

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA E CIÊNCIAS DA SAÚDE
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CLÍNICA MÉDICA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO SIGNIFICADO CLÍNICO DO SUBTIPO *BASAL-LIKE* DE
CÂNCER DE MAMA IDENTIFICADO ATRAVÉS DE IMUNOHISTOQUÍMICA**

LINA BARBOSA CASSOL

Orientador: Prof. Dr. Bernardo Garicochea

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do Grau de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde da Faculdade de Medicina da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2007

DADOS INTERNACIONAIS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

C345a Cassol, Lina Barbosa

Avaliação do significado clínico do subtipo basal-like de câncer de mama identificado através de imuno-histoquímica / Lina Barbosa Cassol; orient. Bernardo Garicochea.. Porto Alegre: PUCRS, 2007.
44f.: il. tab.

Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Medicina e Ciências da Saúde. Área de concentração: Clínica Médica.

1. NEOPLASIAS MAMÁRIAS. 2. IMUNOHISTOQUÍMICA. 3. PROGNÓSTICO. 4. ANÁLISE DE SOBREVIDA. 5. FATOR DE CRESCIMENTO EPIDÉRMICO. 6. RECEPTOR DE ESTROGÊNIO. 7. NEOPLASIA DE CÉLULAS BASAIS. 8. ESTUDOS DE COORTES. 9. ESTUDOS RETROSPECTIVOS. I. Garicochea, Bernardo. II. Título.

C.D.D. 618.19

C.D.U. 618.19-006(043.3)

N.L.M. WP 870

Aos pacientes com câncer,
razão maior do nosso trabalho e esforço.

Toda relação humana é de troca.
Espero tornar-me cada vez mais preparada
para ajudá-los e para aprender com eles.

AGRADECIMENTOS

Em nenhuma outra época da vida, contei, como agora, com a ajuda e a colaboração de tantas pessoas valorosas. Para mim, isso significa um avanço importante rumo à maturidade pessoal e profissional. O maior aprendizado desses últimos dois anos foi o de que as forças individuais se multiplicam quando integradas em um trabalho em equipe. Dentro desse contexto, quero agradecer:

Ao **Dr. Bernardo Garicochea**, meu orientador no mestrado, pela oportunidade oferecida, pelos ensinamentos e por ter, desde o início, confiado na minha capacidade de cumprir esta tarefa;

À **Dra. Alice Zelmanowicz**, pelo auxílio na análise estatística dos dados, a **Dra. Márcia Graudenz** e **Marta Recktenvald** do Instituto de Patologia pela realização da técnica imunohistoquímica dos casos incluídos nesse trabalho, às acadêmicas de medicina **Cláudia Coral** e **Gaile Yser**, pelo auxílio na revisão de prontuários e à farmacêutica **Juliana Schwartz da Silva**, meu braço direito na reta final;

A todas as pessoas que fizeram com que eu me sentisse em casa também no Hospital São Lucas da PUCRS: **Dra. Alessandra Morelle**, **Dra. Fernanda Costa**, **Luciana Zamprogna**, a funcionária **Luíza** do Serviço de Patologia, ao pessoal da Pós-Graduação, em especial a **Sônia** e ao **Maurício**, **Dr. Gustavo Carvalhal**, **Dr. Carlos Eduardo Poli de Figueiredo**, **Dr. José Vieira**, **Dra. Ana Paula Zamboni**, **Dra. Tatiana Daltoé** e muitos outros.

Ao **Dr. Sérgio Jobim de Azevedo**, com quem eu trabalho há 4 anos, pela confiança na minha capacidade, pelo estímulo ao aperfeiçoamento contínuo, pela amizade, pelas orientações e por ser um grande exemplo de ética, competência profissional e retidão nas relações humanas;

Aos meus colegas do Hospital Mãe de Deus: **Dr. Stephen Stefani**, **Dr. Luiz Antônio Bruno**, **Dr. Gabriel Prolla**, **Dr. Jairo Lewgoy** e **Dr. Carlos Barrios**, pela generosidade da acolhida, pelo estímulo e pela parceria e harmonia do convívio diário;

Às colegas da Pesquisa Clínica do HCPA por terem se tornado grandes amigas e porque aprendemos juntas a trabalhar em equipe: **Gabriella Remedi, Caroline Marangon, Luciane di Leone, Patrícia Miraglia, Ana Cristina Rodrigues, Keyla Jung** e, em especial, **Anna Cancela**, que me disponibilizou todo o material de sua dissertação, da qual provém os casos incluídos nesse trabalho;

Às minhas amigas do peito **Fabiane Ciocari, Paula Martini, Ana Carina Teixeira dal Ponte, Renata Marques, Ana Maria Krepsky e Vanessa Cunha** por estarem sempre comigo de forma positiva, nos bons e maus momentos;

Aos meus pais **Leonis e Glória** e ao meu irmão **Daniel** porque sempre duvidaram de mim, em qualquer situação, quando eu dizia que não conseguiria e sempre acreditaram quando eu dizia que poderia;

Ao meu amor **André Berger**, meu namorado, melhor amigo e companheiro de todas as horas, pela alegria do convívio diário, pela cumplicidade e pela oportunidade de crescermos e aprendermos com a vida juntos.

Para Ser Grande

Para ser grande, sê inteiro: nada
teu exagera ou exclui.

Sê todo em cada coisa. Pões quanto és
no mínimo que fazes.

Assim em cada lago a lua toda
brilha, porque alta vive.

Fernando Pessoa

SUMÁRIO

| | |
|---|------|
| LISTA DE FIGURAS | viii |
| LISTA DE TABELAS | ix |
| LISTA DE ABREVIATURAS..... | x |
| RESUMO | xii |
| ABSTRACT | xiv |
| 1 INTRODUÇÃO..... | 1 |
| 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 2 |
| 2.1 Epidemiologia do Câncer de Mama..... | 2 |
| 2.2 Tratamento Adjuvante | 4 |
| 2.2.1 Hormonioterapia Adjuvante..... | 5 |
| 2.2.2 Quimioterapia adjuvante | 9 |
| 2.2.3 Trastuzumabe Adjuvante..... | 12 |
| 2.2.4 Radioterapia Adjuvante..... | 15 |
| 2.3 Avaliação Prognóstica e Perfil Molecular do Câncer de Mama..... | 16 |
| 2.4 Câncer de Mama <i>Basal-like</i> ou Triplo-negativo..... | 21 |
| 3 OBJETIVOS..... | 25 |
| 3.1 Objetivo primário..... | 25 |
| 3.2 Objetivos secundários | 25 |
| 4 PACIENTES E MÉTODOS | 26 |
| 4.1 Delineamento | 26 |
| 4.2 Amostra..... | 26 |
| 4.3 Critérios de Inclusão | 26 |
| 4.4 Critérios de Exclusão | 27 |
| 4.5 Amostras Tumorais e Técnica Imunohistoquímica | 27 |
| 4.6 Análise Estatística..... | 28 |
| 5 RESULTADOS | 30 |
| 6 DISCUSSÃO..... | 36 |
| 7 REFERÊNCIAS | 41 |

LISTA DE FIGURAS

| | | |
|--------------------|--|----|
| Figura 1 - | Taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres brasileiras. | 3 |
| Figura 2 - | Taxas de incidência anuais de câncer de mama por 100.000 mulheres..... | 3 |
| Figura 3 - | Taxas de mortalidade anuais por câncer de mama por 100.000 mulheres..... | 4 |
| Figura 4 - | Subtipos de câncer de mama definidos de acordo com arranjo de expressão de genes. | 19 |
| Figura 5 - | Probabilidade de sobrevida geral e sobrevida livre de doença conforme o subtipo molecular definido por arranjo de expressão de genes. | 19 |
| Figura 6 - | Coloração positiva nuclear para RE (escore Allred 8)..... | 32 |
| Figura 7 - | Coloração positiva nas membranas celulares para HER2 (intensidade 3+). | 32 |
| Figura 8 - | Coloração positiva na membrana e citoplasma para EGFR..... | 33 |
| Figura 9 - | Coloração positiva na membrana e citoplasma para CK 5/6. | 33 |
| Figura 10 - | Curvas de sobrevida livre de doença para os subtipos <i>basal-like</i> , luminal, HER2-positivo e indeterminado. | 34 |
| Figura 11 - | Curvas de sobrevida geral para os subtipos <i>basal-like</i> , luminal, HER2-positivo e indeterminado..... | 35 |
| Figura 12 - | Ductos mamários normais residuais entremeados no carcinoma invasor de mama, com coloração falso-positiva para CK 5/6. | 37 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------------|--|----|
| Tabela 1 - | Descrição das principais características dos subtipos <i>basal-like</i> , luminal, HER2-positivo e indeterminado | 31 |
| Tabela 2 - | Relação entre a expressão de EGFR e RE. | 35 |
| Tabela 3 - | Relação entre a expressão de EGFR e HER2. | 35 |

LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|-------|--|
| AC | Adriamicina, Ciclofosfamida |
| ASCO | American Society of Clinical Oncology |
| ATAC | <i>Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination</i> |
| BCIRG | <i>Breast Cancer International Research Group</i> |
| CALGB | <i>Cancer and Leukemia Group B</i> |
| CDI | Carcinoma Ductal Invasor |
| CK | <i>cytokeratin</i> |
| CLI | Carcinoma Lobular Invasor |
| CMF | Ciclofosfamida, Metotrexate e 5-Fluorouracil |
| DNA | ácido desoxirribonucleico |
| EGFR | <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> |
| FAC | Fluorouracil, Adriamicina e Ciclofosfamida |
| FEC | Fluorouracil, Epirrubicina e Ciclofosfamida |
| FISH | hibridização fluorescente in situ |
| HER1 | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 1</i> |
| HER2 | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 2</i> |
| HER3 | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 3</i> |
| HER4 | <i>Human Epidermal Growth Factor Receptor – Type 4</i> |
| HERA | <i>Herceptin Adjuvant</i> |
| HR | <i>Hazard Ratio</i> |
| HSL | Hospital São Lucas |
| IARC | <i>International Agency for Research on Cancer</i> |
| INCA | Instituto Nacional do Câncer |
| NCCN | <i>National Comprehensive Cancer Network</i> |
| NCCTG | <i>North Central Cancer Treatment Group</i> |

| | |
|----------|--|
| NCIC CTG | <i>National Cancer Institute of Canada Clinical Trials Group</i> |
| NIH | <i>National Institute of Health</i> |
| NSABP | <i>National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project</i> |
| PUCRS | Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul |
| RE | Receptor de Estrógeno |
| RNA | ácido ribonucleico |
| RP | Receptor de progesterona |
| TAC | Taxotere, Adriamicina e Ciclofosfamida |
| TNM | Tumor, Nódulo, Metástase |

RESUMO

Base teórica: Atualmente, a avaliação prognóstica do câncer de mama inicial é principalmente baseada nas características clínicas das pacientes e histológicas dos tumores. Recentemente, subtipos moleculares de carcinoma invasor da mama foram reconhecidos através dos estudos de perfilamento genético por *DNA microarray*. Essa nova classificação pode melhorar a avaliação prognóstica, mas essa nova tecnologia ainda não é amplamente disponível. Assim, a possibilidade de identificar os subtipos moleculares através de métodos mais simples e baratos é promissora. A identificação do subtipo *basal-like* de câncer de mama é particularmente importante porque tem uma evolução desfavorável e menos opções de tratamento disponíveis. Adicionalmente, a expressão de Receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico (EGFR) parece ser mais freqüente nesse subtipo.

Métodos: Uma coorte retrospectiva de 112 pacientes consecutivas com carcinoma primário de mama de estágio patológico I ou II, diagnosticadas e tratadas na mesma instituição entre 1995 e 2000, foi estudada. As características histológicas e clínicas, bem como dados de evolução clínica e sobrevida, foram revisados. Análise imunohistoquímica foi realizada em blocos representativos dos tumores com anticorpos contra Receptor de Estrógeno (RE), Receptor para o Fator de Crescimento Epidérmico Humano-tipo 2 (HER2), CK 5/6 e EGFR. O objetivo primário foi identificar a prevalência do subtipo *basal-like* de câncer de mama (RE e HER2-negativo e CK 5/6 e/ou EGFR positivo) nessa população.

Resultados: 13 dos 112 (11,6 %) tumores avaliados foram do subtipo *basal-like*. Sua idade média foi 49 anos; 77 % eram estágio patológico II e 100 % eram carcinomas ductais invasores. Não houve diferença prognóstica entre o subtipo *basal-like* e os subtipos luminal (RE positivo e HER2 negativo); com superexpressão de HER2 (HER2 positivo) e indeterminado (quatro marcadores negativos) com relação à sobrevida livre de doença e sobrevida geral. Esse resultado provavelmente se deve ao número limitado de pacientes neste estudo e ao bom prognóstico de pacientes com câncer de mama em estágio inicial. 11 dos 112 (10%) casos foram positivos para EGFR. Tumores positivos para EGFR foram mais freqüentemente negativos para RE (23 x 5 %; $p = 0,01$).

Conclusões: Nossos resultados sugerem que é possível identificar o subtipo *basal-like* de câncer de mama através da análise imunohistoquímica do RE, HER2, CK 5/6 e EGFR. Além disso, a expressão de EGFR parece ser mais freqüente em tumores RE-negativos, o que

sugere que drogas direcionadas contra o EGFR poderiam beneficiar esse subgrupo de pacientes.

Palavras-chave: neoplasias mamárias, neoplasia de células basais, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Background: At present time, prognostic evaluation of initial breast cancer is mostly based on patients' clinical and tumoral histological features. Recently, molecular subtypes of invasive breast cancer were recognized through DNA microarray profiling studies. This new classification can potentially improve the prognostic evaluation but this technology is still not widely available. The possibility of identifying the molecular subtypes through simpler and cheaper methods is promising. The identification of basal-like breast cancer is particularly important because it has a poor outcome and fewer treatment options available. Additionally, Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) expression seems to be more frequent in this subtype.

Methods: A retrospective cohort of 112 consecutive patients with pathologic stage I or II primary breast carcinomas, treated in the same institution between 1995 and 2000, was studied. Histological and clinical features as well as clinical outcome and survival were reviewed. Immunohistochemical analysis was carried out in representative blocks of tumors with antibodies against Estrogen Receptor (ER), Human Epidermal Growth Receptor – type 2 (HER2), CK5/6 and EGFR. The primary endpoint was to determine the prevalence of basal-like breast cancer (ER and HER2-negative and CK 5/6 and/or EGFR-positive) in this population.

Results: 13 of 112 tumors (11,6 %) were basal-like breast cancer. Their mean age was 49 years; 77 % were stage II and 100 % were invasive ductal carcinomas. There was no prognostic difference between basal-like breast cancer and the subtypes luminal (ER-positive and HER2-negative); HER2-overexpressing (HER2-positive) and undetermined (four markers negative) relating to disease-free and overall survival. This is probably related to limited number of patients in this study and good prognosis of initial-stage patients. 11 of 112 cases (10%) were positive for EGFR. EGFR-positive tumors tended to be ER-negative (23 % x 5 %; $p=0,01$).

Conclusions: Our results suggest that it is possible to identify basal-like breast cancer by immunohistochemical analysis of ER, HER2, CK 5/6 and EGFR. Besides, EGFR expression seems to be more frequent in ER-negative tumors, which suggest EGFR-targeted drugs might benefit this subgroup of patients.

Keywords: breast cancer, basal-like subtype, immunohistochemistry

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama é atualmente o tipo de neoplasia mais freqüente entre as mulheres em todo o mundo, excetuando câncer de pele não melanoma. Apesar de altamente curável nos estágios iniciais, o câncer de mama, de um modo geral, tem impacto negativo nas taxas de morbidade e mortalidade das pacientes afetadas quando comparadas às mulheres saudáveis da mesma faixa etária.

