

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

Ana Paula da Silva Fernandes

**ESTUDO DA EXPRESSÃO
IMUNO-HISTOQUÍMICA DA
E-CADERINA E N-CADERINA
EM CÂNCER DE MAMA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde
de Porto Alegre

Porto Alegre

2016

Ana Paula da Silva Fernandes

**ESTUDO DA EXPRESSÃO
IMUNO-HISTOQUÍMICA DA
E-CADERINA E N-CADERINA
EM CÂNCER DE MAMA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Vial Roehle

Porto Alegre

2016

Catalogação na Publicação

Fernandes, Ana Paula da Silva
Estudo da expressão imuno-histoquímica da E-caderina e
N-caderina em câncer de mama / Ana Paula da Silva
Fernandes. -- 2016.

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

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

Orientador(a): Dra. Adriana Vial Roehe.

1. Câncer de mama. 2. Transição epitelio-mesenquimal.
3. E-caderina. 4. N-caderina. 5. Imuno-histoquímica. I.
Título.

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

Dedicatória

Dedico este trabalho, a minha família, em especial, ao meu filho Thomas da Rosa e minha irmã Andréa Fernandes, pelo amor e aplausos diante de minhas conquistas.

Agradecimentos

A minha **Orientadora Professora Dra. Adriana Roehe**, obrigada pela oportunidade, orientação, incentivo, paciência, auxílio e apoio durante os momentos mais difíceis. Obrigada pelos conselhos e tranquilidade que me transmitiste, especialmente por ter acreditado na minha capacidade.

A meu amável filho, **Thomas Fernandes da Rosa**, pela compreensão e amor, nas muitas vezes que necessitei priorizar o tempo para minha pesquisa. A Minha inseparável irmã e grande amiga, **Andréa Fernandes**. A meu companheiro **Luiz Carlos Rosa**, que muitas vezes se perdeu em meio de tantos artigos dispersos pela casa. Agradeço aos **meus irmãos** que indiretamente me fortalecem diante das dificuldades.

As técnicas do Laboratório de Patologia, **Rosalva Meurer, Terezinha Stein**, por terem me auxiliado em toda a fase experimental no decorrer deste estudo. Agradeço especialmente a **Rosalva**, que esteve ao meu lado sempre disposta, durante as inúmeras vezes que precisamos repetir os experimentos. Muito obrigada!

Também manifesto meu afetuoso agradecimento a pessoas tão especiais: secretária **Maristela Pasin**, professora **Josenel Marçal** e a doutoranda **Sandra Amaro**. Obrigada pelo acolhimento, carinho e amizade.

Finalmente, a todas as pessoas que me ajudaram direta ou indiretamente e que não foram citadas, mas contribuíram na realização deste trabalho.

“É sábio o homem que pôs em si tudo que leva à felicidade ou dela se aproxima”.

SÓCRATES

Sumário

I.	Lista de Abreviaturas	8
II.	Lista de Figuras da Revisão da Literatura	10
III.	Lista de Figuras do Artigo	11
IV.	Lista de Tabelas do Artigo	12
V.	Resumo da Dissertação	13
1.	Introdução	15
1.1.	Epidemiologia	15
1.2.	Fatores de risco	17
1.2.1.	Fatores de riscos não modificáveis.....	18
1.2.2.	Fatores de riscos modificáveis	20
1.2.3.	Outros Fatores	21
1.3.	Fatores Prognósticos e Preditivos	21
1.3.1.	Principais Fatores prognósticos	22
1.4.	Estadiamento	22
1.4.1	Tamanho do tumor.....	25
1.4.2	Estado linfonodal	26
1.4.3.	Metástases sistêmicas	26
1.5.	Gradação Histológica	27
1.6.	Classificação dos Subtipos Moleculares	28
1.7.	Marcadores Imuno-Histoquímicos	29
1.7.1.	Receptor de estrógeno.....	29

1.7.2. Receptor de progesterona	30
1.7.3. HER-2.....	31
1.7.4. Ki-67.....	31
1.8. Aspectos Fundamentais Sobre a Transição Epitélio-Mesenquimal	32
1.9. Proteínas de Adesão “Caderinas”	36
1.9.1. E-caderina	37
1.9.2. N-caderina	41
1.10. Referências bibliográficas.....	44
2. Objetivos	49
2.1. Objetivo geral	49
2.2. Objetivos específicos	49
3. Artigo científico redigido em português	50
4. Considerações finais	71
5. Anexos.....	72
5.1. Materiais e Métodos.....	72
5.1.1. Análise Digital das Reações Imuno-Histoquímicas.	72
5.1.1.2. Acessando o Plugin Deconvolução.....	75
5.1.1.3. Obtenção de dados quantitativos	77
5.2 Tabelas e Figuras da Análise Estatística	79
5.3. Fotos da Imuno-Histoquímica	84
5.4. Pareceres do Comitê de Ética	86

I. Lista de Abreviaturas

1. ADI Área de interesse
2. AJCC American Joint Committee on Cancer
3. BRCA1 Breast cancer 1
4. BRCA2 Breast cancer 2
5. CDI Carcinoma ductal in situ
6. CIS Carcinoma in situ
7. CM Câncer da mama
8. CMI Câncer de mama inflamatório
9. CMTN Câncer de mama triplo-negativo
10. DC Deconvolução da cor
11. DNA Ácidodesoxirribonucleico
12. ECAD E-caderina
13. ECOG European Cooperative Oncology Group
14. EGFR Epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)
15. EMT Transição epitélio-mesenquimal
16. ERK Quinase regulada por sinais extracelulares
17. FGF10 Fator de crescimento de fibroblasto-10
18. FISH Hibridização in situ por fluorescência
19. G Grau tumoral
20. HE Hematoxilina e Eosina
21. HER-2 Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
22. IHQ Imuno-histoquímica

23.	INCA	Instituto Nacional do Câncer
24.	Ki-67	Proteína Ki-67
25.	MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
26.	MET	Transição mesenquimal-epitélio
27.	MMP-9	Metaloproteinase-9
28.	NCAD	N-caderina
29.	NGS	Classificação de Nottingham
30.	OMS	Organização Mundial da Saúde
31.	PPA	Porcentagem de área positiva
32.	RE	Receptor de estrógeno
33.	ROC	Curva de Características de Operação do Receptor
34.	RP	Receptor de progesterona
35.	SCN	Classificação de Nottingham
36.	SLD	Sobrevida livre da doença
37.	TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
38.	TNM	Tumor primário, estado nodal e metástases à distância
39.	WHO	Organização Mundial da Saúde

II. Lista de Figuras da Revisão da Literatura

Figura 1. Incidência de câncer, em mulheres, Brasil 2016.....	15
Figura 2. Mecanismo da metástase.....	27
Figura 3. Prognóstico, segundo o perfil imuno-histoquímico.....	29
Figura 4. Classificação celular da EMT.....	34
Figura 5. Mecanismo EMT para MET.....	35
Figura 6. Molécula da proteína caderina clássica.....	37
Quadro 1. Principais fatores de risco no desenvolvimento do CM	17
Quadro 2. Principais Fatores prognósticos.....	22
Quadro3. Classificação TNM.....	23

III. Lista de Figuras do Artigo

Figure 1. Correlação da expressão ECAD versus NCAD69

Figura 2. Curva de Kaplan-Meier percentual de área IHQ positiva ECAD.....69

Figura 3. Curva de Kaplan-Meier percentual de área IHQ positiva NCAD70

IV. Lista de Tabelas do Artigo

Tabela 1. Resultados das reações de IHQ positivas ECAD e NCAD, de acordo com os pontos de corte estabelecidos na análise de imagem.....	66
---	----

V. Resumo da Dissertação

Introdução: No Brasil, o câncer da mama (CM) é a segunda principal causa de morbimortalidade no sexo feminino. Entre os fatores que buscam elucidar aspectos da sua carcinogênese está o estudo da transição epitélio-mesenquimal (EMT). Esta permite o destacamento de células tumorais, possibilitando maior invasão tecidual e metastatização. As proteínas E-caderina (ECAD) e N-caderina (NCAD) atuam na EMT e alterações na sua expressão podem favorecer a progressão tumoral.

Objetivo: Analisar e quantificar, em espécimes de carcinoma mamário (CM), a expressão das proteínas ECAD e NCAD, correlacionando-as ao grau histológico, ao estadiamento (TMN) e à sobrevida livre de doença das pacientes.

Materiais e métodos: Foram analisadas 143 pacientes com CM, que concordaram em participar do estudo, assinando o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Secções de CM, emblocadas em parafina, foram incubadas com anticorpos específicos ECAD e NCAD. Os resultados das reações imuno-histoquímicas (IHQ) foram quantificados, através da análise de imagem digital, utilizando o método de deconvolução da cor e relacionados com graduação tumoral, estadiamento e taxa de sobrevida livre da doença das pacientes. Os resultados foram submetidos à análise estatística, considerando-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados: As pacientes com o maior percentual de positividade para ECAD (82,40%) apresentaram o maior grau histológico ($p = 0,041$) e uma tendência a estarem em estágio mais avançado (estádio IV) ($p = 0,057$). A expressão

NCAD não foi significativamente associada à nenhuma das variáveis estudadas.

Conclusão: A hiperexpressão de ECAD em neoplasias de mama foi associada a tumores com maior grau histológico e, possivelmente, com estágio avançado. O papel da ECAD e da NCAD no fenômeno da EMT no câncer de mama ainda necessita de maior elucidação.

Palavras-chave: Câncer de Mama, E-caderina, N-caderina, transição do Epitélio Mesenquimal.

