 1997 Jul;28(7):772-8.
123. Liu YJ, Yan PS, Li J, Jia JF. Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer. *World J Gastroenterol.* 2005 Nov 14;11(42):6601-6.
124. Matsuki H, Yonezawa K, Obata K, Iwata K, Nakamura H, Okada Y, et al. Monoclonal antibodies with defined recognition sequences in the stem region of CD44: detection of differential glycosylation of CD44 between tumor and stromal cells in tissue. *Cancer Res.* 2003 Dec 1;63(23):8278-83.
125. Diaz LK, Zhou X, Wright ET, Cristofanilli M, Smith T, Yang Y, et al. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2005 May 1;11(9):3309-14.

**APÊNDICES**

## APÊNDICE A

**Tabela 1. Comparação entre a expressão do fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> e as variáveis: idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo.**

<b>Fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> (n=129)</b>			
<b>Variável</b>	<b>Negativo (n=111)</b>	<b>Positivo (n=18)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Idade (anos)</b>	55,9 ± 13,5	56,9 ± 14,6	0,754
<b>Grau histológico</b>			
I	15 (88,2)	2 (11,8)	0,525
II	56 (88,9)	7 (11,1)	
III	40 (81,6)	9 (18,4)	
Total	111(100)	18(100)	
<b>Tamanho do tumor</b>			
T1	49 (87,5)	7 (12,5)	0,076
T2	58 (87,9)	8 (12,1)	
T3	4 (57,1)	3 (42,9)	
Total	111(100)	18(100)	
<b>Linfonodo</b>			
Negativo	62 (86,1)	10 (13,9)	1
Positivo	49 (86)	8 (14)	
Total	111(100)	18(100)	

\*Teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (variáveis categóricas) ou teste t de Student para amostras independentes (idade); p<0,05.

## APÊNDICE B

**Tabela 2. Comparação entre a expressão do CD44 e as variáveis: idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo.**

<b>CD44 (n=132)</b>			
<b>Variável</b>	<b>Negativo (n=66)</b>	<b>Positivo (n=66)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Idade (anos)</b>	55,6 ± 14,0	56,0 ± 13,7	0,89
<b>Grau histológico</b>			
I	11 (61,1)	7 (38,9)	0,264
II	27 (42,9)	36 (57,1)	
III	28 (54,9)	23 (45,1)	
Total	66(100)	66(100)	
<b>Tamanho do tumor</b>			
T1	24 (43,6)	31 (56,4)	0,012
T2	34 (49,3)	35 (50,7)	
T3	8 (100)	0 (0)**	
Total	66(100)	66(100)	
<b>Linfonodo</b>			
Negativo	37 (50)	37 (50)	1
Positivo	29 (50)	29 (50)	
Total	66(100)	66(100)	

\*Teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (variáveis categóricas) ou teste t de Student para amostras independentes (idade);  $p < 0,05$ .

\*\*Não foi possível ajustar um modelo de regressão logística para as comparações dois a dois dos tamanhos do tumor devido a não haver havido nenhum caso de tumor T3 com expressão positiva do marcador CD44.

## APÊNDICE C

Tabela 3. Comparação entre a expressão do CD44v6 e as variáveis: idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo.

<b>CD44v6 (n=129)</b>			
<b>Variável</b>	<b>Negativo (n=41)</b>	<b>Positivo (n=88)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Idade (anos)</b>	55,6 ± 14,7	56,1 ± 13,4	0,844
<b>Grau histológico</b>			
I	6 (35,3)	11 (64,7)	0,378
II	23 (36,5)	40 (63,5)	
III	12 (24,5)	37 (75,5)	
Total	41(100)	88(100)	
<b>Tamanho do tumor</b>			
T1	18 (32,7)	37 (67,3)	0,593
T2	22 (32,8)	45 (67,2)	
T3	1 (14,3)	6 (85,7)	
Total	41(100)	88(100)	
<b>Linfonodo</b>			
Negativo	24 (33,3)	48 (66,7)	0,707
Positivo	17 (29,8)	40 (70,2)	
Total	41(100)	88(100)	

\*Teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (variáveis categóricas) ou teste t de Student para amostras independentes (idade); p<0,05

## APÊNDICE D

**Tabela 4. Comparação entre a expressão do CD24 e as variáveis: idade, grau histológico, tamanho do tumor, e comprometimento do linfonodo.**