Em uma tentativa de reduzir a taxa de recidiva e de mortalidade das pacientes diagnosticadas com câncer de mama, várias modalidades terapêuticas adjuvantes foram desenvolvidas e aprimoradas nas últimas décadas. Apesar desses tratamentos serem consideravelmente eficazes, todos implicam em riscos de toxicidade em pacientes que podem estar curadas apenas com o tratamento cirúrgico.

Dessa forma, a avaliação prognóstica acurada de uma paciente com diagnóstico de câncer de mama inicial é fundamental para que seu tratamento adjuvante seja adequado ao seu risco potencial de recidiva. Atualmente, essa avaliação de risco é predominantemente baseada em características clínicas das pacientes e histológicas dos tumores de mama. No entanto, evidências recentes sugerem que a análise do perfil genético dos tumores, determinado através da tecnologia de *microarray*, pode ter maior acurácia na predição do prognóstico das pacientes do que as características prognósticas clínicas e histológicas, usualmente levadas em consideração.

No entanto, essa nova tecnologia ainda se encontra inacessível na maior parte dos centros médicos que tratam pacientes com câncer de mama. A possibilidade de identificar os subtipos moleculares descritos nos estudos de *microarray* através de metodologias mais acessíveis é bastante interessante. Além de potencialmente melhorar a determinação do prognóstico de pacientes com câncer de mama, o conhecimento mais detalhado desses subtipos pode levar ao desenvolvimento de novas classes de drogas com atividade subtipo-específica.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Epidemiologia do Câncer de Mama

O câncer de mama é o tipo de neoplasia mais freqüente entre as mulheres em todo o mundo, excluindo câncer de pele não melanoma. A incidência mundial continua a aumentar, mesmo em países onde é relativamente baixa, como Índia, Coréia, Gâmbia, Vietnã, Tailândia e China⁽¹⁾. No Brasil, foram previstos para o ano de 2006, 48.930 casos novos, com um risco estimado de 52 casos a cada 100.000 mulheres. No Rio Grande do Sul, a taxa prevista foi de 88,81 casos para cada 100.000 mulheres⁽²⁾ (Figura 1). De acordo com os dados do GLOBOCAN 2002, o câncer de mama representa 26,6 % dos novos casos de câncer e causa 16,1 % das mortes por câncer em mulheres brasileiras⁽³⁾.

Nos Estados Unidos, foram estimados 212.920 novos casos de câncer de mama e 40.970 mortes relacionadas à doença em 2006⁽⁴⁾. Uma em cada oito mulheres norte-americanas desenvolverá câncer de mama ao longo de sua vida. Esse risco tem aumentado gradualmente ao longo das últimas décadas⁽⁴⁾. Em muitos países ocidentais, incluindo os Estados Unidos, apesar da incidência crescente, a mortalidade por câncer de mama está diminuindo, como resultado de diagnósticos mais precoces e avanços terapêuticos. No entanto, em grande parte do mundo, a pobreza e o difícil acesso ao sistema de saúde impedem essa melhora⁽¹⁾.

Esses dados epidemiológicos demonstram com consistência que o câncer de mama tornou-se um problema de âmbito mundial (Figuras 2 e 3). Assim, todos os esforços empreendidos em pesquisas que resultem em um melhor entendimento de seus aspectos prognósticos auxiliarão em uma escolha mais racional entre as modalidades de tratamento disponíveis para milhares de mulheres a cada ano em todo o mundo.

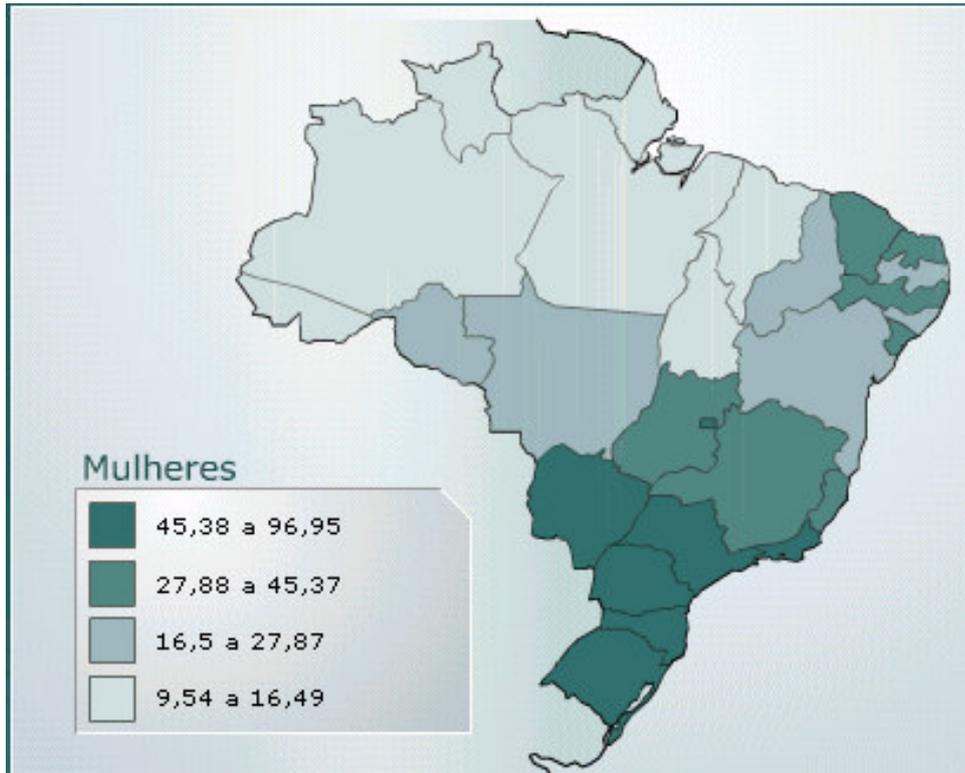


Figura 1 - Taxas brutas de incidência de câncer de mama por 100.000 mulheres brasileiras. Estimativas para 2006. INCA.

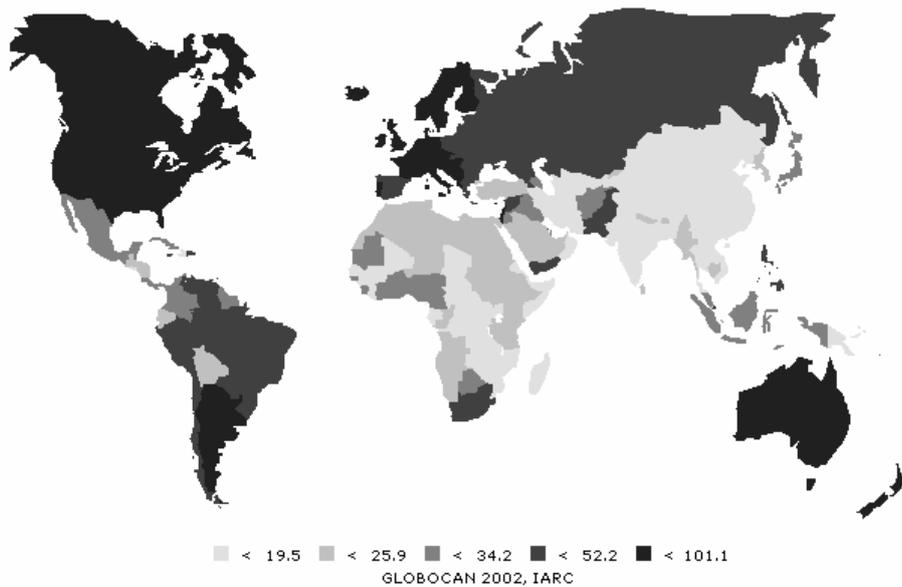


Figura 2 - Taxas de incidência anuais de câncer de mama por 100.000 mulheres. GLOBOCAN 2002, IARC.

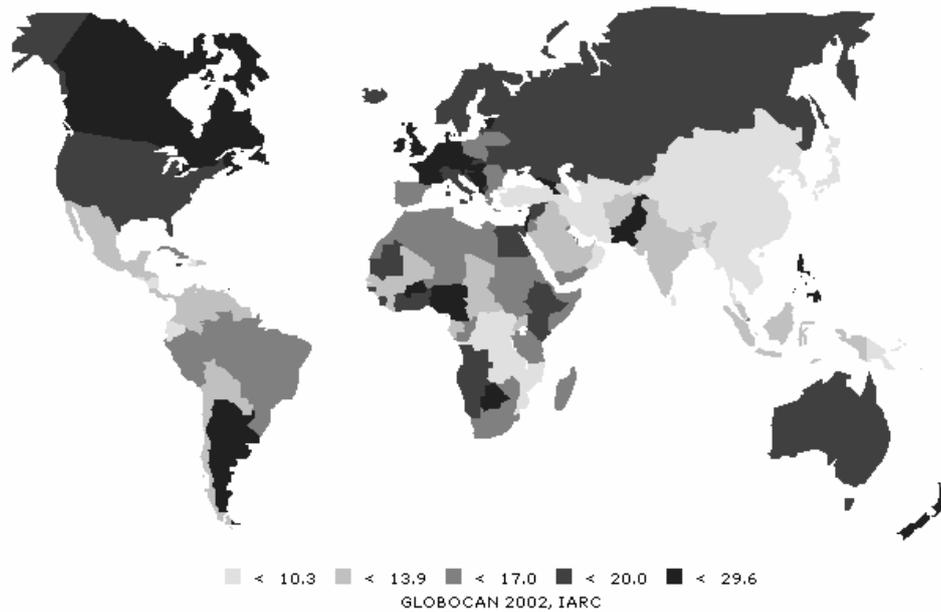


Figura 3 - Taxas de mortalidade anuais por câncer de mama por 100.000 mulheres. GLOBOCAN 2002, IARC.

2.2 Tratamento Adjuvante

No câncer de mama em estágio inicial, toda doença encontra-se restrita à mama com ou sem envolvimento de linfonodos regionais e é passível de ressecção cirúrgica completa. Nessa situação, apesar da remoção cirúrgica do tumor primário, microdepósitos de doença podem permanecer localmente ou em sítios distantes e, após períodos variáveis de acompanhamento, progredirem para uma recidiva clínica⁽⁵⁾.

Após a avaliação prognóstica, tratamentos adjuvantes são empregados, em certos casos, após a cirurgia, com a finalidade de controlar os microdepósitos, reduzindo a taxa de recidiva e aumentando a sobrevida das pacientes tratadas⁽⁵⁾. As principais modalidades terapêuticas adjuvantes em câncer de mama são: hormonioterapia, quimioterapia, o anticorpo monoclonal trastuzumabe e radioterapia.

2.2.1 Hormonioterapia Adjuvante

A decisão de recomendar tratamento hormonal adjuvante deve ser baseada na presença de receptores hormonais, avaliada por imunohistoquímica do tecido do câncer de mama. Casos com tecido tumoral insuficiente para determinação de receptores hormonais devem ser considerados positivos, principalmente em pacientes pós-menopáusicas. O pequeno subgrupo de mulheres cujos tumores não expressam receptores de estrogênio, porém contêm receptores de progesterona também parece se beneficiar de hormonioterapia adjuvante⁽⁶⁾.

O tratamento hormonal adjuvante deve ser recomendado em todas as mulheres cujos tumores contêm receptores hormonais independentemente da idade, situação referente à menopausa, envolvimento de linfonodos axilares e tamanho tumoral⁽⁶⁾. Algumas situações podem representar exceções a essa regra: tumores menores de 0,5 cm e tumores medindo entre 0,6 e 1 cm, bem diferenciados e sem fatores desfavoráveis (alto grau nuclear ou histológico, invasão angio-linfática e superexpressão de HER2)⁽⁷⁾.

O objetivo do tratamento hormonal adjuvante é impedir que células residuais de câncer de mama recebam estimulação estrogênica. Até recentemente, o tratamento hormonal adjuvante padrão para câncer de mama era a utilização de cinco anos de tamoxifen. Os dados da mais recente meta-análise conduzida pelo *Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group* confirmam as reduções substanciais na probabilidade de recidiva, segundo câncer de mama primário e mortalidade com uso adjuvante de tamoxifen, persistentes após 15 anos de acompanhamento⁽⁵⁾. Essa meta-análise foi publicada em 2005 e incluiu dados de 194 estudos randomizados de quimioterapia ou hormonioterapia adjuvantes iniciados até 1995.

Para pacientes com câncer de mama expressando receptores estrogênicos, a alocação para cinco anos de tamoxifen reduziu a taxa de mortalidade por câncer de mama em 34 % e a de recidiva em 41 %, independentemente do uso de quimioterapia, idade, presença de receptores de progesterona e outras características tumorais. As reduções absolutas em quinze anos em recidiva e mortalidade foram de 12 e 9 %, respectivamente⁽⁵⁾. O único fator preditivo de resposta à hormonioterapia adjuvante foi a presença de receptores hormonais. Enquanto houve reduções proporcionais equivalentes de recidiva e mortalidade para câncer de mama com ou sem envolvimento axilar, as reduções absolutas foram maiores em pacientes com câncer envolvendo a axila, pelo prognóstico mais grave nesse estágio⁽⁵⁾.

A utilização de tamoxifen por cinco anos foi significativamente mais efetiva do que por períodos mais curtos, de um ou dois anos⁽⁵⁾. No entanto, não há evidências que sustentem

sua utilização além de cinco anos. Além dos dados da meta-análise, o estudo NSABP B-14, que comparou cinco versus dez anos de tamoxifen adjuvante para mulheres com câncer de mama em estágio inicial, não mostrou vantagens na utilização de tamoxifen por mais de cinco anos⁽⁸⁾.

O tamoxifen é, em geral, bem tolerado. Na meta-análise, a utilização de tamoxifen não aumentou de forma significativa a mortalidade por qualquer causa em particular e a taxa de mortalidade não relacionada a câncer de mama foi equivalente entre pacientes tratadas ou não com tamoxifen (0,8 %/ano). A utilização de tamoxifen aumentou em três vezes o risco de câncer de endométrio e reduziu em um terço a incidência de câncer de mama contralateral⁽⁵⁾.

Nos últimos anos, após os bons resultados obtidos com os inibidores da aromatase em câncer de mama metastático, uma série de estudos foi publicada testando essa classe de drogas em comparação com cinco anos de tamoxifen como tratamento hormonal adjuvante. A utilidade clínica dos inibidores da aromatase é limitada a pacientes pós-menopáusicas já que a aromatase torna-se a principal fonte de estrógenos circulantes apenas após a falência ovariana.

O primeiro desses estudos foi o ATAC *trial*, um grande estudo randomizado, duplo-cego, internacional, multicêntrico que randomizou 9366 pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama inicial ressecado para tratamento adjuvante com cinco anos de tamoxifen, cinco anos de anastrozol ou cinco anos da combinação das duas drogas⁽⁹⁾. O braço da combinação foi semelhante ao braço do tamoxifen com relação a todos os desfechos. O tratamento com anastrozol associou-se a uma sobrevida livre de doença significativamente prolongada em relação ao tamoxifen. Não houve vantagem com relação à sobrevida geral até o momento da última publicação dos resultados (seguimento mediano de 68 meses)⁽¹⁰⁾. O anastrozol também foi melhor tolerado do que o tamoxifen com relação a câncer de endométrio, sangramento vaginal, eventos cérebro-vasculares e tromboembólicos venosos e fogachos. No entanto, o anastrozol foi associado com maior número de desordens músculo-esqueléticas e fraturas⁽¹⁰⁾.