1. Introdução

1.1. Epidemiologia

O câncer de mama (CM), tipo mais comum de câncer entre as mulheres, é a segunda principal causa de morte feminina mundial (Ashaie e cols., 2016; Masuda e cols., 2016). A taxa de incidência tende a elevar-se entre a América Latina, Peru, México, Colômbia e Brasil. Entretanto, nos anos de 2002 a 2008, o Brasil e o Panamá tiveram menos progresso contra a doença (Justo e cols., 2013). Conforme, figura 1, no Brasil, esta neoplasia é superada apenas pelo tumor de pele não melanoma (INCA, 2015).



Figura 1. Incidência de câncer, em mulheres, no Brasil para o ano de 2016.

Todas as neoplasias exceto pele não melanoma (INCA, 2015).

Dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelam que o número de casos novos de CM estimados para o Brasil, em 2016 é de 57.960, com um risco estimado de 56,2 casos a cada 100 mil mulheres (INCA, 2015). Ocorre um aumento da incidência do CM em todas as regiões. A cada 10 mulheres diagnosticadas com CM no país, quatro estarão propensas a morrer vítimas da doença. O diagnóstico tardio é o grande vilão desta fatalidade (Justo e cols., 2013).

Nos últimos anos, em alguns países, evidenciou-se um aumento no número de casos de CM em mulheres com menos de 40 anos (Kamangar e cols., 2006). Na Suíça, a incidência entre 2002 a 2004 elevou-se 46,7%, em mulheres com menos de 40 anos (Bouchardy e cols., 2007). Neste período o mesmo ocorreu na França, com um aumento de 10%, nesta faixa etária (Colonna e cols., 2008). Na China, o pico de incidência da doença está ocorrendo aos 40 anos, muito mais cedo do que nos países ocidentais (Hong Kong Cancer Registry, 2004).

Na Tunísia, o CM é a primeira neoplasia entre as mulheres, entre os anos de 1994 à 2004 a incidência elevou-se de 16,7 à 28,5. Este aumento alarmante, prevaleceu entre as mulheres na faixa etária inferior a 35 anos (Parkin cols., 2003; Maalej e cols., 2008; Karray-Chouayekh e cols., 2012). Entretanto, na Europa o número de casos em mulheres com menos de 40 anos representa somente 2 a 4% do total (Shaw de Paredes e cols., 1990). Embora no Brasil existem poucos dados sobre CM e distribuição por faixa etária, alguns estudos indicam considerável prevalência entre as jovens, em diferentes regiões do país. Uma pesquisa, realizada no Hospital de Clínicas de Porto

Alegre, demonstrou que 13,4 % dos tumores ocorrem em pacientes com menos de 40 anos de idade (Menke e cols., 2007). No município de Goiânia, a prevalência de CM na faixa etária de 20 a 29 anos, entre 1988 a 2003 elevou-se 136%; enquanto a faixa etária de 30 a 39 anos, 104% (Junior e cols., 2013).

1.2. Fatores de risco

A grande maioria dos casos de CM incide no sexo feminino, fase perimenopausa. A patogênese da doença é extremamente complexa, até o momento, já foram identificados inúmeros fatores de risco para o desenvolvimento do CM (Quadro 1).

Quadro 1. Principais fatores de risco para o desenvolvimento do CM:

Relação	↑ Risco relativo de câncer da mama
> 4	Sexo feminino Idade (≥ 65 anos); Histórico de câncer de mama; Hiperplasia atípica confirmada por biópsia; Certas mutações genéticas herdadas (BRCA1 e / ou BRCA2); Dois ou mais parentes de primeiro grau com câncer de mama diagnosticado em idade precoce.
2.1 - 4.0	De alta dose de radiação na mama; Alta densidade óssea (pós-menopausa); Um parente de primeiro grau com câncer de mama.
1.1 à 2.0	Não ter amamentado; Uso de contraceptivos orais; Menarca precoce (<12 anos); Menopausa tardia (> 55 anos); Obesidade (pós-menopausa); Idade tardia da primeira gestação (>30 anos); Uso em longo prazo de estrógeno e progesterona. Etnia; Consumo de álcool; Nível socioeconômico; História pessoal de câncer do endométrio ou ovário.

Adaptado de American Cancer Society. Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010.

1.2.1. Fatores de riscos não modificáveis

Muitos dos fatores de risco de CM, como a idade, história familiar, idade da primeira gestação, menarca precoce, menopausa tardia e densidade da mama, são não modificáveis. Fatores reprodutivos associados com menarca precoce, idade tardia da primeira gestação, menopausa em idade avançada e presença de doença proliferativa da mama estão entre os fatores de risco mais importantes (Willet e cols., 2000).

Algumas mutações resultam em um maior risco. A predisposição genética é responsável por até 10% dos casos de câncer de mama, particularmente os genes *breast cancer 1* (BRCA1) e *breast cancer 2* (BRCA2) estão relacionados com o aparecimento da doença (Rosa e cols., 2012). Mutações da linhagem germinativa de BRCA1 têm sido detectadas na maioria dos casos de câncer hereditário de mama e ovário. Aproximadamente 1/3 dos casos de CM hereditário e aproximadamente, 30-40% dos esporádicos estão associados com expressão alterada de BRCA1 (Masuda e cols., 2016). No entanto, estas mutações são raras e representam uma pequena parcela dos casos de CM (Lacey e cols., 2009). Mulheres que possuem dois ou mais familiares de primeiro grau afetados com a doença apresentam um risco superior a 4 vezes, em relação ao da população em geral de desenvolver CM (American Cancer Society). Os tumores de origem hereditária tendem a surgir em idade precoce e frequentemente, acometem ambas as mamas (Willet e cols., 2000). O risco de recorrência ou desenvolvimento de um segundo CM

primário, é afetado por fatores genéticos, hormonais e características do tumor (Homan e cols.; 2016).

Apesar de ser considerado infrequente em mulheres com menos de 40 anos, a taxa de mortalidade do CM, nesta faixa etária, apresenta-se bem mais elevada, quando comparada as de pacientes peri-menopausicas (Canello e cols., 2010). Recentemente foi demonstrado, através de análises genômicas, que os tumores nas pacientes jovens representam uma entidade biológica distinta, caracterizada por padrões moleculares únicos e um pior prognóstico (Anders e cols., 2008). Frequentemente, nestas pacientes, esta neoplasia apresenta um maior grau histológico, maior invasão linfovascular, receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) negativos e aumento da expressão de receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano (HER2), maiores chances de recidiva local e sistêmica, e menor taxa de sobrevida global. (Canello e cols., 2010).

Estudos sobre o comportamento biológico destes tumores em mulheres jovens e de origem africana apresentam resultados controversos, assim como, estudos abordando novos marcadores patológicos e/ou prognósticos (Jones e cols., 2014). Entre esses últimos, encontram-se a expressão imunohistoquímica da citoqueratinas basais, vimentina e BRCA1 e a pesquisa de alterações genômicas (Parikh e cols. 2008).

1.2.2. Fatores de riscos modificáveis

Os fatores de riscos modificáveis, são aqueles associados a obesidade pós-menopausa, uso combinado de estrogênio e progesterona na menopausa, consumo de álcool e sedentarismo (American Cancer Society).

A prática de atividade física pode reduzir o risco de recorrência do câncer e as taxas de mortalidade (Sternfeld e cols.,2009). O sobrepeso ou a obesidade é um importante fator especialmente para o CM de tipo inflamatório (Atkinson e cols., 2016). Avaliar informações sobre a prevalência de fatores de risco comportamentais entre sobreviventes de CM é crucial para identificação de estratégias preventivas específicas a subtipos distintos (Sternfeld e cols.,2009).

Homan e cols. (2016) analisaram as estimativas de prevalência de fatores de risco comportamentais entre o sexo feminino e as práticas preventivas, incluindo rastreio do câncer. Os autores relataram que as pacientes que nunca tinham tido nenhum tipo de câncer apresentaram hábitos comportamentais mais saudáveis do que as sobreviventes de CM. Tais como: ter realizado regularmente o exame de Mamografia, teste Papanicolau, Colonoscopia e serem menos propensas a fumar.

Hormônios exógenos em usuárias de anticoncepcionais orais ou terapia de reposição hormonal e fatores reprodutivos associados com a exposição prolongada a estrogênios endógenos são importante fatores de risco (Willet e cols., 2000; Lacey e cols., 2009).

Tabagismo, obesidade e consumo de álcool, não só elevam o risco de CM e recidiva, como favorecem o surgimento de um segundo CM primário (Homan e cols.; 20016).

1.2.3. Outros Fatores

A incidência de CM em mulheres mais jovens está relacionada com etnia. Sabe-se que o CM é mais comum em mulheres caucasianas do que em afro-americanas, no entanto, em mulheres com idade inferior a 35 anos, o CM é duas vezes mais comum em mulheres afro-americanas (Jones e cols., 2014). Mulheres afro-americanas jovens são mais propensas serem diagnosticadas em estágio avançado, quando comparadas com jovens caucasianas, no entanto, a taxa de sobrevida parece ser equivalente entre as etnias (Jones e cols., 2014).

1.3. Fatores Prognósticos e Preditivos

Um fator de prognóstico pode ser definido como uma variável mensurável correlacionada com a história natural da doença. O fator preditivo está associado a resposta do paciente a uma determinada terapia (Cianfrocca e cols., 2004; Bradley 2007). Fatores prognósticos e preditivos são universalmente utilizados no CM (Cianfrocca e cols., 2004; Bradley 2007).