<b>CD24 (n=129)</b>			
<b>Variável</b>	<b>Negativo (n=26)</b>	<b>Positivo (n=103)</b>	<b>Valor de p*</b>
<b>Idade (anos)</b>	55,2 ± 14,1	56,2 ± 13,5	0,746
<b>Grau histológico</b>			
I	4 (23,5)	13 (76,5)	0,494
II	10 (15,9)	53 (84,1)	
III	12 (24,5)	37 (75,5)	
Total	26(100)	103(100)	
<b>Tamanho do tumor</b>			
T1	12 (21,4)	44 (78,6)	0,247
T2	11 (16,7)	55 (83,3)	
T3	3 (42,9)	4 (57,1)	
Total	26(100)	103(100)	
<b>Linfonodo</b>			
Negativo	15 (20,8)	57 (79,2)	1
Positivo	11 (19,3)	46 (80,7)	
Total	26(100)	103(100)	

\*Teste de Qui-quadrado ou teste exato de Fisher (variáveis categóricas) ou teste t de Student para amostras independentes (idade); p<0,05.

**ANEXO**



**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO PARANÁ**  
 Núcleo de Bioética  
 Comitê de Ética em Pesquisa  
*Ciência com Consciência*

**PARECER CONSUBSTANCIADO DE PROTOCOLO DE PESQUISA**

Parecer Nº **0003469/09**

Protocolo CEP Nº **5365**

Título do projeto **ESTUDO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO EM DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA**

Grupo  
Versão **1**

Protocolo CONEP **0480.0.084.000-09**

Pesquisador responsável **IRIS RABINOVICH**

Instituição **PUCPR-CCBS - Curitiba**

**Objetivos**

Estudar a expressão de marcadores de células tronco em amostras de carcinomas ductais utilizando a técnica de tissue microarrays, correlacionando a expressão dos marcadores com os subtipos moleculares do câncer de mama.

Específicos:

- Estabelecer correlação entre o fenótipo CD44+/CD24- e o subtipo Basal.

- Estabelecer correlação entre o fenótipo CD44-/CD24+ e o subtipo HER2.

- Estabelecer correlação entre as variáveis: grau histológico, status linfonodal, e idade da paciente e a expressão de CD44, CD44v6, e CD24.

**Comentários e considerações**

Pesquisa justificada pela evidência em estudos que demonstram "que a expressão de marcadores de células tronco nos tumores mamários tem implicação prognóstica". Parte da questão norteadora: Existe associação entre os marcadores imunohistoquímicos de células tronco mamárias e os diferentes subtipos moleculares do câncer de mama (com ênfase no fenótipo basal e HER-2)? Para respondê-la pretende analisar 160 lâminas de carcinomas ductais mamários de mulheres que tiveram diagnóstico em um centro de patologia no município de Curitiba, no período de janeiro de 1998 a julho de 2009.

**Termo de consentimento livre e esclarecido e/ou Termo de compromisso para uso de dados.**

TCUD de acordo com a pesquisa e liberado acesso aos dados para as pesquisadoras: Ana Paula Martins Sebastião e Iris Rabinovich

**Conclusões**

Aprovado sob o quesito ético

Devido ao exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa da PUCPR, de acordo com as exigências das Resoluções Nacionais 196/96 e demais relacionadas a pesquisas envolvendo seres humanos, em reunião realizada no dia: **04/11/2009**, manifesta-se por considerar o projeto **Aprovado**.



Parecer Nº **0003469/09**

Protocolo CEP Nº **5365**

Título do projeto **ESTUDO DA EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS TRONCO EM DIFERENTES SUBTIPOS MOLECULARES NO CÂNCER DE MAMA**

Grupo  
Versão **1**

Protocolo CONEP **0480.0.084.000-09**

Pesquisador responsável **IRIS RABINOVICH**

Instituição **PUCPR-CCBS - Curitiba**

---

### Situação Aprovado

Lembramos aos senhores pesquisadores que, no cumprimento da Resolução 196/96, o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) deverá receber relatórios anuais sobre o andamento do estudo, bem como a qualquer tempo e a critério do pesquisador nos casos de relevância, além do envio dos relatos de eventos adversos, para conhecimento deste Comitê. Salientamos ainda, a necessidade de relatório completo ao final do estudo.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP-PUCPR de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificado e as suas justificativas.

Se a pesquisa, ou parte dela for realizada em outras instituições, cabe ao pesquisador não iniciá-la antes de receber a autorização formal para a sua realização. O documento que autoriza o início da pesquisa deve ser carimbado e assinado pelo responsável da instituição e deve ser mantido em poder do pesquisador responsável, podendo ser requerido por este CEP em qualquer tempo.

Curitiba, 04 de Novembro de 2009.

  
**Prof. Dr. Sergio Surugi de Siqueira**  
**Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa**  
**PUC PR**