Além do estudo ATAC que comparou anastrozol com tamoxifen desde o início da adjuvância, dois estudos avaliaram o impacto da troca para esse inibidor da aromatase após dois a três anos de tamoxifen adjuvante^(11,12). No estudo ITA, que avaliou 448 pacientes, a troca para anastrozol associou-se com maior sobrevida livre de eventos e sobrevida livre de recidiva. Não houve diferença significativa com relação à sobrevida geral. O anastrozol associou-se com maior taxa de eventos adversos, mas não houve diferença na taxa de eventos adversos sérios entre os grupos⁽¹¹⁾. Da mesma forma, em uma compilação de dois estudos randomizados ABCSG 8 e ARNO 95, houve uma redução de 40 % na taxa de eventos

(metástases à distância ou locais e câncer de mama contra-lateral) em pacientes alocadas para a troca para o inibidor da aromatase⁽¹²⁾. Nesse estudo, pacientes que receberam anastrozol apresentaram uma maior incidência de fraturas e menor ocorrência de eventos trombóticos do que pacientes tratadas apenas com tamoxifen⁽¹²⁾.

O estudo BIG 1-98 randomizou, entre 1998 e 2003, 8028 pacientes para tratamento hormonal adjuvante com cinco anos de letrozol, cinco anos de tamoxifen, dois anos de letrozol seguidos de três anos de tamoxifen ou dois anos de tamoxifen seguidos de três anos de letrozol. Na última atualização dos resultados publicada recentemente, a evolução de 4922 pacientes randomizadas para monoterapia com tamoxifen ou letrozol é comparada após um seguimento mediano de 51 meses. Houve uma redução significativa de 18 % na taxa de eventos relacionados à sobrevida livre de doença em pacientes tratadas com letrozol⁽¹³⁾.

O objetivo do estudo NCIC CTG MA.17 foi comparar a evolução de 5187 pacientes pós-menopáusicas tratadas com cinco anos adicionais de letrozol ou placebo após encerrar a adjuvância hormonal com cinco anos de tamoxifen. Esse estudo foi interrompido precocemente na primeira análise interina, por recomendação do comitê independente de monitorização dos dados, por uma diferença altamente significativa em favor do letrozol na sobrevida livre de doença. Após um seguimento mediano de 2,4 anos, 207 eventos (recidivas locais ou à distância ou câncer de mama contralateral) havia ocorrido; 75 no grupo tratado com letrozol e 132 no grupo tratado com placebo. As sobrevidas livres de doença estimadas em 4 anos foram 93 % para o letrozol e 87 % para o placebo ($p < 0,001$). Não houve diferença na sobrevida geral entre os braços⁽¹⁴⁾. Em uma atualização dos resultados publicada após 30 meses de seguimento mediano, mantiveram-se a vantagem com relação à sobrevida livre de doença para o braço alocado para o tratamento com letrozol ($HR = 0,58$) e a equivalência para sobrevida geral nos dois grupos de tratamento⁽¹⁵⁾. No entanto, em uma análise de subgrupo planejada, houve melhora da sobrevida geral nas pacientes tratadas com letrozol, que apresentavam câncer de mama com envolvimento axilar⁽¹⁵⁾.

O tratamento com letrozol foi, em geral, bem tolerado. A maioria dos eventos adversos relatados foi de grau 1 ou 2. O letrozol associou-se com maior incidência de fogachos (58 % x 54 %), artralguas (25 % x 21 %), mialgias (15 % x 12 %), anorexia (6 % x 4 %) e alopecia (5 % x 3 %). Por outro lado, sangramento vaginal foi mais comum com placebo (6 % x 8 %). A ocorrência de novos diagnósticos de osteoporose relatados pelas pacientes diferiu significativamente entre os grupos nessa atualização dos resultados (8,1 % para o grupo tratado com letrozol e 6 % para o tratado com placebo). A incidência de fraturas foi similar⁽¹⁵⁾.

Um grande estudo de tratamento hormonal adjuvante em pacientes pós-menopáusicas com exemestane também já foi publicado. Nesse estudo, comparou-se, após a utilização de 2 a 3 anos de tamoxifen adjuvante, a troca para o inibidor da aromatase exemestane ou a manutenção do tamoxifen até o final dos 5 anos pretendidos de adjuvância. Como no estudo anterior, a troca para inibidor da aromatase resultou em uma redução de 32 % no risco de recidiva ou câncer de mama contralateral em um seguimento mediano de 30 meses⁽¹⁶⁾. Na atualização desses resultados publicada recentemente, manteve-se a vantagem em sobrevida livre de doença favorecendo o tratamento com exemestane, após um seguimento mediano de 55 meses⁽¹⁷⁾.

O exemestane foi associado com maior incidência de artralguas e diarreia, mas sintomas ginecológicos, eventos tromboembólicos, sangramento vaginal e câimbras foram mais comuns com tamoxifen^(16,17). Fraturas foram relatadas mais frequentemente no grupo do exemestane do que no grupo do tamoxifen (4,3 % x 3,1 %; p =0,03)⁽¹⁷⁾. A incidência de osteoporose também variou discretamente entre os grupos, sendo 7,3 % nas pacientes tratadas com exemestane e 5,5 % naquelas tratadas com tamoxifen (p=0,01)⁽¹⁷⁾.

Os resultados desses estudos motivaram a *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) a publicar um novo conjunto de recomendações a respeito do uso de inibidores da aromatase como tratamento hormonal adjuvante de pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama expressando receptores hormonais em janeiro de 2005. Segundo a ASCO, o tratamento adjuvante de pacientes pós-menopáusicas com câncer de mama expressando receptores hormonais deve incluir um inibidor da aromatase para reduzir o risco de recidiva tumoral. Porém, nem o momento, nem a duração de uso do inibidor da aromatase estão atualmente claramente definidos. Os inibidores da aromatase são considerados um tratamento inicial apropriado para todas as pacientes com contra-indicações ao uso de tamoxifen. Para as demais, opções incluem cinco anos de inibidor da aromatase ou tratamento seqüencial, consistindo de tamoxifen (por 2 a 3 anos ou por 5 anos) seguido de inibidor da aromatase por 2 a 3 anos ou por 5 anos. Pacientes que não toleram inibidores da aromatase devem receber tamoxifen. A ASCO destaca que o perfil de efeitos colaterais dos inibidores da aromatase e do tamoxifen difere e que os efeitos colaterais em longo prazo dos inibidores da aromatase, principalmente sobre massa óssea, ainda não estão completamente caracterizados⁽¹⁸⁾.

2.2.2 Quimioterapia adjuvante

Os benefícios da quimioterapia adjuvante para câncer de mama encontram-se definitivamente estabelecidos. Segundo a meta-análise de Oxford publicada em 2005, a utilização de poliquimioterapia baseada em antraciclinas, com seis meses de duração, reduz a taxa de mortalidade por câncer de mama em 38 % e 20 % em pacientes com menos de 50 anos e em pacientes entre 50 e 70 anos, respectivamente. A idade da paciente ao diagnóstico foi o único fator preditivo de resposta à quimioterapia adjuvante. As reduções proporcionais em recidiva e mortalidade foram equivalentes na população de pacientes estudada independentemente da presença de receptores hormonais, utilização de tamoxifen, envolvimento axilar e outras características tumorais⁽⁵⁾.

A meta-análise também confirmou a superioridade de combinações de drogas em relação à quimioterapia com uma única droga, que quatro a seis meses de um mesmo regime produz os melhores resultados e que, para pacientes com câncer de mama expressando receptores hormonais, a utilização seqüencial de quimioterapia seguida de hormonioterapia fornece efeitos terapêuticos aditivos⁽⁵⁾. A utilização de quimioterapia baseada em antraciclinas comparativamente com o regime CMF (ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluorouracil) associou-se a uma vantagem moderada, mas altamente significativa (redução adicional de 11 % na taxa de recidiva e de 16 % na taxa de mortalidade)⁽⁵⁾.

Apesar dos benefícios demonstrados, tratamentos quimioterápicos associam-se também com um risco definido de morbidade e mortalidade. Portanto, a decisão clínica de administrar quimioterapia adjuvante a uma paciente com câncer de mama ressecado deve considerar suas características prognósticas e comorbidades que podem aumentar os riscos do tratamento.

Segundo as diretrizes do *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN)⁽⁷⁾, podem ser dispensados da realização de quimioterapia adjuvante certos subgrupos de pacientes de prognóstico reconhecidamente melhor:

- Pacientes com câncer de mama contendo receptores hormonais, sem envolvimento axilar e medida tumoral de menos de 0,5 cm ou entre 0,6 e 1 centímetro e bem diferenciado;
- Pacientes com câncer de mama sem expressão de receptores hormonais, sem envolvimento axilar e medida tumoral de menos de 0,5 cm;

- Pacientes com câncer de mama de tipos histológicos favoráveis (tubular ou colóide), sem envolvimento axilar e medida tumoral de menos de 1 cm.

Segundo as mesmas diretrizes, em certos subgrupos de pacientes, a realização de quimioterapia adjuvante é considerada opcional:

- Pacientes com câncer de mama, contendo receptores hormonais, sem envolvimento axilar e medida tumoral ente 0,6 e 1 cm, moderadamente ou pobremente diferenciado ou associado a fatores desfavoráveis;
- Pacientes com câncer de mama, sem expressão de receptores hormonais e sem envolvimento axilar, com medida tumoral entre 0,6 e 1 cm;
- Pacientes com câncer de mama, de tipos histológicos favoráveis (tubular ou colóide), sem envolvimento axilar e com medida tumoral ente 1 e 2,9 cm.

Resumidamente, é prática aceita administrar quimioterapia adjuvante a todas as pacientes com câncer de mama com envolvimento axilar e tumores com medida superior a 1 centímetro. Para mulheres com tumor inferior a 1 cm e sem envolvimento axilar, essa decisão deve ser individualizada⁽⁶⁾.

Vale destacar que há dados limitados sobre a utilização de quimioterapia adjuvante em pacientes com idade superior a setenta anos, pelo baixo número de pacientes dessa faixa etária incluso em estudos clínicos randomizados. Nessa população, devem ser especialmente considerados o risco maior de toxicidade relacionada ao tratamento e a presença de comorbidades e maior taxa de mortes não relacionadas a câncer de mama, que reduz o impacto absoluto das modalidades terapêuticas adjuvantes em pacientes idosas⁽⁶⁾.

Várias estratégias para otimizar os resultados obtidos com a quimioterapia adjuvante já foram estudadas. Na última década, mais de uma dúzia de estudos avaliando o papel do escalonamento de dose e de quimioterapia de alta dose seguida de suporte com células-tronco hematopoiéticas autólogas foram conduzidos. Estes estudos indicaram que enquanto doses menores do que as doses plenas padrão foram menos efetivas, aumentos de dose com suporte de fatores de crescimento ou células-tronco não aumentaram a sobrevida geral e foram associados com morbidade substancialmente mais alta e uma incidência baixa, mas real, de mortalidade relacionada ao tratamento⁽¹⁹⁾. No entanto, as tentativas de utilizar dose densa em quimioterapia adjuvante de câncer de mama têm alcançado resultados positivos. Por exemplo, o estudo CALGB 9741 randomizou cerca de 2000 pacientes com câncer de mama axila-

positiva para a utilização concomitante de AC seguido de paclitaxel ou a utilização seqüencial de adriamicina, ciclofosfamida e paclitaxel e adicionalmente para o uso da quimioterapia a cada três ou a cada duas semanas (dose densa), com o suporte de fatores de crescimento. Não houve diferença entre o tratamento concomitante e o seqüencial, mas a quimioterapia em dose densa resultou em vantagem significativa para sobrevida livre de doença (Hazard ratio = 0,74) e sobrevida geral (HR 0,69)⁽²⁰⁾.

Após resultados favoráveis obtidos no tratamento do câncer de mama metastático, uma série de estudos comprovou o benefício da adição de uma nova classe de drogas, os taxanos, no tratamento quimioterápico adjuvante de pacientes com câncer de mama comprometendo a axila.

O primeiro desses estudos foi conduzido pelo *Cancer and Leukemia Group B* (CALGB) e é denominado CALGB 9344. Nesse estudo, após o tratamento cirúrgico, 3.121 pacientes com câncer de mama com envolvimento axilar foram inicialmente randomizadas para receber quatro ciclos de uma combinação de ciclofosfamida na dose de 600 mg/m² com uma de três doses de adriamicina: 60, 75 ou 90 mg/m². Houve, então, uma segunda randomização para receber quatro ciclos adicionais de paclitaxel ou nenhuma quimioterapia adicional em um desenho 3x 2⁽²¹⁾.

A utilização de qualquer da três doses possíveis de adriamicina não resultou em diferenças estatisticamente significativas nos desfechos clínicos, mas o acréscimo de paclitaxel resultou em vantagem significativa com relação à sobrevida livre de doença (70 % versus 65 %; p = 0,0023) e sobrevida geral (80% versus 77%); p = 0,0064)⁽²¹⁾.

Apesar dos resultados positivos do estudo CALGB 9344, questionava-se se a melhor evolução das pacientes alocadas para paclitaxel era relacionada ao acréscimo do taxano à adjuvância ou a simples extensão da duração da quimioterapia de quatro para oito ciclos. Outro estudo de desenho similar, o NSABP B-28, demonstrou que a alocação para quatro ciclos adicionais de paclitaxel após quatro ciclos de AC resultou em vantagem estatisticamente significativa com relação à sobrevida livre de doença (76 % vs 72 % em 5 anos), mas não em sobrevida geral. Um ponto negativo desse estudo foi a utilização do tamoxifen em todas as pacientes com idade superior a cinquenta anos, independente do status dos receptores hormonais, e seu início concomitante com o início da quimioterapia⁽²²⁾.

No estudo BCIRG001, 1491 pacientes com câncer de mama com envolvimento axilar foram randomizadas para dois regimes de quimioterapia de mesma duração: seis ciclos de Docetaxel, Adriamicina e Ciclofosfamida (TAC) ou seis ciclos de 5-Fluorouracil, Adriamicina e Ciclofosfamida (FAC). Após um seguimento mediano de 55 meses, houve uma

redução de 28 % no risco de recidiva (75 % versus 68 % de sobrevida livre de doença; $p = 0,001$) e de 30 % no risco de mortalidade (87 % versus 81 % de sobrevida geral; $p = 0,008$) nas pacientes randomizadas para o tratamento com TAC. Esse benefício terapêutico ocorreu às custas de toxicidade aumentada, especialmente neutropenia febril, que ocorreu dez vezes mais frequentemente nas pacientes tratadas com TAC. No entanto, não houve diferença significativa no número de mortes relacionadas ao tratamento entre os dois braços⁽²³⁾.

O estudo PACS 01 comparou seis ciclos do regime FEC (Fluorouracil, Epirrubicina e Ciclofosfamida) com tratamento seqüencial consistindo de três ciclos de FEC seguidos de três ciclos de docetaxel em pacientes com câncer de mama com comprometimento axilar. O tratamento seqüencial resultou em prolongamento significativo da sobrevida livre de doença (73,2 % vs 78,4 % em 5 anos) e da sobrevida geral (86,7 % vs 90,7 %) ⁽²⁴⁾.

2.2.3 Trastuzumabe Adjuvante

Cerca de vinte por cento dos cânceres de mama apresentam superexpressão da proteína e/ou amplificação do gene Her-2, um dos membros da família dos receptores para fator de crescimento epidérmico. Esses tumores, na ausência de tratamento sistêmico, associam-se com um curso clínico particularmente agressivo. O câncer de mama HER2-positivo geralmente apresenta tamanho maior e comprometimento nodal mais freqüente e é mais comumente associado com intervalo livre de doença curto⁽²⁵⁾.

O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal direcionado contra o domínio extracelular do HER2 e representa o único tratamento com alvo molecular aprovado atualmente para câncer de mama, além dos tratamentos hormonais. Após a publicação de estudos que demonstraram maiores taxas de resposta e prolongamento da sobrevida com a utilização de trastuzumabe associado à quimioterapia em câncer de mama metastático HER2 positivo, seguiram-se estudos avaliando o trastuzumabe no cenário adjuvante⁽²⁵⁾.