1.3.1. Principais Fatores prognósticos

Os principais fatores independentes, descritos no quadro 2, são estado geral da paciente mensurado pela *performance status* (medidas pelas escalas ECOG ou Karnofsky), o sítio de metástase, o número de sítios de acometimento metastático, a presença de receptores hormonais e da hiperexpressão de HER2, o intervalo entre o final da adjuvância e o diagnóstico da doença metastática, o uso prévio de quimioterapia adjuvante ou paliativa e o subtipo histológico/molecular do câncer de mama (SBOC, 2011).

Quadro 2: Principais Fatores prognósticos.

Fator Prognóstico	Favorável	Desfavorável
<i>performance status</i>	bom	ruim
sítios de doença	ossos, partes moles	vísceras
número de sítios de doença	poucos	múltiplos
receptores hormonais	positivos	negativos
HER2	negativo	positivo
intervalo livre de doença	> 2 anos	< 2 anos
quimioterapia adjuvante	não	sim
quimioterapia paliativa	não	sim

Fonte: SBOC, 2011.

1.4. Estadiamento

Por mais de 50 anos, a TNM tem servido como a classificação padrão para a extensão da doença em pacientes com câncer (Chen e cols., 2016). Estadiar um caso de neoplasia maligna, significa avaliar e classificar o grau de disseminação do tumor, visando o tratamento mais adequado para cada

paciente, uma vez que pacientes, com o mesmo tipo de câncer e diferente estadiamento, podem ter diferentes propostas de tratamento (INCA, 2011). A classificação do estadiamento (TNM), preconizada pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), através de um acordo internacional, é aceita e utilizada universalmente (Edge e cols, 2010; Chen e cols., 2016). A classificação TNM, baseia-se na extensão anatômica da doença refletida nas características do tumor primário (T), nas características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e na presença ou ausência de metástase a distância (M), parâmetros estes graduados em T0 a T4; N0 a N3; e de M0 a M1 (INCA, 2011). No quadro 3, apresenta a classificação TNM (2010), para os tumores da mama.

Quadro 3. Classificação TNM de acordo com 7^a Edição do Estadiamento Clínico (UICC).

Classificação TNM
Tumor primário
<p>TX - O tumor primário não pode ser avaliado.</p> <p>T0 - Não há evidência de tumor primário.</p> <p style="padding-left: 40px;">Tis - Carcinoma in situ.</p> <p style="padding-left: 40px;">Tis - carcinoma intraductal in situ.</p> <p style="padding-left: 40px;">Tis - carcinoma lobular in situ.</p> <p style="padding-left: 40px;">Tis - doença de Paget do mamilo sem tumor.</p> <p>T1 - Tumor ≤ 2 cm.</p>

T1_{mic} - Microinvasão ≤ 0,1 cm.

T1a – ≥ 0,1 cm ≤ 0,5 cm.

T1b - ≥ 0,5 cm ≤ 1 cm.

T1c - ≥ 1 cm ≤ 2 cm.

T2 - Tumor > 2 cm ≤ 5 cm.

T3 - Tumor > 5 cm.

T4 - Tumor de qualquer dimensão, com extensão direta à parede torácica ou à pele.

T4a - Extensão à parede torácica.

T4b - Edema (inclusive "peau d'orange") ou ulceração da pele mamária ou nódulos cutâneos satélite confinados à mesma mama.

T4c - Ambos (T4a e T4b).

T4d - Carcinoma inflamatório.

N - Linfonodos Regionais

NX - Linfonodos regionais não podem ser avaliados

N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais.

N1 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral(ais), níveis I e II móvel(eis).

N2 - Metástase em linfonodo(s) regional(ais).

N2_a axilar(es) Níveis I e II, fixo entre si ou em outra estrutura.

N2_b da cadeia mamária interna, clinicamente detectável.

N3 - Metástase em linfonodo(s) regional (is).

N3_a intraclavicular (es) nível III, com ou sem comprometimento de linfonodo(s) auxiliar(es).

N3_b da cadeia mamária interna, clinicamente detectada, com comprometimento de linfonodo(s) auxiliar(es).

N3_c subclavicular (es) nível III, com ou sem comprometimento de linfonodo(s) auxiliar(es) ou mama interna.

M - Metástase à Distância

M0 - Ausência de metástase à distância.

M1 - Metástase à distância

1.4.1 Tamanho do tumor

O tamanho do tumor se correlaciona com a presença e número de linfonodos axilares envolvidos, sendo também um independente fator prognóstico (Cianfrocca e cols., 2004). Rosen e cols.(1993) examinaram a relação entre o tamanho do tumor e a sobrevida livre de recorrência em 20 anos e encontraram uma associação significativa, com 20 anos livre de recidiva de 88% para os tumores ≤ 1 cm, 72% para os tumores de 1,1 cm a 3 cm, e 59% para os tumores de entre 3,1 cm e 5 cm. Além disso, o tempo médio para o desenvolvimento de doença metastática também diminui à medida que o tamanho do tumor aumenta. Para pacientes com linfonodos negativos, o

tamanho do tumor é o mais poderoso fator prognóstico e é rotineiramente usado para tomada de decisões de tratamento adjuvante (Rosen e cols., 1993).

1.4.2 Estado linfonodal

O indicador de prognóstico mais importante para os pacientes com câncer de mama em estágio inicial é a presença ou ausência de envolvimento dos gânglios axilares linfáticos (Fisher e cols., 1983; Cianfrocca e cols., 2004). Além disso, há uma relação direta entre o número de linfonodos axilares comprometidos e o risco de metástase sistêmica (Fisher e cols., 1983; Cianfrocca e cols., 2004).

1.4.3. Metástases sistêmicas

A principal causa de morte dos pacientes com câncer está atribuída à capacidade de as células cancerosas escaparem da massa do tumor primário e colonizarem locais distantes, fenômeno conhecido como metastatização (Horne e cols., 2013). As células tumorais podem mudar suas características celulares para adquirir motilidade à invasão (Ma e cols., 2008). A metástase começa quando as células cancerosas invadem tecidos vizinhos. Subseqüentemente, as células metastatizantes podem entrar na circulação, diretamente ou através do sistema linfático de locais distantes, permanecendo latentes ou gerando

metástases clinicamente detectáveis. Figura 2 Frequentemente ocorre metástase do CM para os ossos, pulmão, pleura e fígado (Ma e cols., 2008).

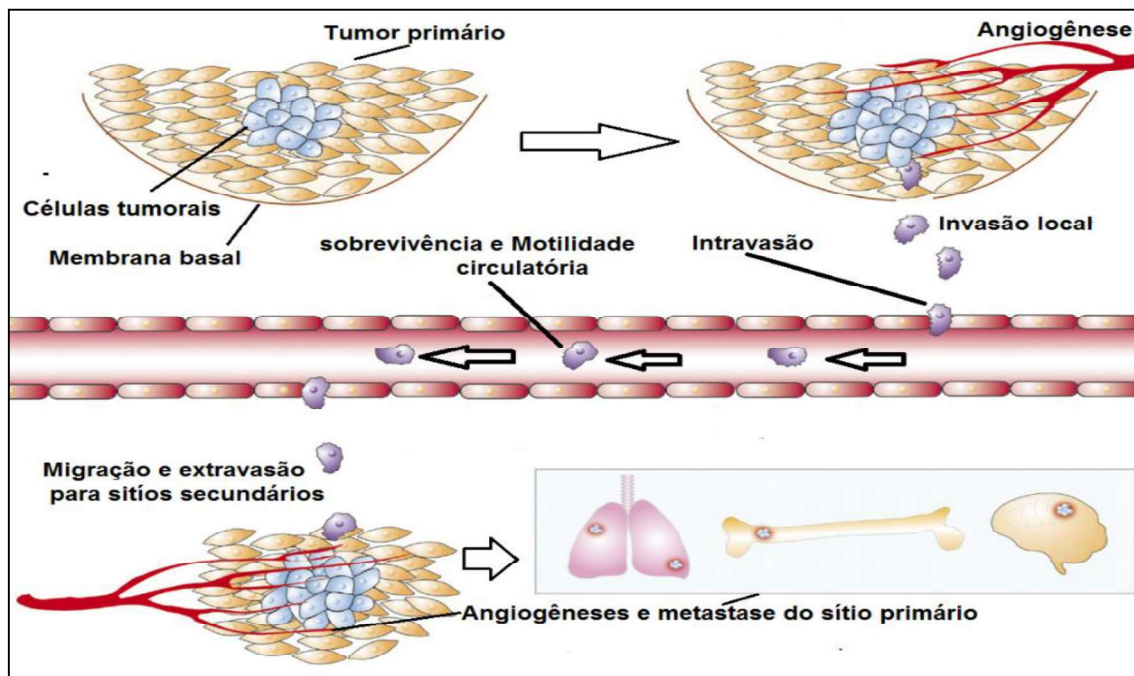


Figura 2. Mecanismo da metástase envolve uma cascata de eventos, que seguem a partir da invasão local, invasão da circulação sistêmica, fuga da apoptose, sobrevivência durante o transporte, extravasamento e formação de micrometástases em órgãos distantes (Adaptado de Ma e cols 2008).

1.5. Graduação Histológica

Grau histológico (G) é um importante determinante de prognóstico. Greenhough, em 1925 evidenciou uma leve correlação entre o grau histológico do CM e a sobrevivência dos pacientes. Posteriormente, outros métodos utilizados para este propósito refletiam os princípios básicos formulados por Greenhough (Fisher e col., 1980). A graduação histológica Scarf Bloom-Richardson modificada por Elston-Ellis, conhecida como Sistema de Classificação de

Nottingham (SCN), é o sistema de graduação atualmente utilizado (Rakha e cols., 2010). A importância do SCN foi atribuída desde 1991 e posteriormente validada por diferentes pesquisadores (Elston e cols., 1991; Rakha e cols., 2010). Análise do grau histológico combinado de SCN avalia o percentual de diferenciação tubular; avaliação do pleomorfismo nuclear e o índice mitótico. A soma dos pontos dos três componentes determina os graus: G1- bem diferenciado, G2 moderadamente diferenciado e G3 fracamente diferenciado (Fitzgibbons e cols., 2000).

1.6. Classificação dos Subtipos Moleculares

Com o surgimento da tecnologia de microarranjos de DNA complementar, associado a análise paralela dos genes envolvidos com o câncer de mama, foi possível classificar os tumores de mama de acordo com seu perfil gênico intrínseco, nas seguintes denominações: luminal A; luminal B HER2+; luminal B HER2-; HER2+ não luminal; basal ou triplo negativo (Perou e cols., 2000; Buitrago e cols., 2011; Goldhirsch e cols., 2011). Tais perfis são definidos através da expressão de marcadores imuno-histoquímicos e traduzem características diversas em relação ao comportamento biológico da doença e tem valor prognóstico e preditivo (Figura 3).

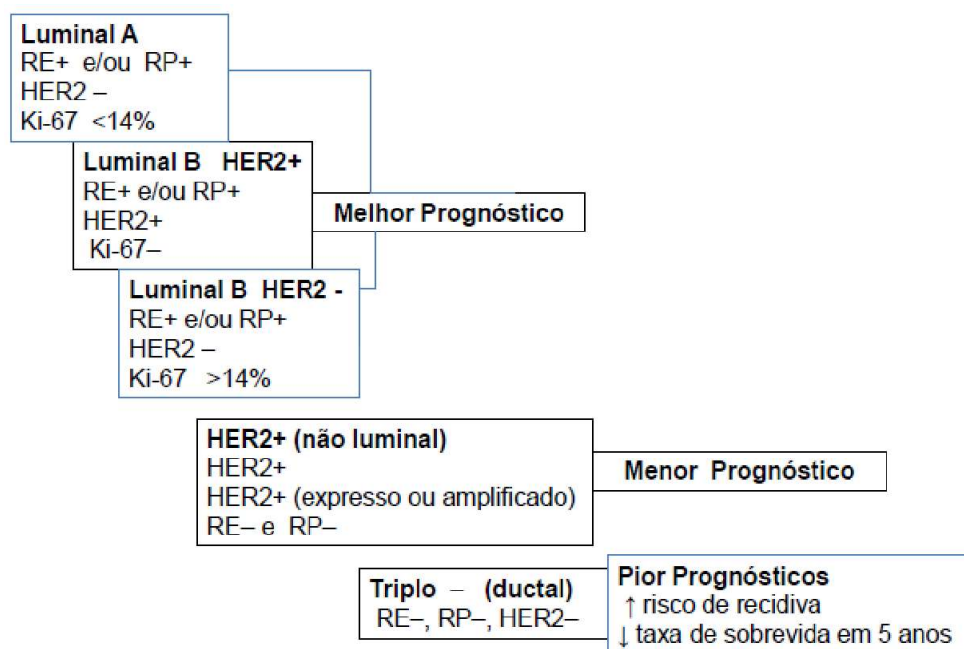


Figura 3. Prognóstico, segundo o perfil imuno-histoquímico. Adaptado de Buitrago e cols., 2011 e Goldhirsch e cols., 2011.

1.7. Marcadores Imuno-Histoquímicos

Para refletir sobre a melhor opção de tratamento é clinicamente importante avaliar os marcadores imuno-histoquímicos: RE, PR, Her-2 e Ki67 (Lin e cols., 2014). Esta avaliação possibilita a introdução de terapia hormonal e terapia alvo seletiva, especialmente tamoxifeno e trastuzumab (Herceptin) [Lin e cols., 2014].

1.7.1. Receptor de estrógeno

A presença de receptores hormonais é um fator preditivo poderoso na probabilidade de benefício de terapia hormonal adjuvante (Bradley 2007). A presença de RE e RP, nas células cancerígenas, está correlacionada com o baixo grau histológico e a capacidade de resposta positiva a tratamentos quimioterápicos, especialmente em mulheres na pós-menopausa (Harvey e cols., 1999; Bradley 2007). A expressão RE fornece índices de sensibilidade ao tratamento endócrino (Abreu e cols., 2011). Diferentes estudos confirmam que os indivíduos com doença RE - negativa não têm nenhum benefício com a hormonioterapia de Tamoxifeno durante 5 anos, mas algum benefício pode ser obtido no grupo de tumores de mama RE - negativo que expressam o receptor de RP (Shaaban, 2002). As células tumorais, quando apresentam RE, tendem a apresentar baixa diferenciação tumoral, alta taxa de proliferação celular, incidindo no prognóstico negativo para as pacientes e prevalecendo a negativa taxa de sobrevida (Figusch e cols., 1988). Atualmente o receptor RE, é considerado o melhor exemplo de biomarcador tumoral, conduzindo a terapêutica aplicável aos pacientes com CM. As pacientes que apresentam células positivas para RE, tendem a ter melhores taxas de sobrevida (Harvey e cols., 1999; Bradley 2007).

1.7.2. Receptor de progesterona

Quando o núcleo das células expressa RP, este é intimamente dependente da presença de RE (Buitrago e cols., 2011). Há evidências de que no CM metastático a resposta ao tratamento anti-estrogênio é melhor entre

indivíduos que apresentam tumores com expressão de RE e RP versus aqueles aos que apenas mostram positividade para RE (Buitrago e cols., 2011). Em pacientes com doença metastática, a resposta ao tratamento pode estar relacionada ao acometimento do tecido conjuntivo e RP positivo. Pacientes mais idosas e com um só sítio de metástase com RP positivo tendem a apresentar uma maior sobrevida livre da doença (Kuss e cols., 1997).

1.7.3. HER-2

A expressão da oncoproteína HER2, codificada pelo oncogene c-erbB-2, indica que o gene está amplificado, o que implica em uma maior agressividade tumoral e maior chance de metástases (Goldhirsch e cols., 2011). A expressão positiva de HER-2 indica um prognóstico mais agressivo para o paciente, e possui um valioso valor preditivo em relação aos benefícios clínicos a serem obtidos com o tratamento alvo-específico, trastuzumab (Piccart e cols., 2005).

1.7.4. Ki-67

O marcador da proliferação celular, Ki-67, é uma proteína nuclear, presente somente em células que estão em fase de divisão celular no ciclo celular (Kyle 2007; Sun e cols., 2015). O marcador Ki-67, estabelece correlação com o alto ou baixo grau histológico de inúmeras neoplasias,

associa-se a altas taxas de proliferação celular e favorece um menor tempo de sobrevida livre de doença (Kyle 2007; Sun e cols., 2015). Atualmente, Ki67 é um importante biomarcador utilizado na prática patológica clínica de rotina, com aplicações potenciais em prognóstico. Auxilia na dinâmica em medir eficácias de tratamento em amostras obtidas antes, durante e após a terapia neoadjuvante (Sun e cols., 2015).

1.8. Aspectos Fundamentais Sobre a Transição Epitélio-Mesenquimal

Esforços tem se concentrado na compreensão de como um tumor primário invade e dissemina-se, utilizando o mecanismo mediado pela mudança fenotípica de epitelial para mesenquimal, transição epitélio-mesenquimal - EMT (do inglês: *epithelial-mesenchymal transicion*) [Demirkan, 2013].

No processo biológico da EMT, as células epiteliais polarizadas sofrem modificações bioquímicas, moleculares e morfológicas, adquirindo fenótipo de célula mesenquimal (Sarkar e cols., 2009; Gunasinghe e cols., 2012; Scully e cols., 2012; Demirkan, 2013). Durante a embriogênese, o epitélio é bastante plástico, sendo capaz de se modificar para mesênquima e vice-versa, porém, mesmo após a sua completa diferenciação, o epitélio retém a capacidade de modificar seu fenótipo, auxiliando nos reparos teciduais (Sarkar e cols., 2009; Demirkan, 2013). Entretanto, possivelmente, na carcinogênese, a EMT se estabeleça para auxiliar a migração, invasão, resistência a apoptose e a

recidiva local (Gunasinghe e cols., 2012; Scully e cols., 2012; Yoomi e cols., 2013). Hipoteticamente a EMT permite que as células epiteliais tumorais percam sua polaridade celular e sua interação adesiva nas junções célula-célula (Gunasinghe e cols., 2012; Aleskandarany e cols., 2014). Acredita-se que concomitante ao mecanismo da EMT, ocorram alterações caracterizadas pela mudança do fenótipo epitelial para mesenquimal, acarretando perda ou reduzida expressão de marcadores epiteliais, tais como ECAD e Claudina, e elevada expressão de marcadores mesenquimais, como NCAD, Vimentina, e Twist (Peinado e cols., 2001; Sarkar e cols, 2009; Demirkan, 2013; Yoomi e cols., 2013; Steinestel e cols, 2014).

Yoomi e cols (2013), analisando a relação de marcadores epiteliais e mesenquimais com a evolução do tumor, observou que a perda da ECAD está associada aos carcinomas mais agressivos: com fenótipos HER2+ e triplo negativo. Acrescenta ainda, que a expressão de marcadores mesenquimais concomitantes à perda da ECAD, é maior em carcinomas invasivos quando comparados aos intraepiteliais..