O estudo *Herceptin Adjuvant* (HERA) envolveu cerca de cinco mil pacientes com câncer de mama inicial HER2 positivo que, após tratamento locorregional e quimioterapia neoadjuvante ou adjuvante, foram randomizadas para um de três braços: observação ou tratamento com trastuzumabe a cada três semanas por um ou dois anos. O esquema de quimioterapia foi decidido a critério do investigador. Cerca de 95 % das pacientes receberam antraciclinas e 25 % receberam taxanos. A inclusão de pacientes era restrita àquelas com

envolvimento de linfonodos axilares ou, em caso contrário, com tamanho tumoral superior a um centímetro (um terço do total de pacientes) ⁽²⁶⁾.

Os dados da primeira publicação, com apenas um ano de seguimento mediano, referem-se à comparação do braço da observação com o de um ano de trastuzumabe adjuvante. Os dados referentes ao braço tratado com dois anos de trastuzumabe ainda não foram publicados. Na primeira análise interina, com um tempo mediano de seguimento consideravelmente curto, uma grande vantagem com relação à sobrevida livre de doença emergiu. As pacientes tratadas com trastuzumabe apresentaram 85,8 % de sobrevida livre de doença em dois anos em comparação com 77,4 % para aquelas não tratadas ($p < 0,0001$). Os dados iniciais ainda não demonstram vantagem estatisticamente significativa com relação à sobrevida geral ⁽²⁶⁾.

Na mesma edição do *New England Journal of Medicine*, foi publicada uma análise combinada planejada de dois estudos norte-americanos de trastuzumabe adjuvante. Foram incluídas nessa análise as primeiras 1736 pacientes do estudo NSABP B31 e 1615 pacientes do estudo NCCTG N9831 randomizadas para quatro ciclos de adriamicina e ciclofosfamida (AC) seguidos de quatro ciclos de paclitaxel, com ou sem um ano adicional de trastuzumabe adjuvante iniciando concomitantemente com o paclitaxel. Com um seguimento mediano de dois anos, houve vantagem para a adição de trastuzumabe com relação à sobrevida livre de doença (redução de risco de 52 %; $p < 0,0001$) e sobrevida geral (redução de risco de 33 %; $p = 0,015$) ⁽²⁷⁾.

As principais diferenças com relação ao estudo HERA referem-se a administração concomitante de quimioterapia e trastuzumabe, a inclusão de um número menor de pacientes sem envolvimento axilar (6 % do total) e a utilização de taxanos em todas as pacientes tratadas. Em ambos estudos, a principal toxicidade relacionada ao uso de trastuzumabe foi o desenvolvimento de insuficiência cardíaca, como nos estudos em doença metastática. A insuficiência cardíaca ocorreu em classe funcional 3 ou 4 de acordo com a *New York Heart Association* em 0,5 %, 3,4 % e 2,4 % das pacientes que receberam trastuzumabe no estudo HERA, no NSABP B31 e no braço concomitante do NCCTG N9831 incluído na análise combinada, respectivamente. As diferenças em toxicidade cardíaca podem se dever ao seguimento mais curto no estudo HERA, variação ao acaso entre diferentes estudos ou maior risco associado à administração concomitante de trastuzumabe e quimioterapia ⁽²⁵⁾.

A duração ideal do tratamento com trastuzumabe ainda não está definida. Com relação a essa questão, os resultados do estudo *FinHer* são provocativos. Nesse estudo, 1010 mulheres com câncer de mama com axila comprometida ou não (nesse caso, a medida tumoral

deveria ser superior a dois centímetros e o receptor de progesterona não expresso) foram avaliadas. As pacientes foram randomizadas para receber três ciclos de docetaxel ou três ciclos de vinorelbina seguidos por três ciclos adicionais de FEC nos dois grupos. A alocação para tratamento com docetaxel resultou em vantagem estatisticamente significativa com relação à sobrevida livre de doença e um maior número de eventos adversos. Do total de 1010 pacientes, 232 apresentavam superexpressão de HER2 e foram adicionalmente randomizadas para receber ou não nove doses semanais de trastuzumabe concomitantes com a quimioterapia consistindo de docetaxel ou vinorelbina. A alocação para tratamento com trastuzumabe associou-se a uma redução significativa de 58 % na taxa de recidivas ou mortes e não houve maior incidência de desenvolvimento de insuficiência cardíaca congestiva ou reduções assintomáticas na fração de ejeção nas pacientes que receberam o anticorpo monoclonal por esse período mais curto do que nos estudos anteriores⁽²⁸⁾.

2.2.4 Radioterapia Adjuvante

Em câncer de mama inicial, variações no tratamento local que substancialmente afetam o risco de recidiva locoregional podem também afetar a mortalidade por câncer de mama em longo prazo⁽²⁹⁾. Dados da meta-análise de Oxford disponíveis para 7300 pacientes submetidas à cirurgia conservadora para câncer de mama confirmam que adicionar radioterapia (geralmente apenas à mama conservada) reduz as taxas de recidiva local em cinco anos de 26 % para 7 %, com conseqüente impacto no risco de mortalidade por câncer de mama em quinze anos, que diminui de 35,9 % para 30,5 %⁽²⁹⁾. Talvez a radioterapia possa ser desnecessária em pacientes idosas (com idade superior a setenta anos) após cirurgia conservadora da mama para um tumor primário de dimensões reduzidas e expressando receptores hormonais, desde que a paciente seja tratada de forma adjuvante com tamoxifen⁽¹⁾.

A meta-análise também incluiu dados de 8500 pacientes submetidas à mastectomia com esvaziamento axilar, diagnosticadas com câncer de mama envolvendo a axila, que foram randomizadas ou não para receber radioterapia pós-operatória (geralmente a parede torácica e linfonodos regionais). A adição de radioterapia resultou em ganhos similares nessa situação: redução da taxa de recidiva local de 23 % para 6 % e do risco de mortalidade por câncer de mama em quinze anos de 60,1 % para 54,7 %⁽²⁹⁾.

De acordo, as diretrizes do NCCN recomendam a realização de radioterapia pós-operatória sempre que houver opção por cirurgia conservadora da mama ou após a mastectomia com esvaziamento axilar que resulte em mais de quatro linfonodos axilares comprometidos, medida tumoral superior a cinco centímetros ou margens comprometidas. Considera-se a radioterapia pós-operatória opcional para pacientes submetidas a mastectomia que resulte em entre um a três linfonodos comprometidos ou tumor ressecado com margens exíguas⁽⁷⁾.

A radioterapia pós-operatória pode ser empregada concomitantemente à quimioterapia com o esquema CMF, mas não com esquemas baseados em antraciclina e taxanos, sob o risco de aumentar a toxicidade induzida pela radioterapia em tecidos normais. Tamoxifen e radioterapia podem ser empregados concomitantemente sem alteração da eficácia ou aumento da toxicidade do tratamento⁽¹⁾.

2.3 Avaliação Prognóstica e Perfil Molecular do Câncer de Mama

O principal papel da avaliação prognóstica em câncer de mama é determinar se certas pacientes devem ser selecionadas para receber (ou não receber) tratamentos adjuvantes após remoção cirúrgica do tumor primário, com a intenção de reduzir o risco de recidiva.

Os fatores prognósticos são medidas disponíveis no diagnóstico ou no momento da cirurgia que, na ausência de tratamento adjuvante, associam-se com taxa de recidiva, taxa de mortalidade ou outra evolução clínica. Os fatores preditivos são medidas associadas com o grau de resposta a um tratamento específico⁽⁶⁾. Os fatores prognósticos e preditivos em câncer de mama podem ser agrupados em três categorias: 1) características dos pacientes, que independem da doença, como a idade; 2) características da doença, como tamanho tumoral e tipo histológico e 3) biomarcadores⁽⁶⁾. Atualmente, a seleção do tratamento adjuvante sistêmico é baseada predominantemente em fatores clínicos e histológicos. Os únicos biomarcadores incorporados no algoritmo de decisões sobre adjuvância em pacientes com câncer de mama inicial são os receptores hormonais, avaliados usualmente por imunohistoquímica, e a superexpressão da proteína HER2 e/ou amplificação desse gene, avaliada respectivamente por imunohistoquímica e hibridização fluorescente in situ (FISH).

Os fatores prognósticos e preditivos aceitos incluem idade, tamanho tumoral, envolvimento de linfonodos axilares, tipo histológico, grau patológico e presença de receptores hormonais, segundo o consenso do *National Institute of Health* (NIH) elaborado em 2000⁽⁶⁾. Dentre estes, o fator mais relevante para a estimativa de recidiva é a presença de comprometimento axilar⁽¹⁾. Segundo esse consenso, hormonioterapia adjuvante deve ser empregada a todas as pacientes com tumor expressando receptores hormonais e quimioterapia adjuvante deve ser restrita às pacientes com tumor envolvendo a axila ou com diâmetro superior a um centímetro⁽⁶⁾.

Para guiar os oncologistas clínicos nas decisões sobre manejo adjuvante em câncer de mama, um painel internacional de especialistas reúne-se periodicamente durante a conferência internacional de *St Gallen* e propõe critérios que dividem as pacientes com câncer de mama em subgrupos de risco distinto. Na última conferência em 2005, foi definido que o principal fator a ser considerado na decisão sobre adjuvância é a responsividade potencial do tumor mamário ao tratamento endócrino, determinada principalmente pelo nível de expressão dos receptores hormonais⁽¹⁾.

O painel definiu também grupos de risco de acordo com características prognósticas estabelecidas, excetuando a presença de receptores hormonais que foi abordada separadamente:

- Risco baixo: sem envolvimento axilar e com todos os seguintes: grau 1, diâmetro tumoral inferior a dois centímetros, ausência de superexpressão ou amplificação do HER2, ausência de invasão vascular e idade superior a 35 anos;
- Risco intermediário: axila negativa e pelo menos um dos seguintes: diâmetro tumoral superior a dois centímetros, grau 2 ou 3, presença de invasão vascular, idade inferior a 35 anos, superexpressão ou amplificação do HER2 ou axila positiva (um a três linfonodos comprometidos) e ausência de superexpressão ou amplificação do HER2;
- Risco alto: axila positiva com um a três linfonodos comprometidos e superexpressão ou amplificação do HER2 ou com mais de quatro linfonodos comprometidos.

De acordo com os critérios atuais de *St Gallen*, não há definição de um subgrupo de pacientes com tumor contendo receptores hormonais que não devam ser tratadas com hormonioterapia adjuvante. Por sua vez, a quimioterapia adjuvante poderia ser dispensada em pacientes de risco baixo e em alguns casos de risco intermediário e deveria ser administrada nos demais casos⁽¹⁾.

Embora esses critérios (NIH e *St Gallen*), baseados predominantemente em fatores clínicos e histológicos, sejam fortemente prognósticos, são imperfeitos e, em muitos casos, levam a previsões inaccuradas e, conseqüentemente, decisões de manejo adjuvante inadequadas. Por exemplo, utilizando esses critérios, a quimioterapia adjuvante seria administrada a cerca de noventa por cento das pacientes jovens com tumores sem envolvimento axilar. Como setenta a oitenta por cento dessas pacientes não recidivam após a cirurgia, um grande número delas receberia quimioterapia adjuvante sem qualquer benefício terapêutico, com um risco definido de toxicidade relacionada ao tratamento⁽³⁰⁾.

Nos últimos anos, avanços tecnológicos possibilitaram o desenvolvimento de métodos que permitem a avaliação simultânea da expressão de centenas a milhares de genes em uma amostra tumoral. Dentre esses, o método mais amplamente aplicado é o arranjo de expressão de genes (*microarray*). Esse método consiste brevemente na colocação de segmentos de DNA, cada um representando um único gene, em espaços separados em um meio sólido, como uma lâmina de vidro. Posteriormente, procede-se à extração do RNA tumoral que, após

amplificação e marcação com um pigmento fluorescente, é incubado para hibridização com as seqüências de DNA complementar contidas na lâmina. Em geral, esse procedimento é realizado na presença de RNA de uma amostra controle corado com pigmento contra-fluorescente. Finalmente, os níveis de fluorescência, que representam níveis aumentados ou diminuídos de RNA para cada amostra em relação ao controle, são medidos e analisados através de técnicas estatísticas sofisticadas⁽³¹⁾.

Usando essa tecnologia, em 2000, investigadores avaliaram 65 amostras tumorais de câncer de mama para a expressão de um grupo inicial de 8102 genes humanos. As amostras foram obtidas de 42 pacientes diferentes; em vinte casos, os tumores foram amostrados duas vezes, antes e após quimioterapia neoadjuvante, e, em dois casos, as amostras do tumor primário foram pareadas com uma amostra de um linfonodo comprometido da mesma paciente. Um método de agrupamento hierárquico foi usado para agrupar genes de acordo com similaridades no seu padrão de expressão entre as amostras e para agrupar as amostras de acordo com similaridades no seu padrão de expressão gênico⁽³²⁾.

Verificou-se que amostras obtidas da mesma paciente eram sempre mais similares uma da outra do que com qualquer outra amostra. Além disso, o experimento permitiu a classificação dos tumores em subtipos de acordo com seu padrão de expressão gênica. Os subtipos foram denominados: *luminal-like*/receptor estrogênico positivo, *basal-like*, HER2-positivo e mama normal. Essa classificação molecular foi corroborada por avaliações adicionais realizadas nas amostras por imuno-histoquímica. Constatou-se a presença das citoqueratinas características de células luminais (8 e 18) e de células basais (5/6 ou 17) nos tumores classificados pelo experimento como luminais e basais, respectivamente. Adicionalmente, foi verificado que nenhum dos tumores basais expressava receptores estrogênicos e que tumores HER2-positivos demonstravam baixos níveis desses receptores⁽³²⁾.

O mesmo procedimento foi aplicado em um estudo subsequente em uma amostra maior de pacientes e correlacionado com dados de evolução clínica. A principal diferença foi a divisão adicional do subtipo luminal /receptor estrogênico positivo em três subgrupos: luminal A, B e C (Figura 4). A classificação das pacientes de acordo com o perfil de expressão gênica identificou populações com evoluções clínicas distintas: o subgrupo luminal A apresentava os melhores resultados; os subtipos luminal B e C e o mama normal, resultados intermediários e os subtipos *basal-like* e HER2-positivo, os piores desfechos (Figura 5)⁽³³⁾.

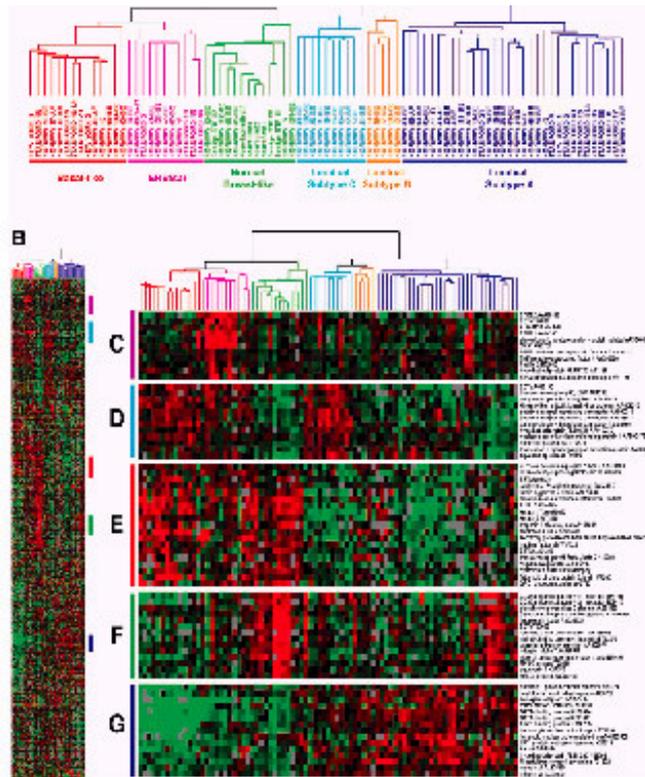


Figura 4 - Subtipos de câncer de mama definidos de acordo com arranjo de expressão de genes.
Sorlie, T; et al. Proc Natl Acad Sci 2001; 98:10869.

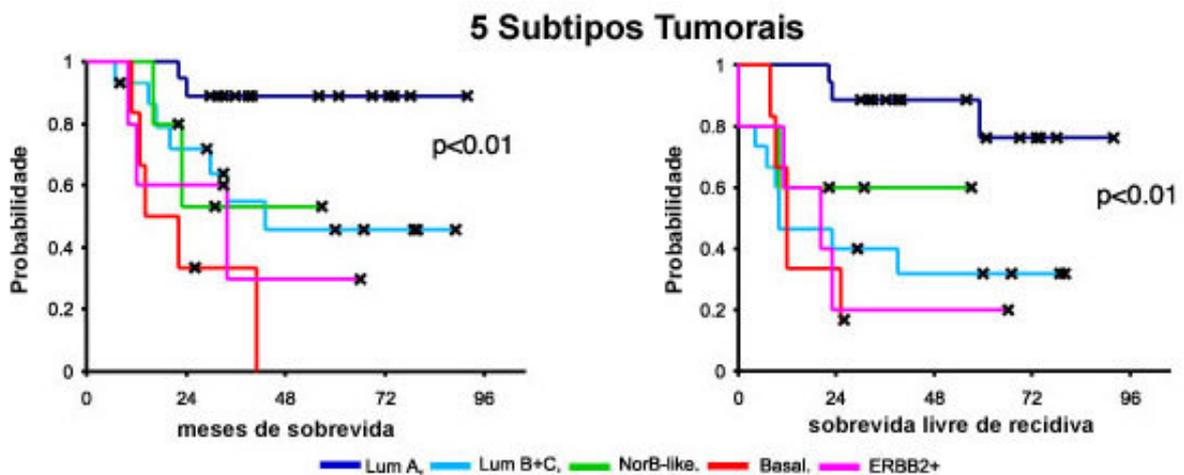


Figura 5 - Probabilidade de sobrevida geral e sobrevida livre de doença conforme o subtipo molecular definido por arranjo de expressão de genes.
Sorlie, T; et al. Proc Natl Acad Sci USA 2001; 98: 10869-10874.

Em 2002, um outro grupo de pesquisadores utilizou o *microarray* de genes em amostras tumorais de 78 pacientes jovens com tumores sem envolvimento axilar para buscar

definir um grupo de genes cuja expressão pudesse discernir pacientes de prognóstico bom e ruim. De um número inicial de cinco mil genes obtidos pelo método de agrupamento hierárquico não supervisionado, foram selecionados os setenta genes com correlação prognóstica mais forte, através de um método de classificação supervisionada⁽³⁴⁾.

De acordo com o padrão de expressão dos setenta genes, foi possível definir nos tumores uma assinatura gênica de prognóstico bom ou ruim. Essa avaliação estabeleceu corretamente a evolução clínica da paciente em 83 % dos casos. Pacientes com uma assinatura gênica de prognóstico ruim apresentavam uma chance quinze vezes maior de desenvolver metástases nos cinco primeiros anos de acompanhamento do que as pacientes com assinatura de bom prognóstico. Os autores também compararam favoravelmente a capacidade preditiva desse método com os critérios clínicos válidos naquele momento (NIH e St Gallen de 2001). A aplicação do preditor molecular resultaria em um número equivalente de pacientes que receberia corretamente a indicação de quimioterapia adjuvante e em um número substancialmente menor de pacientes tratadas com quimioterapia adjuvante sem benefício terapêutico⁽³⁴⁾.

O mesmo grupo validou posteriormente esse grupo de setenta genes em uma amostra maior de 295 pacientes jovens com câncer de mama inicial, com ou sem envolvimento axilar. A acurácia preditiva do método foi similar nessa amostra. O padrão de expressão gênica foi a característica mais fortemente associada com o prognóstico das pacientes⁽³⁰⁾. O perfil prognóstico molecular correlacionou-se significativamente com o grau histológico, presença ou ausência de receptores hormonais e idade, mas não com o diâmetro tumoral, número de linfonodos positivos ou modalidades terapêuticas empregadas⁽³⁰⁾.

Esses dados sugerem que a habilidade de metastatizar para sítios distantes é uma propriedade genética precoce e inerente de certos tumores de mama⁽³⁰⁾. Os dados que ora avaliamos relacionados ao estágio tumoral têm provavelmente relação com o tempo de desenvolvimento do tumor antes do diagnóstico, mas nem sempre refletem com acurácia seu potencial metastático, fundamentalmente relacionado com seu padrão de expressão gênica.

O *microarray* de genes ainda não se encontra incorporado na rotina clínica de avaliação das pacientes com câncer de mama. Para que isso ocorra, há necessidade de validação prospectiva mais extensa do método e de desenvolvimento de um controle de qualidade rigoroso, que permita reprodutibilidade das avaliações nos diferentes centros⁽³¹⁾. Além disso, atualmente, a técnica de *microarray* de genes é consideravelmente cara e disponível em poucos centros no mundo.

A possibilidade de utilizar metodologias mais acessíveis para identificar os subtipos moleculares definidos pelo *microarray* de genes é bastante interessante. Dentre os subtipos descritos, o *basal-like* ou triplo-negativo (receptores de estrógeno e progesterona e HER2 negativos) representa um desafio terapêutico para o oncologista clínico. Sua evolução costuma ser desfavorável e além da quimioterapia adjuvante, outras modalidades terapêuticas sistêmicas não podem ser empregadas, já que os benefícios da hormonioterapia e transtuzumabe adjuvantes dependem respectivamente da presença de receptores hormonais e HER2 superexpresso.

A identificação do subtipo *basal-like* no diagnóstico poderia levar à opção por esquemas de quimioterapia adjuvantes mais agressivos tentando reduzir o alto risco de recidiva dessas pacientes. Além disso, o conhecimento mais detalhado dos aspectos clínicos e biológicos dos tumores basais pode propiciar o desenvolvimento de novas classes de drogas efetivas nesse subtipo ou demonstrar que drogas já conhecidas podem ser úteis no tratamento de tumores basais.

2.4 Câncer de Mama *Basal-like* ou Triplo-negativo

O subtipo *basal-like* de câncer de mama recebeu essa denominação porque seu padrão de expressão gênica é semelhante ao do componente de células epiteliais basais normais da mama. Essas similaridades incluem ausência de expressão do receptor de estrógeno e genes relacionados e expressão de citoqueratinas 5/6 e 17⁽³⁵⁾. Tumores *basais-like* também são chamados de triplo-negativos porque, além da negatividade para receptores hormonais (RE e RP), tipicamente têm baixa expressão de HER2⁽³⁵⁾. O fenótipo triplo-negativo é razoavelmente acurado na identificação do subtipo *basal-like* de câncer de mama, mas essa predição não é perfeita; cerca de 80 % dos tumores que não expressam RE e HER2 são, de fato, *basais-like*⁽³⁶⁾.

Diferentes definições de câncer de mama *basal-like* a partir de resultados de imunohistoquímica já foram descritas na literatura. Em algumas séries de casos, a identificação dos tumores *basais-like* baseou-se exclusivamente na positividade das células tumorais para citoqueratinas basais, independentemente da expressão de receptores hormonais e HER2⁽³⁷⁻³⁹⁾.

Utilizando essa definição, Banerjee *et al* avaliaram uma coorte retrospectiva de 282 pacientes com câncer de mama grau 3 para a expressão de CK5/6, CK14 e CK17. Dezesete por cento dos casos foram positivos para pelo menos um dos marcadores e foram considerados ser do subtipo *basal-like*. Esse grupo foi comparado com um igual número de controles pareados para idade, comprometimento axilar e grau. Concluiu-se que os casos *basais-like* tinham significativamente menores taxas de expressão de RE, RP e HER2, além de taxa de recidiva mais alta e sobrevidas livre de doença e geral mais curtas⁽³⁸⁾.

Um grupo de investigadores no Brasil avaliou 102 casos de câncer de mama selecionados de forma a representar equitativamente os três graus histológicos(1, 2 e 3), segundo o sistema de graduação de *Scarff-Bloom e Richardson*. Cerca de 78 % dos casos foram classificados como luminais puros (CK8/18 + e CK5 -), 13 % como mistos (CK8/18 + e CK5 +) e 5 % como basais puros (CK8/18 - e CK5 +). Os autores também identificaram a expressão de p63, uma proteína de ligação ao DNA relacionada ao p53, em cerca de 15 % dos casos, freqüentemente com expressão simultânea de p63 e CK5 nas mesmas células tumorais. Houve também correlação da expressão de p63 com a presença de baixos níveis de BRCA1 nas células neoplásicas. Esses dados reforçaram o conceito de que o BRCA1 poderia representar um regulador de células progenitoras, responsável pela promoção da transição do fenótipo epitelial basal para glandular. A presença de baixos níveis de BRCA1 estimularia a expressão de p63, que poderia favorecer a proliferação das células progenitoras CK5 +, levando ao desenvolvimento de tumores *basais-like*⁽³⁷⁾.

Em outros relatos, a definição de tumor *basal-like* baseou-se na ausência de expressão de receptores hormonais e HER2, além de, em algumas séries, positividade das células tumorais para as citoqueratinas basais⁽⁴⁰⁻⁴²⁾.

Matos *et al* avaliaram 168 casos de carcinoma invasor de mama através de análises imunohistoquímicas, realizadas em *tissue microarray*. O objetivo era classificar os tumores nos subtipos basal, com superexpressão de HER2 e luminal, com base na expressão ou não pelos tumores de RE e HER2. Tumores basais eram definidos pela ausência de expressão de RE e HER2 e compreendiam 7,6 % do total de casos avaliados. Os casos foram adicionalmente avaliados para a expressão de Ki-67, P-caderina, CK 5 e p63. Os tumores basais eram mais freqüentemente de grau 3, positivos para p63, P-caderina e CK5 e com alta taxa de proliferação⁽⁴⁰⁾.

Potemski *et al* avaliaram 195 casos de câncer de mama para a expressão das citoqueratinas basais CK5/6 ou 17, que foram detectadas em 37 % das amostras. O subtipo *basal-like* foi definido pela ausência de expressão de RE e HER2, além de positividade para

CK5/6 ou 17 e perfazia 25 % dos casos. A coloração positiva para citoqueratinas basais foi associada com pior prognóstico quando comparada com pacientes negativos para citoqueratinas basais em todos os casos. Contudo, quando apenas os casos que não expressavam RE foram analisados, a expressão de CK5/6 ou 17 não manteve seu valor prognóstico. Os autores concluíram, de forma interessante, que o pior prognóstico associado com o fenótipo *basal-like* seria dependente da ausência de expressão do RE e não da expressão das citoqueratinas basais⁽⁴¹⁾.

No entanto, certamente, a definição imunohistoquímica mais precisa do subtipo *basal-like* foi descrita por Nielsen *et al* que, em 21 casos de câncer de mama *basal-like* definidos por experimentos de *microarray* de genes, avaliaram a expressão imunohistoquímica de RE, CK5/6, c-kit, HER1 e HER2, buscando identificar um perfil imunohistoquímico que se correlacionasse com o perfil de expressão gênica⁽³⁶⁾.

Do total de 21 casos de câncer de mama *basal-like*, 13 tinham coloração positiva para CK5/6, 12 para HER1 e 6 para c-kit. Dessa forma, o perfil imunohistoquímico preditivo do subtipo *basal-like* foi definido por RE negativo, HER2 negativo e CK5/6 e/ou HER1 positivo. Esse perfil foi identificado em 16 dos 21 casos, conferindo ao método uma sensibilidade de 76 % para a identificação do subtipo *basal-like*⁽³⁶⁾.

Para corroborar esses dados, os autores avaliaram a expressão imunohistoquímica dos mesmos marcadores em experimentos de *tissue microarray* em uma série de 930 casos, com tempo de seguimento mediano de 17,4 anos. A expressão de citoqueratinas basais (CK5/6 e/ou 17) associou-se significativamente com sobrevida livre de doença mais curta, quando comparada com os casos negativos. A expressão de HER1 foi identificada em 44,1 % dos casos que expressavam citoqueratinas basais. Essa percentagem foi semelhante à encontrada nos casos *basais-like* definidos por *microarray* (12 dos 21 = 57 %) e significativamente superior à identificada nos 521 casos da série negativos para citoqueratinas basais (7,9 %). No total de casos, a expressão de HER1 foi demonstrável em uma fração maior (13,4 %) do que CK17 (4,6 %), reforçando o conceito de que a inclusão do HER1 na definição de tumor *basal-like* seria melhor do que a inclusão de CK17⁽³⁶⁾.

Adicionalmente, os autores classificaram 663 amostras com resultados interpretáveis suficientes em quatro categorias de acordo com os resultados do *tissue microarray*: grupo H (HER2 positivo, ou seja, 3 + por imunohistoquímica); grupo E (HER2 negativo e RE positivo); grupo B (HER2 e RE negativos e CK5/6 e/ou HER1 positivo) e grupo N (indeterminado, ou seja, negativo para os quatro marcadores). Essa definição imunohistoquímica do câncer de mama *basal-like* não apenas se correlacionou melhor com os

casos identificados por *microarray*, mas também forneceu as diferenças mais significativas em sobrevida com relação aos outros grupos definidos pelo *tissue microarray*. O grupo B teve prognóstico significativamente pior do que o grupo E (RE negativo) e evolução similar ao grupo H (HER2 positivo)⁽³⁶⁾.

Além do perfil molecular, o câncer de mama *basal-like* também tem fatores clínicos e histológicos característicos. Tipicamente, são tumores de alto grau, com alta taxa mitótica e elevada relação núcleo/citoplasma⁽³⁹⁾. Frequentemente, há presença de uma cicatriz central, necrose tumoral, células fusiformes ou metaplasia escamosa⁽³⁹⁾.

Do ponto-de-vista clínico, é apreciável a correlação entre câncer de mama em portadoras de mutação no BRCA1 e o subtipo *basal-like*⁽⁴²⁾. Além disso, há evidências de que o fenótipo *basal-like* é mais freqüente em tumores de mama de intervalo em comparação com tumores detectados por *screening*⁽⁴³⁾. É possível, também, que o subtipo *basal-like* seja mais freqüente em mulheres negras e pré-menopáusicas, conforme demonstrou um grande estudo de base populacional, realizado no estado norte-americano Carolina do Norte⁽⁴⁴⁾.

O tratamento do câncer de mama *basal-like* é desafiador, pois este sendo tipicamente triplo-negativo não é passível de terapias-alvo, como transtuzumabe e hormonioterapia, restando apenas a quimioterapia como alternativa terapêutica adjuvante ou paliativa. O prognóstico ruim do câncer de mama *basal-like*, certamente, está em parte relacionado com este armamentário terapêutico limitado⁽³⁵⁾.

Apesar do prognóstico desfavorável, os tumores de mama *basais-like* são sensíveis à quimioterapia convencional. Em um estudo conduzido no *MD Anderson Cancer Center*, o perfil de expressão gênica de 83 tumores mamários foi determinado através de *microarray* no material de punções aspirativas realizadas antes da quimioterapia neoadjuvante com paclitaxel, fluorouracil, adriamicina e ciclofosfamida. Quarenta e cinco por cento dos casos de câncer de mama *basal-like* obtiveram resposta patológica completa ao tratamento. Essa taxa de resposta foi significativamente superior à obtida pelos tumores luminais (6 %)⁽⁴⁵⁾. Assim, o prognóstico ruim relacionado ao subtipo *basal-like* não se relaciona à resistência primária à quimioterapia convencional. Ao invés disso, está relacionado ao menor número de opções de tratamento disponíveis em tumores triplo-negativos e a biologia intrínseca desse subtipo, que apresenta uma alta taxa de recidiva quando resposta completa não é alcançada com o tratamento primário e uma evolução pior quando recidiva⁽⁴⁵⁾.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo primário

- Identificar o subtipo *basal-like* através da negatividade para RE e HER2 e positividade para citoqueratinas 5/6 e/ou EGFR em amostras tumorais de câncer de mama em estágio inicial e determinar sua frequência na coorte estudada.