A literatura endossa que a EMT desempenhe uma força motriz na sustentação de células tronco cancerígenas, subconjunto de células altamente tumorigênicas (Scully, 2012; Demirkan, 2013). Estudos imuno-histoquímicos, em biópsias pós-tratamento, têm indicado um aumento de células-tronco cancerígenas, presente em tumores de mama intrinsecamente resistentes à terapia convencional, com todas as características da EMT, possuindo capacidade de auto-renovação e possível regeneração tumoral (KASS e cols., 2007; Tse e Kalluri e cols., 2007). A EMT pode ocorrer de três formas com diferentes configurações biológicas e distintas funcionalidades, como mostra a

Figura 4. A) tipo I, estão associados com a implantação, formação do embrião e organogênese. Neste processo as células mesenquimais têm potencial fisiológico de sofrer a transição de mesenquimal para epitelial (MET) gerando epitélios secundários; B) tipo II, está associado com a cicatrização de feridas, regeneração de tecidos e a fibrose, auxiliando no mecanismo do reparo tecidual. Normalmente envolve fibroblastos e outras células relacionadas, a fim de reconstrução tecidual; C) tipo III, ocorre em células neoplásicas que sofreram alterações genéticas e epigenéticas, especificamente em genes que favorecem a excrecência clonal e o desenvolvimento de tumores. Estas modificações afetam especialmente a oncogênese e genes supressores tumorais, produzindo resultados muito diferentes do tipo I e II. As células do carcinoma submetidas ao tipo III podem invadir e metastatizar, favorecendo a progressão do tumor (Kalluri e cols., 2009).

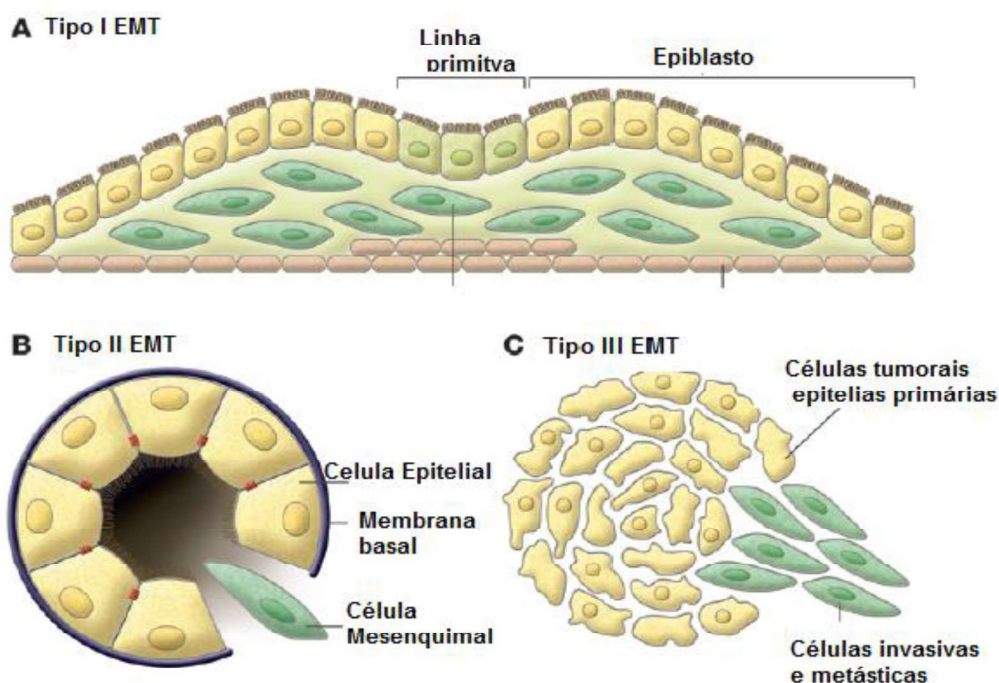


Figura 4: Classificação EMT. Três tipos com diferentes configurações biológicas e distintas funcionalidades. Adaptado de Kalluri e cols., 2009.

Em estudo, utilizando culturas celulares com diferentes níveis de expressão FGF10, marcador da EMT I, percebeu-se que as células cancerosas iniciaram o processo de metástase através da regulamentação dos mecanismos da EMT III, com considerável aumento da expressão de NCAD, e reduzida expressão do Gene da ECAD (Abolhassani e cols., 2014).

Existem evidências de que as células tumorais metastáticas apresentam um fenótipo epitelial semelhante ao tumor do sítio primário, a partir do qual foram derivadas (Nolan e cols., 2008). Após as células do tumor primário sofrerem a EMT e alcançarem sítios secundários, possivelmente sofram um processo inverso MET ao se alojar no novo sítio (Figura 5) [Ma e cols., 2008]. Possível fenômeno auxilie a colonização das células tumorais aos sítios secundários. Ambos os mecanismos, EMT e MET podem determinar estados latentes ou ativos do tumor, respectivamente, permitindo numerosos ciclos indeterminados de invasões à metástases (Kalluri, 2009; Książkiewicz, 2012). Aprofundar a compreensão do papel de algumas proteínas, tais como, ECAD e NCAD, poderá fornecer ferramentas importantes na compreensão da carcinogênese mamária (Gunasinghe e cols., 2012).

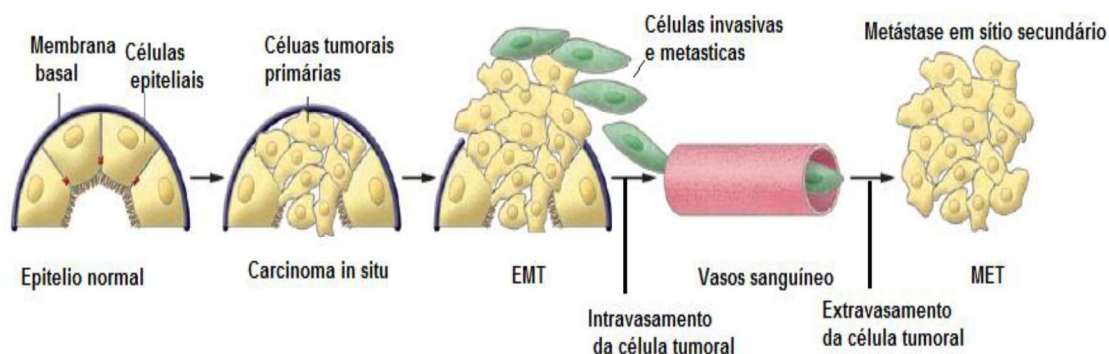


Figura 5. Possivelmente, após as células de o tumor primário sofrerem a EMT e alcançarem sítios secundários, sofram um processo inverso MET. Adaptado de Kalluri e cols., 2009.

1.9. Proteínas de Adesão “Caderinas”

A regulação da EMT passa por diversas classes de moléculas de adesão, entre elas, destaca-se a superfamília das caderinas, glicoproteínas responsáveis por sustentar a adequada adesão célula-célula (Ashaie e cols., 2016). Estas glicoproteínas transmembrana, cálcio dependentes, localizadas nas junções aderentes intercelulares, desempenham um papel fundamental na união celular dos vertebrados (Vleminckx e cols., 1991). As caderinas possuem diversas estruturas e funções, que quando alteradas, impedem o desenvolvimento das células mamárias normais e (ou) a manutenção fisiológica do tecido, favorecendo a malignidade da mama. As caderinas clássicas incluem: CDH1/E-caderina (epitelial), CDH2/N-caderina (neural), CDH3/P-caderina (placenta) e CDH4/R-caderina (retina), designadas devido sua distribuição tecidual. Existem, porém, mais de quarenta caderinas, grande parte expressa no cérebro. Aberrações nas expressões gênicas destas caderinas podem ocorrer devido a silenciamento somático ou epigenético (Ashaie e cols., 2016). Há suspeita de que as Caderinas E, N, P, VE, Proto, Desmossômicas e FAT possam exercer um papel importante na regulação do CM, e de que tanto a ECAD, como a NCAD contribuam significativamente para a EMT (Ashaie e cols., 2016). Na glândula mamaria a expressão das caderinas ocorre tanto de forma fisiológica como patológica. A proteína ECAD é exclusivamente expressa nas células epiteliais mamárias, enquanto a P-caderina é expressa em células epiteliais mamárias de ductos e alvéolos, mas também nas células mioepiteliais. As células mesenquimais do estroma

mamário expressam NCAD. Nas células epiteliais mamarias também encontra-se a R-caderina (Demirkan, 2013).

1.9.1. E-caderina

A proteína ECAD, localiza-se na superfície celular, entre as junções intercelulares, através de sua interação com as catenina p120, conforme figura 6. Numerosas moléculas sinalizadoras, como Notch, TGF- β , receptores de estrogênio, EGF e Wnt podem induzir o estímulo da cascata de sinalização da transcrição da expressão do mRNA da ECAD, e conseqüentemente controlar seu nível proteico (Ashaie e cols., 2016).

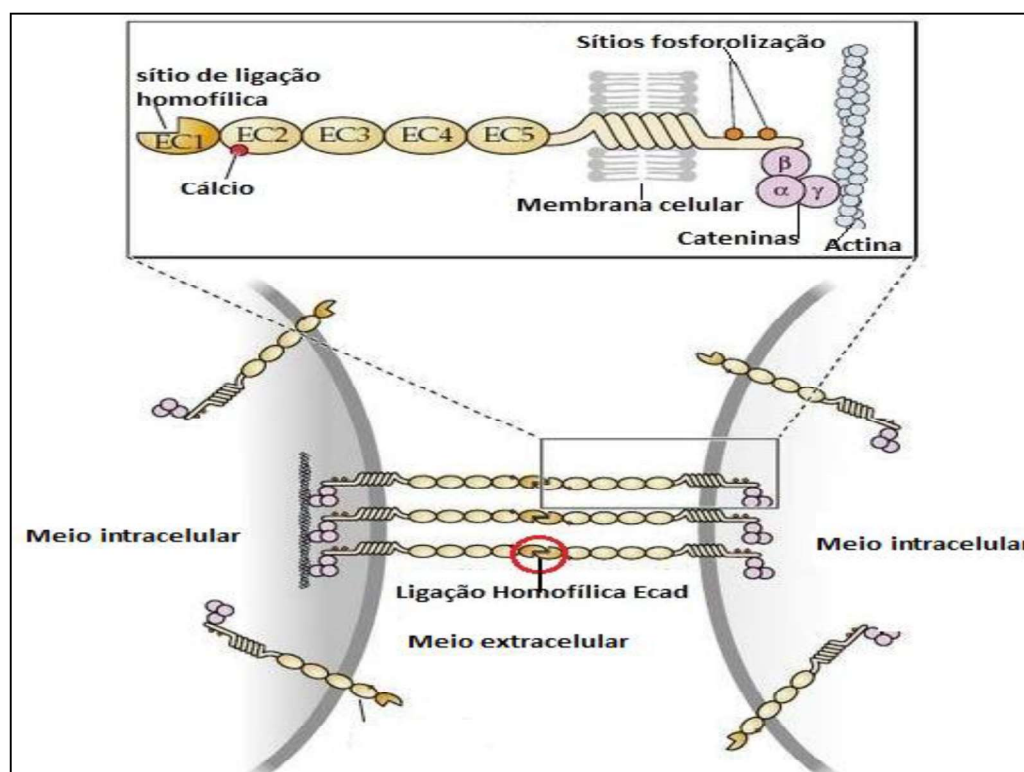


Figura 6. Molécula de caderina clássica representando o domínio extracelular com os cinco domínios de caderina e o domínio citoplasmático com as

cateninas p120, β -catenina e α -catenina responsáveis pela modulação das adesões e sinalização celular. Modificado: https://www.studyblue.com/notes/note/n/gmd_aula4_ecm/deck/995214. Acessado 25.01.2016.

A expressão ectópica da proteína ECAD resulta na perda de adesão célula-célula, ativação de marcadores mesenquimais e indução de motilidade celular (Karray-Chouayekh e cols., 2012). A ECAD, que serve como marcador da EMT, está associada a vários fatores Snail, Slug, Twist, Zeb, KLF4, NFI, TBX2, SIX, b-Myb, COX-2, Arf6, FOXA2, GATA3 e SMAR1, que modulam sua transcrição e parecem auxiliar a promoção ou reprimir a invasão tumoral (Ashaie e cols., 2016). Isto sugere que a diminuição da expressão da proteína ECAD auxilie o processo de EMT observado em muitas neoplasias (Karray-Chouayekh e cols., 2012). A expressão positiva da ECAD pode favorecer tumores de baixo grau histológico e limitado número de metástases linfáticas (Lialiaris e cols., 2011). Ao contrário da ECAD que é conhecida como supressora tumoral, a NCAD é conhecida por favorecer a motilidade, invasão e metástase das células cancerosas (Neiman e cols., 1999; Li e cols., 2001; Querzoli e cols., 2010; Rakha e cols., 2013). Pesquisadores analisando espécimes de CM primário observaram que níveis reduzidos de ECAD, prevaleciam entre os casos de câncer de mama triplo-negativo (CMTN), com metástases em linfonodos. Entre os CMTN, o prognóstico das pacientes com ausência de ECAD, foi significativamente pior comparado aos das ECAD - positivas (Kashiwagi e cols., 2010). O estadiamento de certos carcinomas tende a ser menor, quando associados a imunexpressão positiva da ECAD (Karray-Chouayekh e cols., 2012).

Indícios apontam que a alteração na expressão ou função ECAD está associada, não apenas com tumorigênese, mas também, à agressividade tumoral, podendo ser um evento adquirido durante o processo de progressão carcinogênica, como parte de instabilidade genômica, processo característico do CM de alto grau (2013; Rakha e cols., 2013). Normalmente, tumores com metilação no gene CDH1, apresentam expressão diminuída à ausente da ECAD e uma menor taxa de sobrevida, quando comparados com os pacientes ECAD positivos (S Kashiwagi e cols., 2010; KARRAY-CHOUAYEKH 2012). Objetivando explorar as possíveis associações entre os marcadores moleculares e imuno-histoquímicos e as características do subgrupo hereditário de CDI, estudiosos investigaram o estado de metilação do promotor de CDH1 associado a ECAD e relacionaram aos parâmetros clínicos dos pacientes. O grupo de pacientes com pouca ou nenhuma expressão HER2 concomitante com expressão ECAD positivos tiveram uma melhor sobrevida global, comparados ao grupo ECAD-/ HER2+. Em relação ao prognóstico, 80% dos casos ECAD positivos apresentaram pequeno tamanho do tumor. No entanto, os autores não conseguiram encontrar uma associação entre a expressão da ECAD com o potencial metastático, nem com o grau tumoral (karray-Chouayekh, 2012).

De modo controverso, estudos anteriores relataram que a forte imunoexpressão da ECAD pode estar correlacionada com pior sobrevida, maior tamanho do tumor e estado linfonodal positivo (Tan e cols., 1999). Na mesma linha, este marcador parece ter uma forte associação com o câncer de mama inflamatório (CMI), tipo muito agressivo de CM (Kleer e cols., 2001). Resultados, importantes, demonstram que 100% dos casos de CMI possuem

expressão de ECAD, independentemente do tipo histológico do tumor ou presença de ER, PR, ou HER2. Despertando a hipótese que a ECAD parece não funcionar como um gene supressor de tumor no CMI (Kleer e cols., 2001). Para outros pesquisadores a ECAD, pode estar mais relacionada ao tipo histológico e grau de diferenciação e menos relacionada ao potencial metastático (Rakha e cols., 2013). O papel da ECAD quanto supressor tumoral, ainda não está bem esclarecido (Qureshi e cols., 2006; Querzoli e cols., 2010).

Qureshi e col., (2006) relataram uma forte relação negativa entre a hiperexpressão da ECAD com o grau histológico tumoral. Entre as pacientes diagnosticadas com maior grau histológico, G3, 94% apresentaram imunopositividade ECAD, e apenas 6% apresentaram ECAD negativa. E ainda, 94% das pacientes ECAD-positivas, apresentaram receptor de estrogênio negativo. Não observando correlação significativa favorável deste marcador com nenhuma variável tumoral de bom prognóstico (Qureshi e cols., 2006). Este resultado foi ao encontro, com o resultado encontrado por Querzoli e cols (2010), que ao analisar a expressão da ECAD em CM, observaram que pacientes mais jovens, 34 a 40 anos hiperexpressavam ECAD e tinham mais frequentemente tumores de grau 2, e as de 41 a 50 anos apresentaram ausência ou hipoexpressão da ECAD. Já, entre o grupo de idade mais elevada (pós-menopausa) 51 a 90 anos, houve ausência ou média expressão de ECAD, associada ao menor grau histológico, G1. Neste estudo a pior taxa de sobrevivência ficou entre os pacientes que hiperexpressavam a ECAD (Querzoli e cols., 2010). Embora a literatura disponha de poucos desfechos semelhantes, para Querzoli e cols (2010), a imunopositividade de ECAD nem sempre será preditiva de um bom prognóstico no CM.

Outra evidência, que o gene ECAD não é um supressor tumoral, está no fato que no carcinoma ductal raramente apresenta expressão de ECAD negativa (Rakha e cols., 2013). A expressão de ECAD foi avaliada (por IHQ e anticorpo HECD-1), em uma série de carcinoma da mama não-lobular invasivo, e a correlação deste marcador com as características prognóstico do tumor primário foi investigada. Um total de 1.516 pacientes foram incluídos, somente 72 pacientes (7%), apresentaram ausência completa da ECAD, e estas foram associados ao pior prognóstico (Rakha e cols., 2005). O resultado sugere que a perda de ECAD em carcinomas invasivos não-lobular da mama, pode desempenhar um papel na progressão tumoral no desenvolvimento de metástases à distância e na recidiva (Rakha e cols., 2005). Mais tarde, Rakha e cols., (2013), resolveram investigar a relevância deste desfecho. Então, utilizaram dois anticorpos diferentes (HECD-1 e CDH1/4A2C7) para analisar a imunexpressão da ECAD nas 72 amostras com imunexpressão negativa para ECAD (Rakha e cols., 2013). Curiosamente, após análise dos casos, 94% apresentaram imunexpressão positiva para ECAD. Além disso, os estudos experimentais têm demonstrado que adesão célula-célula mediada por ECAD promove a sobrevivência das células, enquanto aglomerados tumorais, protegendo-as da quimioterapia e da destruição no sistema circulatório (Kantak e cols.,1998; Querzoli e cols., 2010).