3.2 Objetivos secundários

- Identificar a relação entre o subtipo basal-like e características prognósticas clínicas previamente estabelecidas: idade, comprometimento axilar e estágio tumoral;
- Determinar o subtipo molecular das amostras tumorais de acordo com os resultados da imunohistoquímica: basal-like (descrito acima); HER2-positivo (HER2 positivo); luminal (RE positivo e HER2 negativo) e indeterminado (RE, HER2, CK 5/6 e EGFR negativos);
- Identificar a relação entre o subtipo molecular de câncer de mama e a ocorrência de desfechos clínicos previamente estabelecidos: recidivas e mortes;
- Determinar se há diferença nos níveis de expressão de EGFR entre os tumores com e sem expressão de receptores hormonais e com e sem expressão de HER2.

4 PACIENTES E MÉTODOS

4.1 Delineamento

Trata-se de um estudo observacional, descritivo e analítico. Inicialmente, foi feito um estudo transversal para determinar a prevalência dos subtipos moleculares definidos por imunohistoquímica nas amostras tumorais, bem como a distribuição de características prognósticas clínicas das pacientes incluídas. Em seguida, procedeu-se um estudo de coorte retrospectivo para determinar a ocorrência dos desfechos clínicos de interesse nas pacientes. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital São Lucas da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) antes de sua execução.

4.2 Amostra

Trata-se de uma amostra de conveniência, de seleção consecutiva. Foram consideradas para esse estudo todas as pacientes submetidas à cirurgia potencialmente curativa para câncer de mama no Hospital São Lucas da PUCRS entre o período de janeiro de 1995 até dezembro de 2000, com registro do exame anátomo-patológico no Serviço de Patologia dessa instituição. As características clínicas das pacientes foram definidas a partir de uma ficha clínica preenchida durante a revisão dos prontuários. Os dados de seguimento foram obtidos através dos registros no prontuário médico das visitas de acompanhamento nos ambulatórios de oncologia e mastologia, bem como de internações hospitalares.

4.3 Critérios de Inclusão

- Sexo feminino;
- Diagnóstico histopatológico confirmado de carcinoma invasor da mama de tipo histológico ductal ou lobular;

- Estágio patológico I ou II, de acordo com o sistema TNM.

4.4 Critérios de Exclusão

- Estágio patológico III ou IV, de acordo com o sistema TNM;
- Tumores de tipos histológicos especiais, diferentes de carcinoma ductal ou lobular invasor da mama;
- Pacientes com registros médicos sem os dados epidemiológicos necessários;
- Pacientes sem nenhuma informação referente ao seu seguimento no prontuário médico ou após contato telefônico;
- Pacientes que receberam modalidades terapêuticas sistêmicas antes do tratamento cirúrgico (neoadjuvância).

4.5 Amostras Tumorais e Técnica Imunohistoquímica

Os blocos de parafina rotineiramente processados, representativos do tumor de cada uma das pacientes incluídas no estudo foram localizados nos arquivos do Serviço de Patologia do Hospital São Lucas da PUCRS. A imunohistoquímica foi realizada no Instituto de Patologia, usando o método do complexo avidina-biotina-peroxidase. Resumidamente, lâminas de 4 micrômetros de espessura foram cortadas e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com água oxigenada. A recuperação antigênica foi realizada através de banho-maria em um tampão de citrato (pH 6), exceto para o EGFR, que requereu para recuperação antigênica incubação com a enzima proteinase (para pronto-uso, sem necessidade de diluição) por cinco minutos. Os anticorpos primários foram então aplicados e permaneceram em temperatura ambiente durante a noite. Os antígenos foram detectados com um anticorpo secundário marcado com biotina e complexo ABC. Por último, as lâminas foram levemente contra-coradas com hematoxilina.

Os anticorpos primários empregados na técnica imunohistoquímica foram os anticorpos para citoqueratinas 5 e 6 (Zymed; clone D5/16B4; diluição 1:100), HER2 (Novocastra; clone 5A2; diluição 1:100) e EGFR (Zymed; clone 31G7; diluição 1:100) em

todos os casos e para receptores de estrógeno (Zymed; clone 6F113; diluição 1:100) nos casos em que esse exame não foi realizado na avaliação inicial das pacientes. A leitura e a interpretação de todas as colorações realizadas para esse estudo foram executadas por dois observadores simultaneamente, sendo um deles uma patologista mamária experiente em imunohistoquímica. Para CK5/6 e EGFR, os tumores foram considerados positivos quando havia qualquer reatividade citoplasmática e/ou membranosa em células tumorais do componente invasor. A avaliação da expressão de HER2 foi realizada de acordo com o sistema utilizado no *HercepTest* (1+, coloração incompleta das membranas, fracamente perceptível, em mais do que 10 % das células tumorais; 2+, coloração completa das membranas, fraca a moderada, em mais do que 10 % das células tumorais; 3+, coloração completa das membranas, forte, em mais do que 10 % das células tumorais)⁽⁴⁶⁾. Para os propósitos desse estudo, os tumores foram considerados positivos para HER2 apenas quando apresentavam coloração com intensidade de 3+. A avaliação da expressão do RE foi realizada de acordo com o escore descrito por Harvey *et al*, que leva em consideração tanto a proporção de células tumorais coradas, quanto a intensidade da coloração das células positivas. O escore de proporção varia de zero a cinco (zero = sem impregnação; 1 = < 1/100; 2 = 1/100 a 1/10; 3 = 1/10 a 1/3; 4 = 1/3 a 2/3 e 5 = > 2/3 das células tumorais coradas) e o escore de intensidade varia de zero a três (zero = sem impregnação; 1 = intensidade fraca; 2 = intensidade intermediária; 3 = intensidade forte). A soma dos dois escores resulta em um número que varia de zero a oito; todos os casos com o escore final de dois ou mais são considerados positivos⁽⁴⁷⁾.

4.6 Análise Estatística

Inicialmente, foi determinada a prevalência do subtipo *basal-like* na população estudada, bem como as prevalências dos demais subtipos moleculares definidos por imunohistoquímica. A seguir, foram construídas curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida geral para cada subtipo molecular, através do método de Kaplan-Meier. As curvas foram comparadas através do *log rank* teste. A relação entre o subtipo *basal-like* e as variáveis clínicas de interesse (estágio tumoral, comprometimento axilar, idade da paciente) foi estudada através do teste exato de Fisher, da mesma forma que a relação entre a expressão

de EGFR e a expressão de HER2 e RE. Em todos os casos, os testes foram bicaudais e um valor de $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

De um total de 404 casos diagnosticados no Hospital São Lucas da PUCRS entre janeiro de 1995 e dezembro de 2000, 280 foram inicialmente selecionados para revisão para o mestrado em Geriatria de Anna Cancela, que foi concluído em agosto de 2005, na PUCRS. Nessa primeira revisão, foram excluídos os casos sem dados epidemiológicos suficientes descritos nos arquivos médicos e sem acompanhamento clínico disponível. Além disso, a autora baseou-se no estadiamento clínico das pacientes e foram excluídos todos os casos com estágio clínico III ou IV.

Para o atual estudo, foram adicionalmente excluídas 29 pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante, 59 pacientes que apresentavam estágio patológico diferente de I ou II, 5 pacientes que tinham tumores de tipos histológicos especiais, uma paciente que, após revisão, não tinha dados de seguimento clínico e dez pacientes cujo exame anátomo-patológico não havia sido realizado no Serviço de Patologia do HSL da PUCRS. Dessa forma, os blocos de parafina de 176 pacientes foram procurados nos arquivos do Serviço de Patologia do HSL da PUCRS. Sempre que disponível, deu-se preferência ao bloco de parafina correspondente a *core biopsy* do tumor. Após busca exaustiva nos referidos arquivos, os blocos correspondentes a 127 casos foram localizados e encaminhados ao Instituto de Patologia para realização da técnica imunohistoquímica. Após a avaliação histológica, 15 casos adicionais foram excluídos porque não continham tumor invasor de mama nos cortes selecionados. Assim, 112 pacientes foram, de fato, incluídas na presente análise.

Dos 112 casos avaliados, 13 (11,6%) foram do subtipo *basal-like*, definidos pela negatividade para RE e HER2 e CK5/6 e/ou EGFR positivos. EGFR foi expresso em 5 dos 13 tumores *basais-like* (38, 5%) e CK5/6 em 12 dos 13 casos (92%). A idade média das pacientes ao diagnóstico foi 49 anos. Três tumores *basais-like* ocorreram em pacientes com 40 anos de idade ou menos, representando 21,4 % dos casos ocorrendo nessa faixa etária. Os dez casos restantes ocorreram em pacientes com mais de 40 anos, totalizando 11,6 % dos casos nesse grupo. Essa diferença não foi estatisticamente significativa ($p=0,207$).

Não houve correlação do subtipo *basal-like* com o status de envolvimento axilar; nove dos treze casos não apresentavam envolvimento axilar no diagnóstico (12,3 % do total de casos N0) e quatro casos apresentavam (10,3 % do total de casos N1) ($p=1,0$). Da mesma forma, não houve correlação significativa entre o subtipo *basal-like* e o estadiamento patológico. Três dos treze casos foram definidos como estágio patológico I (7,9 % dos casos

estágio I) e dez casos, como estágio patológico II (13,5 % dos casos estágio II) ($p=0,53$). Todos os casos do subtipo *basal-like* eram carcinomas ductais invasores.

Com relação aos marcadores testados, os seguintes resultados foram obtidos: 81 casos (72,3 %) foram positivos para RE (Figura 6); 13 casos (11,6 %) foram positivos para HER2 (Figura 7); 11 casos (9,8 %) expressavam EGFR (Figura 8) e 36 casos (32,1 %) expressavam CK5/6 (Figura 9). Além dos treze casos definidos como *basais-like*, 77 (68,8%) foram definidos como luminais, 13 (11,6%) como HER2-positivos e 9 (8 %) como indeterminados, pois não expressavam nenhum dos quatro marcadores testados (Tabela 1).

Tabela 1 - Descrição das principais características dos subtipos *basal-like*, luminal, HER2-positivo e indeterminado

| | Idade Média | Tipo Histológico | Estágio I/II | N0/N1 |
|-----------------------------|-------------|--------------------|--------------|-------------|
| <i>Basal-like</i> (n=13) | 49 anos | 100 % CDI | 23 % / 77% | 69 % / 31 % |
| Luminal (n=77) | 54 anos | 13 % CLI/ 87 % CDI | 34 % / 66 % | 65 % / 35 % |
| HER2-positivo (n=13) | 53 anos | 8 % CLI / 92 % CDI | 46 % / 54 % | 69 % / 31 % |
| Indeterminado (n=9) | 53 anos | 100 % CDI | 33 % / 67 % | 56 % / 44 % |

CDI = carcinoma ductal invasor

CLI = carcinoma lobular invasor

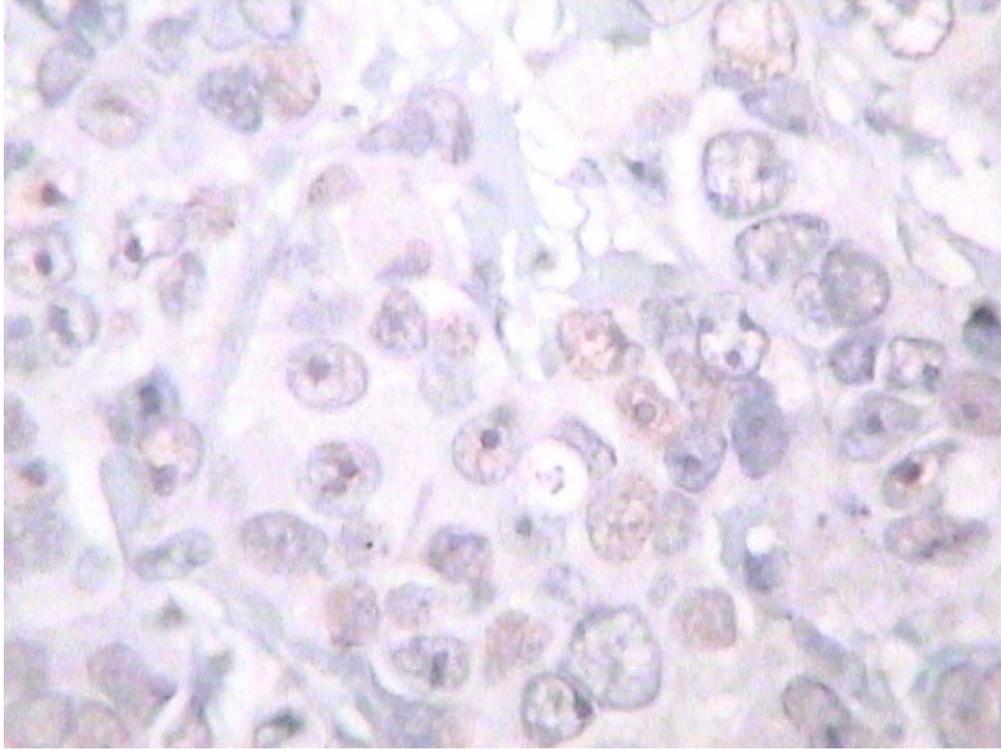


Figura 6 - Coloração positiva nuclear para RE (score Allred 8).

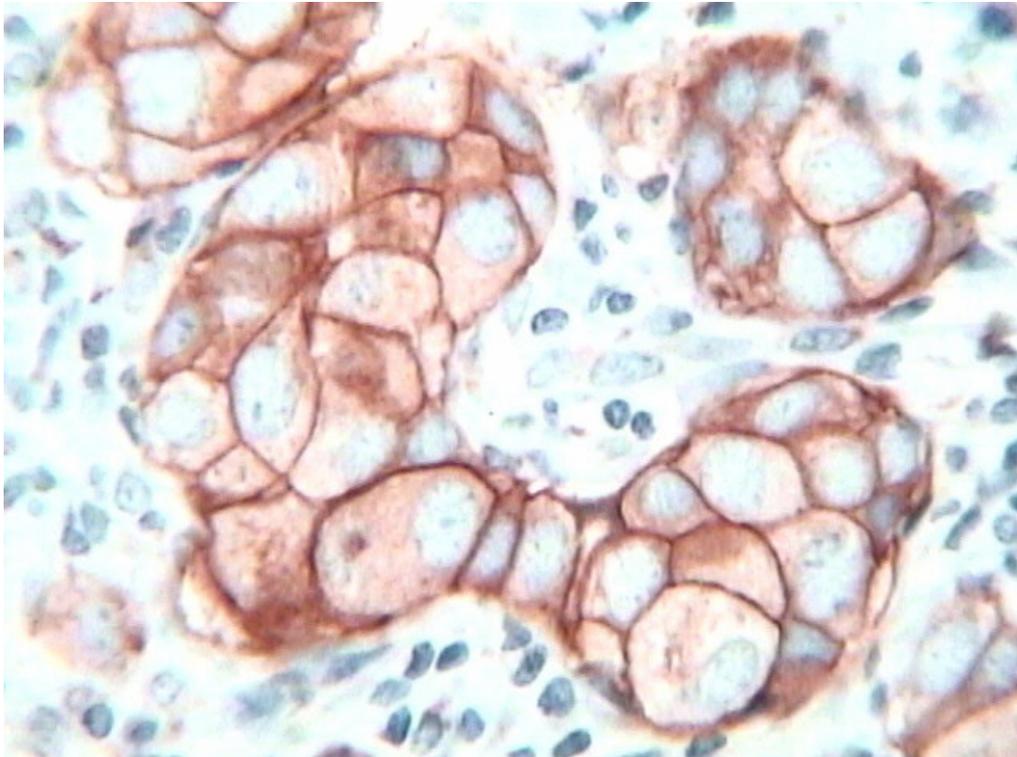


Figura 7 - Coloração positiva nas membranas celulares para HER2 (intensidade 3+).