1.9.2. N-caderina

A NCAD é uma proteína de 140 kDa, que liga-se indiretamente ao citoesqueleto de actina, através de interações com as proteínas catenina

citoplasmáticas. Desempenha um importante papel na migração, diferenciação, desenvolvimento embrionário, mas, também no comportamento metastático das células tumorais. As células mesenquimais do estroma mamário normalmente expressam NCAD. Identificada pela primeira vez em tecido de cérebro de camundongo, a NCAD foi posteriormente observada em diferentes tecidos normais, em tecidos neoplásicos de origem mesenquimal e epitelial, em tumores como pulmão, ovário e rins (Bremmer e cols., 2015). A expressão da NCAD é comum em tumores mais agressivos, RE-negativos ou HER2 positivo, o quê sugere que esta molécula pode atuar na progressão maligna (Qian, 2014). A habilidade da NCAD em acelerar os processos de mobilidade, invasão e metástase pode ser atribuída por sua aparente interação com o factor de crescimento de fibroblastos (FGF) e seu receptor (FGFR), e via GTPases Rho (Yilmaz e cols., 2010; Qian, 2014). Os inúmeros mecanismos pelos quais a NCAD atua vem sendo alvo de vários estudos, um deles é como a NCAD interage com o FGFR1 e atenua a sua ativação negativa, resultando na sustentada regulação das proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPK). Esta via de sinalização se liga as quinases reguladas por sinais extracelulares (ERK), formando o complexo MAPK-ERK, que ativa a transcrição do gene da Metaloproteinase-9 (MMP-9) e consequente invasividade celular (Qian, 2014).

Bremmer e cols., (2015), investigaram o potencial de inibição de NCAD como uma estratégia terapêutica, em tumores de testículo, células germinativas, in vitro e in vivo resistente à terapia com cisplatina. Em todas linhas celulares investigadas, foi encontrada a proteína Nacd expressa, tanto in vitro como in vivo. Em contrapartida, a regulação negativa de NCAD in vitro conduziu a uma inibição significativa da proliferação, migração e invasão, estimulando a

apoptose nas células estudadas (Bremmer e cols., 2015). Evidências, recentes, sugerem que a indução da EMT, *in vitro* e *in vivo*, pode ser ativada por diversos mecanismos, um deles seria a ativação da via de sinalização de Notch1 mediada por Snail / Slug.

Cao e cols. (2015) analisaram as expressões de Notch1, Slug, Snail, ECAD, NCAD e Vimentina, por IHQ, em um total de 200 amostras de CDI e 37 de tecido adjacente não neoplásico, correlacionando-as às características clínico-patológicas das pacientes. Nos casos de CDI versus os tecidos adjacentes não neoplásicos, observou-se uma percentagem significativamente elevada das proteínas: Notch1 (74%, 148/200), Slug (36%, 72/200), Snail (62%, 124/200) e NCAD (77%, 153/200), e uma baixa expressão da ECAD (27%, 54/200). Além disso, uma elevada expressão de Snail foi associada significativamente com baixa expressão de ECAD, e uma expressão elevada do Slug foi significativamente associada ao aumento da expressão de NCAD.

A literatura ainda não é consensual em relação à atuação destas proteínas no processo de carcinogênese. Entre os relatos distintos, encontram-se observações que a expressão induzida de ECAD, em células NCAD positivas, não reduz a mobilidade nem a sua capacidade invasiva, em contrapartida a expressão induzida de NCAD, em células ECAD positivas, tornam-nas mais invasivas, mesmo estas continuando a expressar altos níveis de ECAD (Nieman e cols., 1999).

1.10. Referências bibliográficas

Abolhassani A, Riazi GH, Azizi E, Amanpour S, Muhammadnejad S, Haddadi M, et al. FGF10: Type III Epithelial Mesenchymal Transition and Invasion in Breast Cancer Cell Lines. *J Cancer*. 2014 jun; 5(7): 537–547.

Abreu, E, Koifman S. "Fatores prognósticos no câncer da mama feminina". *Rev. bras. Cancerol*. 2002. 48(1):113-131.

American Cancer Society. *Breast Cancer Facts & Figures 2009-2010*. Atlanta: American Cancer Society, Inc.

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

Ashaie MA, Chowdhury EH. Cadherins: The Superfamily Critically Involved in Breast Cancer. *Curr Pharm Des*. 2016;22(5):616-38.

Atkinson RL, El-Zein R, Valero V, Lucci A, Bevers TB, Fouad T, et al. Epidemiological risk factors associated with inflammatory breast cancer subtypes. *Cancer Causes Control*. 2016 Mar;27(3):359-66.

Bouchardy C, Fioretta G, Verkooijen HM, Vlastos G, Schaefer P, Delaloye JF, et al. Recent increase of breast cancer incidence among women under the age of forty. *Br J Cancer*. Jun 4;96(11):1743-6.

Bradley KT. Prognostic and predictive factors in breast cancer. College of American Pathologists monthly article series. *NewsPath*. 2007 sept.

Bremmer F, Schallenberg S, Jarry H, Küffer S, Kaulfuss S, Burfeind P, et al. Role of N-cadherin in proliferation, migration, and invasion of germ cell tumours. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;6(32):33426-37.

Buitrago F, Uemura G, Sena MCF. "Fatores prognósticos em câncer de mama". *Com. Ciênc Saúde*. 2011; 22(1), 69-81.

Canello G, Maisonneuve P, Rotmensz N, Viale G, Mastropasqua MG, Pruneri G, et al. Prognosis and adjuvant treatment effects in selected breast cancer subtypes of very young women (<35 years) with operable breast cancer. *Ann Oncol*. 2010 Oct;21(10):1974-81.

Cao YW, Wan GX, Sun JP, Cui XB, Hu JM, Liang WH, et al. Implications of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*. 2015 Feb;31(2):70-6.

Chen D, Hueman MT, Henson DE, Schwartz AM. An algorithm for expanding the TNM staging system. *Future Oncol*. 2016 Feb 24.

Cianfrocca M, Goldstein LJ. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. *Oncologist*. 2004;9(6):606-16.

Colonna M, Delafosse P, Uhry Z, Poncet F, Arveux P, Molinie F, et al. Is breast cancer incidence increasing among young women? An analysis of the trend in France for the period 1983-2002. *Breast*. 2008 Jun;17(3):289-92.

da Rosa, L. M., & Radünz, V. (2012). Taxa de sobrevida na mulher com câncer de mama: estudo de revisão. *Texto & Contexto-Enfermagem*, 21(4), 980-989.

Demirkan B. The Roles of Epithelial-to-Mesenchymal Transition (EMT) and Mesenchymal-to-Epithelial Transition (MET) in Breast Cancer Bone Metastasis: Potential Targets for Prevention and Treatment. *J Clin Med*. 2013 Nov 22;2(4):264-82.

Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC cancer staging manual* (7th ed). New York, NY:Springer; 2010.

Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. C. W. Elston & I. O. Ellis. *Histopathology* 1991; 19; 403-410. *Histopathology*. 2002 Sep;41(3A):151-2.

Fisher B, Bauer M, Wickerham DL, Redmond CK, Fisher ER, Cruz AB, et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. *Cancer*. 1983 Nov 1;52(9):1551-7.

Fisher ER, Redmond C, Fisher B. Histologic grading of breast cancer. *Pathol Annu*. 1980;15(Pt 1):239-51.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Jul;124(7):966-78.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ, et al. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. *Ann Oncol*. 2011 Aug;22(8):1736-47.

Gunasinghe NP, Wells A, Thompson EW, Hugo HJ. Mesenchymal-epithelial transition (MET) as a mechanism for metastatic colonisation in breast cancer. *Cancer Metastasis Rev*. 2012 Dec;31(3-4):469-78.

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 May;17(5):1474-81.

Homan SG, Kayani N, Yun S. Risk Factors, Preventive Practices, and Health Care Among Breast Cancer Survivors, United States, 2010. *Prev Chronic Dis*. 2016 Jan 21;13:E09.

Hong Kong Cancer Registry (2004) *Cancer Registry Annual Report*. Hong Kong Hospital Authority.

Horne SD, Stevens JB, Abdallah BY, Liu G, Bremer SW, Ye CJ, et al. Why imatinib remains an exception of cancer research. *J Cell Physiol.* 2013 Apr;228(4):665-70.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). ABC do câncer: abordagens básicas para o controle do câncer / Instituto Nacional de Câncer. Rio de Janeiro: Inca, 2011;128il.

Instituto Nacional de Câncer. José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro. INCA. 2015; 122.

Jones J, Wang H, Karanam B, Theodore S, Dean-Colomb W, Welch DR, et al. Nuclear localization of Kaiso promotes the poorly differentiated phenotype and EMT in infiltrating ductal carcinomas. *Clin Exp Metastasis.* 2014 Jun;31(5):497-510.

Justo N, Wilking N, Jönsson B, Luciani S, Cazap E. A review of breast cancer care and outcomes in Latin America. *Oncologist.* 2013;18(3):248-56.

Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest.* 2009; 119:1420–1428.

Kamangar F, Dores MG, Anderson WF. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. *J Clin Oncol* 2006;(24): 2137-50.

Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Negative/low HER2 expression alone or combined with E-cadherin positivity is predictive of better prognosis in patients with breast carcinoma. *Histol Histopathol.* 2012 Mar; 27(3):377-85.

Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, Nomura S, Noda S, Kawajiri H, et al. Significance of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer. *Br J Cancer.* 2010 Jul 13;103(2):249-55.

Kleer CG, van Golen KL, Braun T, Merajver SD. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol.* 2001 May;14(5):458-64.

Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology.* 2012;79(4):195-208.

Kuss JT, Muss HB, Hoen H, Case LD. Tamoxifen as initial endocrine therapy for metastatic breast cancer: long term follow-up of two Piedmont Oncology Association (POA) trials. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Feb;42(3):265-74.

Lacey JV Jr, Kreimer AR, Buys SS, Marcus PM, Chang SC, Leitzmann MF. Breast cancer epidemiology according to recognized breast cancer risk factors in the Prostate, Lung, Colorectal and Ovarian (PLCO) Cancer Screening Trial Cohort. *BMC Cancer.* 2009 mar17;9:84.