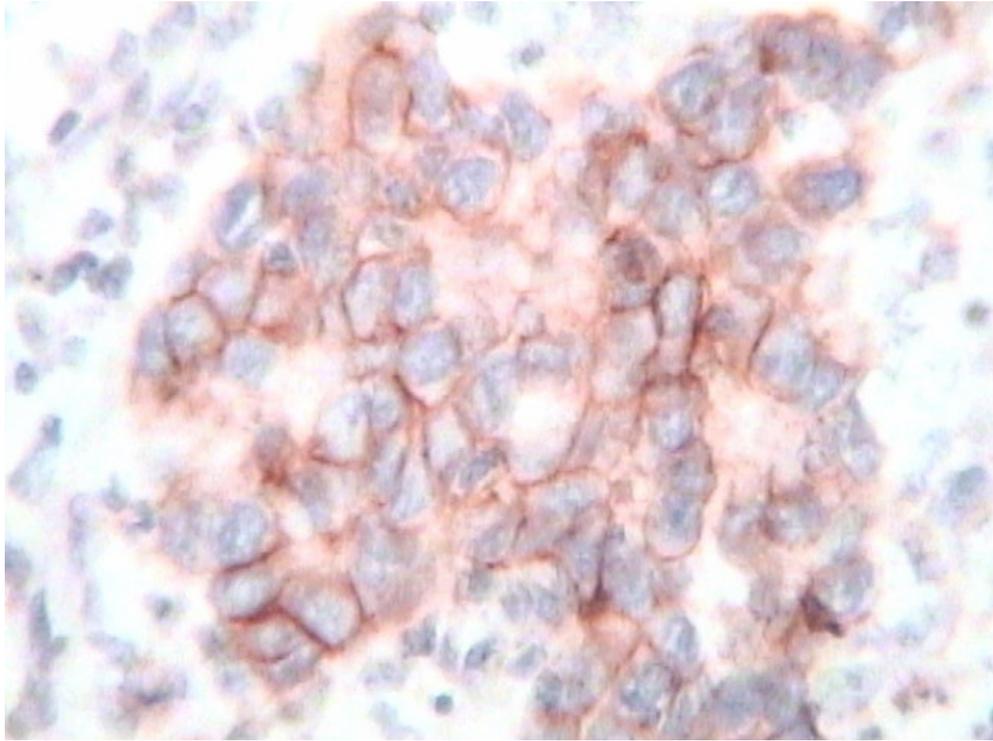


Figura 8 - Coloração positiva na membrana e citoplasma para EGFR.

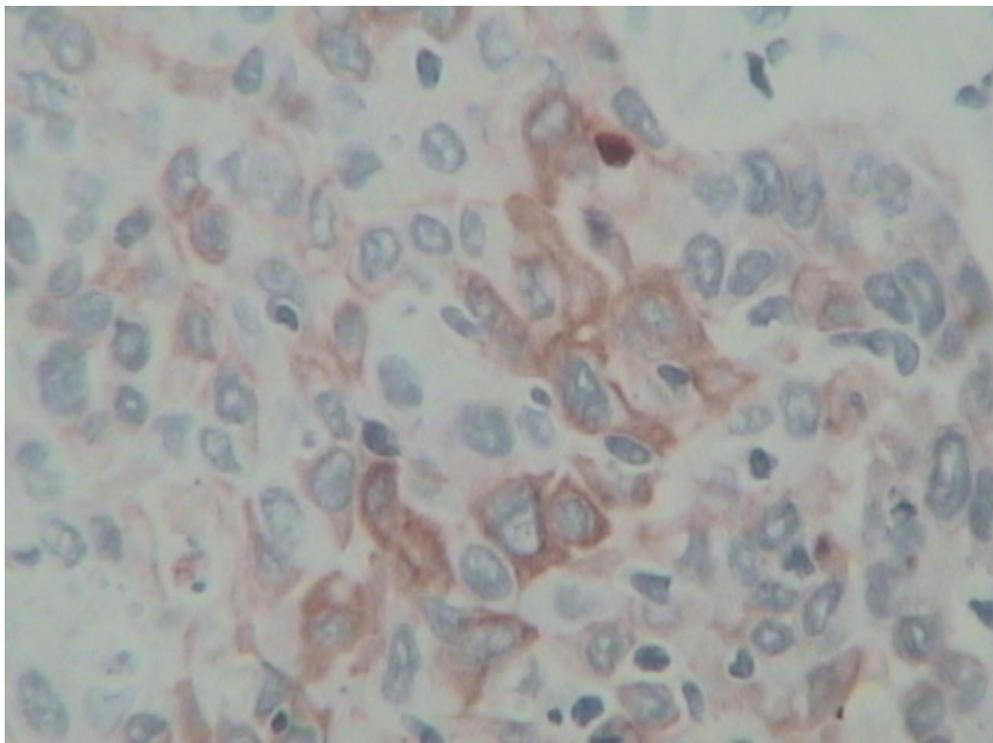


Figura 9 - Coloração positiva na membrana e citoplasma para CK 5/6.

Três dos treze casos de tumores *basais-like* apresentaram recidivas durante o período de acompanhamento (duas recidivas locais e uma recidiva sistêmica). Nesse grupo, houve uma morte relacionada a câncer de mama. No total de casos, ocorreram 26 recidivas e 12 óbitos em um período mediano de seguimento de 81 meses. Não houve diferença significativa nas curvas de sobrevida livre de doença e sobrevida geral dos subtipos *basal-like*, luminal, HER2-positivo e indeterminado (Figuras 10 e 11).

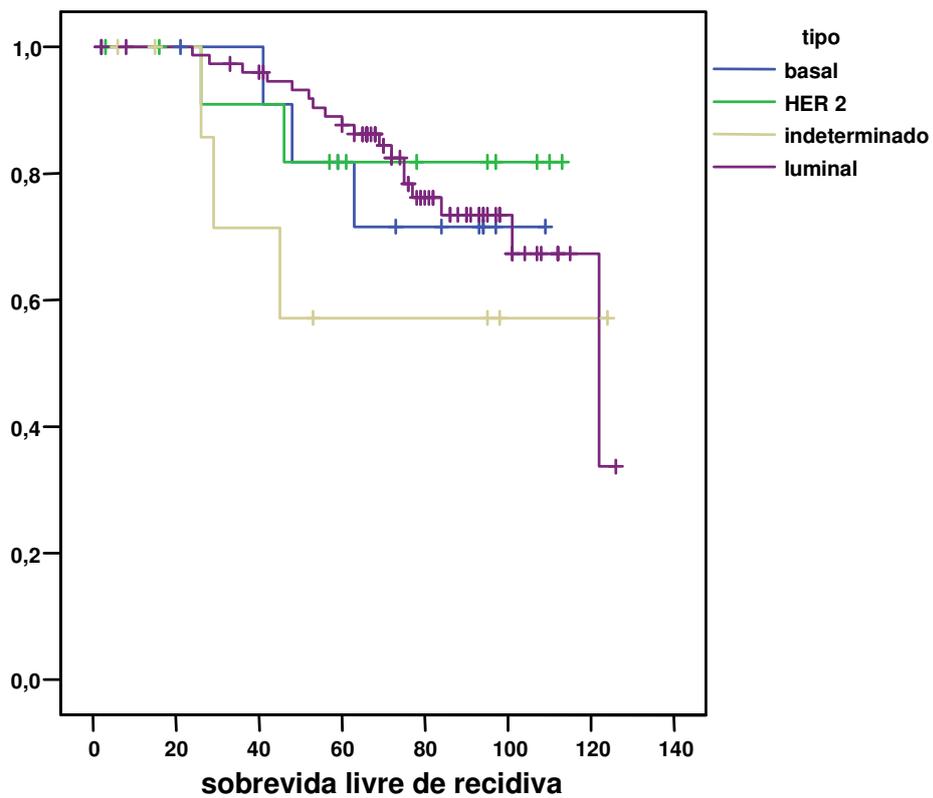


Figura 10 - Curvas de sobrevida livre de doença para os subtipos *basal-like*, luminal, HER2-positivo e indeterminado.

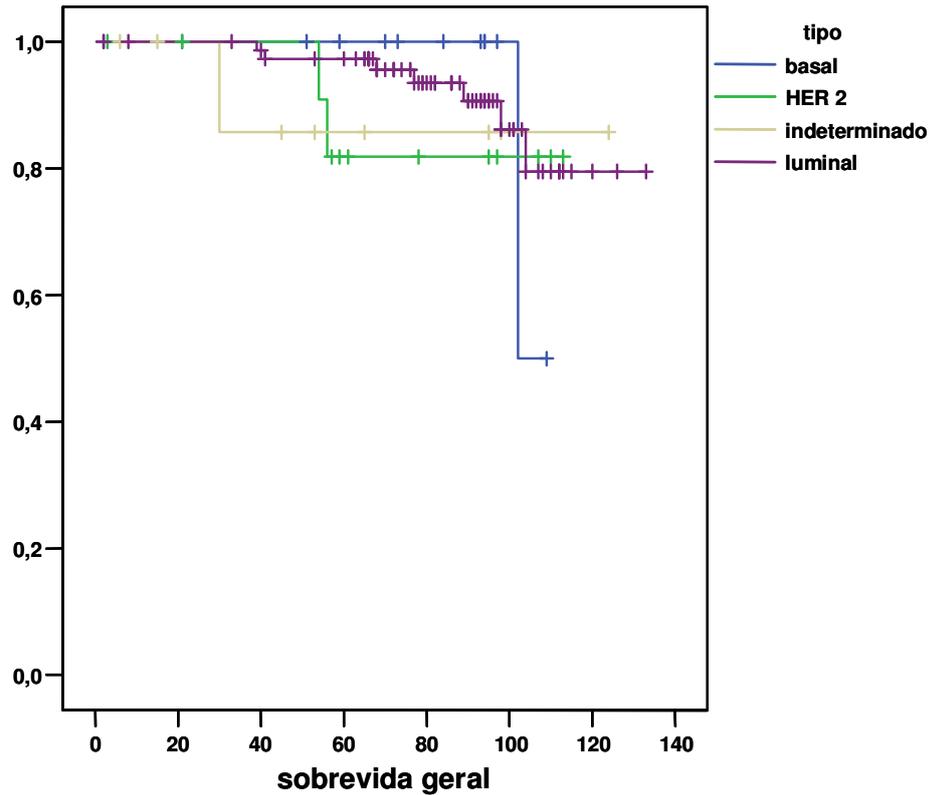


Figura 11 - Curvas de sobrevida geral para os subtipos *basal-like*, luminal, HER2-positivo e indeterminado.

Do total de 112 casos, 11 demonstravam expressão imunohistoquímica de EGFR. Os casos EGFR-positivos eram mais frequentemente RE-negativos (Tabela 2) e HER2-positivos (Tabela 3).

Tabela 2 - Relação entre a expressão de EGFR e RE.

| | EGFR-positivo | EGFR-negativo | Total |
|-------------|---------------|---------------|------------|
| RE-positivo | 4 (4,9%) | 77 (95,1%) | 81 (100%) |
| RE-negativo | 7 (22,6%) | 24 (77,4%) | 31 (100 %) |

P=0,01; teste exato de Fisher.

Tabela 3 - Relação entre a expressão de EGFR e HER2.

| | EGFR-positivo | EGFR-negativo | Total |
|---------------|---------------|---------------|------------|
| HER2-positivo | 4 (30,8%) | 9 (59,2%) | 13 (100%) |
| HER2-negativo | 7 (7,1%) | 92 (92,9%) | 99 (100 %) |

P=0,023; teste exato de Fisher.

6 DISCUSSÃO

Recentemente, vários subtipos moleculares de carcinoma invasor da mama foram reconhecidos através dos estudos de perfilamento genético por *DNA microarray*^(24,25). O subtipo *basal-like* representa cerca de 15 a 25 % do total de casos de câncer de mama⁽⁴⁸⁾ e foi associado com evolução desfavorável em diversas populações de pacientes^(33,36,38,44).

No atual estudo, o subtipo *basal-like* correspondeu a 11,6 % do total de casos. A porcentagem relativamente menor do que em estudos prévios pode estar relacionada ao estágio inicial das pacientes incluídas. Os subtipos *basal-like* e HER2-positivo associam-se com tamanhos tumorais maiores ao diagnóstico do que os casos RE-positivos⁽⁴⁹⁾. De acordo, em nossa coorte de pacientes com câncer de mama de estágio patológico I e II, cerca de 70 % dos casos são RE-positivos.

Outra possível explicação para as diferentes prevalências encontradas está relacionada às metodologias e definições empregadas em diferentes estudos de imunohistoquímica. Na atual série, 32 % dos casos demonstraram expressão de CK5/6 – um número quase três vezes maior do que o de casos classificados como *basais-like*. Em estudos anteriores, a porcentagem de casos com expressão de citoqueratinas basais variou entre 14 % e 37 %^(36,37,39,41) e, em algumas situações, essa positividade foi suficiente para a definição do subtipo *basal-like*^(37,38). Essa variação pode ser atribuída a diferentes anticorpos empregados (para CK5/6, CK 14 ou CK 17), metodologias utilizadas (*tissue microarray* versus imunohistoquímica convencional), critérios para selecionar os pacientes e, possivelmente, discordantes interpretações das lâminas coradas para citoqueratinas basais. Atualmente, estipula-se que qualquer coloração positiva (na membrana e/ou citoplasma) em células do componente invasor é suficiente para definir a expressão das citoqueratinas basais. No entanto, essa leitura é muitas vezes dificultada pela presença de ductos mamários normais residuais entremeados no componente invasor (Figura 12), que podem gerar uma interpretação falso-positiva.



Figura 12 - Ductos mamários normais residuais entremeados no carcinoma invasor de mama, com coloração falso-positiva para CK 5/6.

Por outro lado, se nossa definição fosse baseada exclusivamente na negatividade para RE e HER2, 22 casos (19,6 % do total) teriam sido definidos como *basais-like*. Esse número incluiria os casos atualmente classificados como indeterminados, conforme descrito por Nielsen *et al*, que acreditam que esses casos tratam-se de tumores *basais-like* com expressão fraca ou focal de CK5/6 e/ou EGFR, luminais com baixa expressão de RE, tumores *mama normal-like* e casos com problemas técnicos⁽³⁶⁾.

Certamente, os critérios utilizados por Nielsen *et al* são os mais acurados para a identificação imunohistoquímica do subtipo *basal-like*. Essa definição não só se correlacionou melhor com os casos de câncer de mama *basais-like* identificados por DNA *microarray*, como forneceu as diferenças em sobrevida mais significativas com relação aos outros subtipos em uma coorte de 663 pacientes seguidas por um longo período⁽³⁶⁾. Contudo, apesar de bastante específicos, esses critérios têm 76 % de sensibilidade e, assim, deixam de classificar como tal cerca de ¼ dos casos de tumores *basais-like*⁽³⁶⁾. Além disso, esse estudo foi executado através de *tissue microarray* que tem acurácia potencialmente diferente da técnica imunohistoquímica convencional, usualmente empregada. Outra questão importante é que a coorte estudada por Nielsen *et al* era predominantemente de casos de câncer de mama RE-negativos (60%). Mesmo nesse grupo, a prevalência de tumores *basais-like* foi de 15 %, o que

permite concluir que a definição proposta por Nielsen *et al* é bastante rigorosa e seu significado clínico e prognóstico precisa ser validado em outros estudos antes de sua incorporação na rotina de avaliação das pacientes com câncer de mama inicial.

Nossos resultados também demonstraram que não houve associação do subtipo *basal-like* com estágio patológico, envolvimento axilar ou idade das pacientes. A ausência de associação do subtipo *basal-like* com as variáveis clínicas pode se dever ao número relativamente pequeno de pacientes em nosso estudo e à opção pela definição imunohistoquímica mais estrita desse subtipo, que pode ter deixado de classificar corretamente alguns casos verdadeiramente basais. Outros estudos haviam identificado associação do subtipo *basal-like* com estágio tumoral mais avançado⁽⁴⁹⁾ e idade mais jovem das pacientes⁽⁴⁴⁾.

Com relação aos nossos dados de evolução clínica, não houve diferença significativa com relação à sobrevida livre de doença e sobrevida geral em um seguimento mediano de 81 meses para os subtipos de câncer de mama *basal-like*, luminal, HER2-positivo e indeterminado, definidos através de imunohistoquímica. Isso provavelmente se deve ao bom prognóstico das pacientes com câncer de mama em estágio patológico I e II incluídas na atual avaliação. Em um total de 112 casos, houve apenas 26 recidivas (23 % do total) e 12 óbitos (10,7 % do total). A ausência de significância prognóstica dos subtipos também pode estar relacionada ao número relativamente pequeno de pacientes nessa análise.

A expressão imunohistoquímica de EGFR foi identificada em cerca de 10 % dos casos em nosso estudo e casos EGFR-positivos foram mais frequentemente RE-negativos e HER2-positivos. Siziopikou *et al* identificaram coloração positiva para EGFR em 26 % dos 306 casos de câncer de mama avaliados em seu estudo. Essa coloração também foi significativamente mais freqüente em tumores RE-negativos (59 versus 12 %). Quando os pacientes foram avaliados concomitantemente para RE, RP e HER2, a expressão de EGFR foi mais comum nos casos triplo-negativos (64 %), em comparação com os tumores RE e RP-negativos e HER2-positivo (47 %) e RE e RP-positivos e HER2-negativo (11 %)⁽⁵⁰⁾. No estudo de Nielsen *et al*, 13,4 % do total de casos e 44,1 % dos casos positivos para citoqueratinas basais demonstraram expressão imunohistoquímica de EGFR, sugerindo que o EGFR é freqüentemente superexpresso em tumores basais⁽³⁶⁾. Em um estudo coreano, de 776 casos avaliados, 10 % demonstraram coloração positiva para EGFR. Os mesmos critérios adotados por Nielsen *et al* foram utilizados para definir os casos *basais-like*. 45 % dos casos *basais-like*, 16,5 % dos casos HER2-positivos e apenas 2 % dos casos RE-positivos apresentavam expressão de EGFR⁽⁴⁹⁾.

O EGFR é uma proteína tirosina-quinase ligada à membrana celular, que pertence à família dos receptores para fatores de crescimento epidérmico humanos (HER1 ou EGFR; HER2; HER3 e HER4). Após sua ativação, o EGFR dimeriza-se e, conseqüentemente, ativa várias vias de sinalização intra-celulares envolvidas em proliferação celular e carcinogênese⁽⁵⁰⁾. Já foi demonstrado, em várias séries, que a expressão imunohistoquímica de EGFR em casos de câncer de mama associa-se com evolução desfavorável, independentemente de outros fatores prognósticos⁽⁴⁸⁾. Isso pode sugerir que o EGFR tem um papel relevante na patogênese dos casos de câncer de mama, onde ocorre sua superexpressão.

Além da expressão mais freqüente de EGFR em tumores *basais-like* e RE-negativos de um modo geral^(36,49,50), estudos pré-clínicos têm demonstrado que a inibição da tirosina-quinase do EGFR em linhagens celulares RE-negativas reduz a taxa de proliferação celular⁽⁵¹⁾. Além disso, o uso do gefitinib em ratos transgênicos MMTV-erbB2 (em que um promotor viral mantém o HER2 superexpresso) retarda o tempo até o desenvolvimento de tumores RE-negativos⁽⁵¹⁾. Assim, o EGFR pode representar um alvo terapêutico interessante nesse subgrupo de pacientes com câncer de mama e alguns estudos com drogas anti-EGFR (anticorpo monoclonal *cetuximab* e inibidores de tirosina-quinase) já estão em andamento nessa população para testar essa hipótese.

Com relação à expressão concomitante de EGFR e HER2, os dados disponíveis são mais controversos. Em nossa série, 30,8 % dos casos HER2-positivos demonstravam expressão imunohistoquímica de EGFR, que foi identificada em 16,5 % dos casos HER2-positivos no estudo coreano⁽⁴⁹⁾. Além disso, no estudo conduzido por Siziopikou *et al*, a expressão de EGFR foi mais comum em tumores triplo-negativos (64 %) do que em tumores negativos para RE e RP, mas positivos para HER2 (47 %)⁽⁵⁰⁾. Apesar dessas disparidades, há evidências pré-clínicas que apontam para uma ação conjunta do EGFR e do HER2, favorecendo a atividade não-transcricional do RE, ao nível da membrana celular e/ou citoplasma, que pode contribuir para o desenvolvimento de resistência ao tamoxifen em tumores RE-positivos⁽⁵²⁾. Além disso, dados clínicos já foram publicados demonstrando que o lapatinib (um inibidor de tirosina-quinase anti-HER2 e anti-EGFR) é efetivo em pacientes com tumores HER2-positivos que apresentaram progressão durante o tratamento com trastuzumabe⁽⁵³⁾.

Concluindo, nossos resultados sugerem que é possível identificar o subtipo *basal-like* de câncer de mama através da análise imunohistoquímica convencional do RE, HER2, CK5/6 e EGFR, apesar de não termos conseguido demonstrar o significado clínico dessa definição em nossa amostra. Além disso, a expressão de EGFR parece ser mais freqüente em tumores

RE-negativos, sugerindo que drogas anti-EGFR podem representar alternativas terapêuticas promissoras nesse subgrupo de pacientes.

7 REFERÊNCIAS

1. Goldhirsch, A; Glick, JH; Gelber, RD; et al. Meeting highlights: International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. *Ann Oncol* 2005; 16: 1569-1583.
2. Estimativa da incidência de câncer no Brasil para 2006. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2006/> > Acesso em 3 de junho de 2006.
3. GLOBOCAN 2002 database project. Disponível em < <http://www-dep.iarc.fr> > Acesso em 3 de junho de 2006.
4. Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER). Disponível em < <http://www.seer.cancer.gov> > Acesso em 14 de fevereiro de 2006.
5. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of chemotherapy and hormonal therapy for early breast cancer on recurrence and 15-year survival: an overview of the randomised trials. *Lancet* 2005; 365:1687-1717.
6. National Institutes of Health Consensus Development Panel. National Institutes of Health Consensus Development Conference Statement: Adjuvant Therapy for Breast Cancer, November 1-3, 2000. *J Natl Cancer Inst Monogr* 2001; 30:5-15.
7. NCCN (National Comprehensive Cancer Network) Clinical Practice Guidelines in Oncology. Disponível em: < <http://www.nccn.com> > Acesso em 4 de junho de 2006.
8. Fisher B; Dignam J; Bryant J; et al. Five versus more than five years of tamoxifen for lymph node-negative breast cancer : updated findings from the National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-14 randomized trial. *J Natl Cancer Inst* 2001; 93(9): 684-690.
9. The ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomized trial. *Lancet* 2002; 359: 2131-2139.
10. The ATAC Trialists' Group. Results of the ATAC (Arimidex, Tamoxifen, Alone or in Combination) after completion of five years' adjuvant treatment for breast cancer. *Lancet* 2005; 365: 60-62.
11. Boccardo, F; Rubagotti, A; Guglielmini, P; et al. Switching to anastrozole versus continued tamoxifen treatment of early breast cancer. Updated results of the Italian tamoxifen anastrozole (ITA) trial. *Annals of Oncology* 2006; 17 (Suplement 7): vii10-vii14.
12. Jakesz, R; Jonat, W; Gnant, M; et al. Switching of postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer to anastrozol after 2 years' adjuvant tamoxifen: combined results of ABCSG trial 8 and ARNO 95 trial. *Lancet* 2005; 366: 455-462.

13. Coates, AS; Keshaviah, A; Thürlimann, B; et al. Five years of letrozole compared with tamoxifen as initial adjuvant therapy for postmenopausal women with endocrine-responsive early breast cancer: update of study BIG 1-98. *J Clin Oncol* 2007; 25: 486-492.
14. Goss, PE; Ingle, JN; Martino, S; et al. A randomized trial of letrozole in postmenopausal women after five years of tamoxifen therapy for early-stage breast cancer. *N Eng J Med* 2003; 349(19): 1-10.
15. Goss, PE; Ingle, JN; Martino, S; et al. Randomized trial of letrozol following tamoxifen as extended adjuvant therapy in receptor-positive breast cancer: updated findings from NCIC CTG MA.17. *J Natl Cancer Inst* 2005; 97(17):1262-1271.
16. Coombes, RC; Hall, E; Gibson, LJ; et al. A randomized trial of exemestane after two to three years of tamoxifen therapy in postmenopausal women with primary breast cancer. *N Eng J Med* 2004; 350:1081-1092.
17. Coombes, RC; Kilburn, LS; Snowdon, CF; et al. Survival and safety of exemestane versus tamoxifen after 2-3 years' tamoxifen treatment (Intergroup Exemestane Study): a randomized controlled trial. *Lancet* 2007; 369: 559-570.
18. Winer, EP; Hudis, C; Burstein, HJ; et al. American Society of Clinical Oncology Technology Assessment on the use of aromatase inhibitors as adjuvant treatment for postmenopausal women with hormone-receptor-positive breast cancer: status report 2004. *J Clin Oncol* 2005; 23 (3): 1-11.
19. Hamilton, A; Hortobagyi, G. Chemotherapy: what progress in the last 5 years? *J Clin Oncol* 2005; 23:1760-1775.
20. Citron, ML; Berry, DA; Cirincione, C; et al. Randomized trial of dose-dense versus conventionally scheduled and sequential versus concurrent combination chemotherapy as postoperative adjuvant treatment of node-positive primary breast cancer: first report of Intergroup Trial C9741 / Cancer and Leukemia Group B Trial 9741. *J Clin Oncol* 2003; 21: 1431-1439.
21. Henderson, IC; Berry, DA; Demetri, GD; et al. Improved outcomes from adding sequential paclitaxel but not from escalating doxorubicin dose in an adjuvant chemotherapy regimen for patients with node-positive primary breast cancer. *J Clin Oncol* 2003; 21(6): 1-9.
22. Mamounas, EP; Bryant, J; Lembersky, B; et al. Paclitaxel after doxorubicin plus cyclophosphamide as adjuvant chemotherapy for node-positive breast cancer: results from NSABP B-28. *J Clin Oncol* 2005; 23:3686-3696.
23. Martin, M; Pienkowski, T; Mackey, J; et al. Adjuvant Docetaxel for node-positive breast cancer. *N Eng J Med* 2005; 352: 2302-2313.
24. Roche, H; Fumoleau, P; Spielmann, M; et al. Sequential adjuvant epirubicin-based and docetaxel chemotherapy for node positive-breast cancer patients: the FNCLCC PACS 01 trial. *J Clin Oncol* 2006; 24:5664-5671.
25. Winer, EP; Piccart-Gebhart, MJ; Rugo, HS; Sledge Jr, GH. Management of HER2-positive breast cancer. In: ASCO Educational Book 2006.

26. Piccart-Gebhart, MJ; Procter, M; Leyland-Jones, B; et al. Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer. *N Eng J Med* 2005; 353: 1659-1672.
27. Romond, EH; Perez, EA; Bryant, J; et al. Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Eng J Med* 2005; 353: 1673-1684.
28. Joensuu, H; Kellokumpu-Lehtinen, P-L; Bono, P; et al. Adjuvant Docetaxel or Vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer. *N Eng J Med* 2006; 354:809-820.
29. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. Effects of radiotherapy and of differences in the extent of surgery for early breast cancer on local recurrence and 15-year survival : an overview of the randomized trials. *Lancet* 2005; 366:2087-2106.
30. Van de Vijver, MJ; He, YD; van't Veer, L; et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Eng J Med* 2002; 347: 1999-2009.
31. Van't Veer, LJ; Paik, S; Hayes, D. Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker. *J Clin Oncol* 2005; 23: 1631-1635.
32. Perou, CM; Sorlie, T; Eisen, MB; et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000; 406: 747-752.
33. Sorlie, T; Perou, CM; Tibshirani, R; et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 10869-10874.
34. Van't Veer, LJ; Dai, H; van de Vijver, MJ; et al. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature* 2002; 415: 530-536.
35. Winer, EP; Carey, LA; Dowsett, M; Tripathy, D. Beyond anatomic staging: are we ready to take the leap to molecular classification? In: *ASCO Educational Book* 2005.
36. Nielsen, TO; Hsu, FD; Jensen, K; et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 5367-5374.
37. Ribeiro-Silva, A; Ramalho, LN; Garcia, SB; et al. P63 correlates with both BRCA1 and cytokeratin 5 in invasive breast carcinomas: further evidence for the pathogenesis of the basal phenotype of breast cancer. *Histopathology* 2005; 47: 458-466.
38. Banerjee, S; Reis-Filho, JS; Ashley, S; et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol* 2006; 59: 729-735.
39. Fulford, LG; Easton, DF; Reis-Filho, JS; et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 2006; 49: 22-34.
40. Matos, I; Dufloth, R; Alvarenga, M; Zeferino, LC; Schmitt, F. p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* 2005; 447: 688-694.

41. Potemski, P; Kusinska, R; Watala, C; et al. Prognostic relevance of basal cytokeratin expression in operable breast cancer. *Oncology* 2005; 69: 478-485.
42. Foulkes, WD; Stefansson, IM; Chappuis, PO; et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95: 1482-1485.
43. Collett, K; Stefansson, IM; Eide, J; et al. A basal epithelial phenotype is more frequent in interval breast cancers compared with screen detected tumors. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2005; 14(5): 1108-1112.
44. Carey, LA; Perou, CM; Dressler, LG; et al. Race and the poor-prognosis basal-like breast cancer (BBC) phenotype in the population-based Carolina Breast Cancer Study. *J Clin Oncol* 22:9510a, 2004.
45. Rouzier, R; Perou, CM; Symmans, WF; et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2005; 11(16): 5678-5685.
46. Jacobs, TW; Gown, AM; Yaziji, H; et al. Specificity of HercepTest in determining HER-2/neu status of breast cancers using the United States Food and Drug Administration-approved scoring system. *J Clin Oncol* 1999; 17: 1983-1987.
47. Harvey, JM; Clark, GM; Osborne, CK; Allred, DC. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. *J Clin Oncol* 1999; 17 (5): 1474-1481.
48. Yehiely, F; Moyano, JV; Evans, JR; et al. Deconstructing the molecular portrait of basal-like breast cancer. *Trends in Molecular Medicine* 2006; 12 (11): 537-544.
49. Kim, M; Ro, J; Ahn, S; et al. Clinicopathologic significance of the basal-like subtype of breast cancer: a comparison with hormone receptor and Her2/neu-overexpressing phenotypes. *Human Pathology* 2006; 37:1217-1226.
50. Siziopikou, KP; Ariga, R; Prousaloglou, KE; et al. The challenging Estrogen Receptor-negative / Progesterone Receptor-negative / HER-2 negative patient: a promising candidate for Epidermal Growth Factor Receptor-targeted therapy? *The Breast Journal* 2006; 12 (4):360-362.
51. Lu, C; Speers, C; Zhang, Y; et al. Effect of Epidermal Growth Factor Receptor inhibitor on development of Estrogen Receptor-negative mammary tumors. *J Natl Cancer Inst* 2003; 95:1825-1833.
52. Osborne, K; Schiff, R. Estrogen-Receptor biology: continuing progress and therapeutic implications. *J Clin Oncol* 2005; 23:1616-1622.
53. Geyer, CE; Forster, J; Lindquist, D; et al. Lapatinib plus capecitabine for HER2-positive breast cancer. *N Eng J Med* 2006; 355:2733-2743.