Landini G - Software [Internet]. [citado 2012 jul 29]. Available de: <http://www.dentistry.bham.ac.uk/landinig/software/software.html#ruifrok>

Laste, PR. Estudo da expressão imuno-histoquímica da E-Caderina e da Vimentina em carcinomas uroteliais de bexiga de alto grau; Dissertação (Mestrado). UFCSPA, PPG-Patologia, 2012.

Lin F, Chen Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry: literature review and geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med*. 2014 Dec;138(12):1564-77.

Ma L, Weinberg RA. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet*. 2008 Sep;24(9):448-56.

Maalej M, Hentati D, Messai T, Kochbati L, El May A, Mrad K, et al. Breast cancer in Tunisia in 2004: a comparative clinical and epidemiological study. *Bull Cancer*. 2008 Feb;95(2):E5-9.

Masuda T, Xu X, Dimitriadis EK, Lahusen T, Deng CX. "DNA Binding Region" of BRCA1 Affects Genetic Stability through modulating the Intra-S-Phase Checkpoint. *Int J Biol Sci*. 2016 Jan 12;(2):133-43.

Menke CH, Pohlmann PR, Backes A, Cericatto R, Oliveira M, Bittelbrunn A, et al. Tumor size as a surrogate end point for the detection of early breast cancer: a 30-year (1972-2002), single-center experience in southern Brazil. *Breast J*. 2007 Set-Out; 13(5):448-56.

Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol*. 1999Nov1;147(3):631-44.

Parkin DM, Ferlay J, Hamdi-Cherif M, Sitas F, Thomas J, Wabinga H, et al. Breast cancer in Africa: Epidemiology and prevention. *IARC Sci Publ*. 2003;153:262-267.

Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.

Qian X, Anzovino A, Kim S, Suyama K, Yao J, Hult J, et al. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene*. 2014 Jun 26;33(26):3411-21.

Querzoli P, Coradini D, Pedriali M, Boracchi P, Ambrogi F, Raimondi E, ET al. An immunohistochemically positive E-cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Dec7;103(12):1835-9.

Qureshi HS, Linden MD, Divine G, Raju UB. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol*. 2006 Mar;125(3):377-85.

Rakha EA, Abd El Rehim D, Pinder SE, Lewis SA, Ellis IO. E-cadherin expression in invasive non-lobular carcinoma of the breast and its prognostic significance. *Histopathology*. 2005 Jun;46(6):685-93.

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

Rakha EA, Teoh TK, Lee AH, Nolan CC, Ellis IO, Green AR. Further evidence that E-cadherin is not a tumour suppressor gene in invasive ductal carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. *Histopathology.* 2013 Apr;62(5):695-701.

Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 1993Nov;11(11):2090-100.

Shaaban AM, Sloane JP, West CR, Foster CS: Breast cancer risk in usual ductal hyperplasia is defined by estrogen receptor-alpha and Ki-67 expression. *Am J Pathol.* 2002;160(2):597-604,

Shaw de Paredes E, Marsteller LP, Eden BV. Breast cancer in women 35 years of age and younger mammographic findings. *Radiology.* 1990 out; 177(1): 117-119.

Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica. Manuais de Condutas. *Rev Soc Bras de Oncologia Clínica.* 2011 out.

Sternfeld B, Weltzien E, Quesenberry CP Jr, Castillo AL, Kwan M, Slattery ML, et al. Physical activity and risk of recurrence and mortality in breast cancer survivors: findings from the LACE study. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009 Jan;18(1):87-95.

Sun J, Chen C, Wei W, Zheng H, Yuan J, Tu YI, et al. Associations and indications of Ki67 expression with clinicopathological parameters and molecular subtypes in invasive breast cancer: A population-based study. *Oncol Lett.* 2015 Sep;10(3):1741-1748.

Tan DS, Potts HW, Leong AC, Gillett CE, Skilton D, Harris WH, et al. The biological and prognostic significance of cell polarity and E-cadherin in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):20-7.

Vleminckx K, Vakaet L Jr, Mareel M, Fiers W, van Roy F. Genetic manipulation of E-cadherin expression by epithelial tumor cells reveals an

Willet WC, Rockhill B, Hankinson SE, et al. Epidemiology and Assessing and Managing Risk. In: *Diseases of the Breast*, 2th ed, edited by Jay R. Harris. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000:175.

Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 2010 May;8(5):629-42.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Estudar o perfil de expressão das proteínas E-caderina e N-caderina, através da técnica de imuno-histoquímica, em pacientes femininas com diagnóstico de carcinoma mamário.

2.2. Objetivos específicos

1. Quantificar, através de análise digital de imagem, a expressão imuno-histoquímica dos marcadores E-caderina e N-caderina nos casos de carcinoma mamário;
2. Estudar a relação entre a expressão IHQ da ECAD e NCAD no CM;
3. Correlacionar a expressão imuno-histquímica dos marcadores E-caderina e N-caderina, no CM com as variáveis:
 - a- grau histológico;
 - b- estadiamento;
 - c- sobrevida livre da doença.

3. Artigo científico redigido em português

Alta expressão da E-caderina está associada com alto grau histológico no câncer de mama: um estudo imunohistoquímico, com análise digital de imagem.

Ana Paula Fernandes, Andréa Fernandes, Moacyr Christopher Salem,
Rosalva Meurer, Adriana Roehe

Alta expressão da E-caderina está associada com alto grau histológico no câncer de mama: um estudo imuno-histoquímico, com análise digital de imagem.

Autores:

Ana Paula Fernandes¹, Andréa Fernandes¹, Moacyr Christopher Salem¹, Rosalva Meurer¹, Adriana Roehe, MD, PhD¹

¹ Departamento do Programa de Patologia, Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre – Porto Alegre (UFCSPA).

Palavras-chave: Câncer de Mama, E-caderina, N-caderina, Transição do Epitélio Mesenquimal.

Abreviaturas

CM	Câncer de mama
CMI	Câncer de mama inflamatório
CMTN	Câncer de mama triplo-negativo
DAB	Diaminobenzidina
ECAD	E-caderina
EMT	Transição epitélio-mesenquimal
FGF	Fator de crescimento fibroblasto
FGFR	Receptor do fator de crescimento fibroblasto
HER2	Receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano
IHQ	Imuno-histoquímica
NCAD	N-caderina
PPA	Porcentagem de área positiva
RE	Receptor de estrógeno
RGB	Vermelho Verde Azul (Red Green Blue)
ROC	Receiver Operating Characteristic
ROI	Regiões de interesse
RP	Receptor de progesterona
SLD	Sobrevida livre da doença

TIFF Tagged Image File
UFCSPA Universidade Federal de Ciência da Saúde de Porto Alegre

Resumo do artigo em Português

Introdução: No Brasil, o câncer da mama (CM) é a segunda principal causa de morbimortalidade no sexo feminino. Entre os fatores que buscam elucidar aspectos da sua carcinogênese está o estudo da transição epitélio-mesenquimal (EMT). Esta permite o destacamento de células tumorais, possibilitando maior invasão tecidual e metastatização. As proteínas E-caderina (ECAD) e N-caderina (NCAD) atuam na EMT, e alterações na sua expressão podem favorecer a progressão tumoral.

Objectivo: Analisar e quantificar, em espécimes de carcinoma mamário (CM), a expressão das proteínas ECAD e NCAD, correlacionando-as ao grau histológico, ao estadiamento (TMN) e à sobrevida livre de doença das pacientes.

Materiais e métodos: Foram analisadas 143 pacientes com CM, que concordaram em participar do estudo, assinando o TCLE. Secções de CM, emblocadas em parafina, foram incubadas com anticorpos específicos ECAD e NCAD. Os resultados das reações imuno-histoquímicas (IHC) foram quantificados, através análise de imagem digital, utilizando o método de deconvolução da cor e relacionados com graduação tumoral, estadiamento e taxa de sobrevida livre da doença das pacientes. Os resultados foram submetidos à análise estatística, considerando-se estatisticamente significativos valores de $p < 0,05$.

Resultados: As pacientes com o maior percentual de positividade para ECAD (82,40%) apresentaram o maior grau histológico ($p = 0,041$) e uma tendência a

estarem em estágio mais avançado (estádio IV) ($p = 0,057$). A expressão NCAD não foi significativamente associada à nenhuma das variáveis estudadas.

Conclusão: A hiperexpressão de ECAD em neoplasias de mama foi associada a tumores com maior grau histológico e, possivelmente, com estágio avançado. O papel da ECAD e da NCAD no fenômeno da EMT no câncer de mama ainda necessita de maior elucidação.

Palavras-chave: Câncer de Mama, E-caderina, N-caderina, Transição do Epitélio Mesenquimal.

Introdução

A adesão das células epiteliais determina a estrutura celular e a morfologia do tecido, regulando diversos eventos intracelulares, como apoptose, proliferação e motilidade celular¹. O mecanismo de adesão celular, através das interações proteína-proteína mediada pelas caderinas, é fundamental para manutenção do fenótipo epitelial^{2,3}. Em função disto estuda-se o papel da expressão das caderinas nos processos de migração e invasão celular, que ocorrerem durante a progressão tumoral, possibilitando o surgimento de metástases. Sugere-se que a diminuição da expressão da proteína E-caderina (ECAD) associada ao aumento da expressão da N-caderina (NCAD) auxilie a progressão tumoral, observada no câncer de mama, favorecendo a migração, através do estabelecimento do fenômeno conhecido como transição epitélio-mesenquimal (EMT)^{2,4-9}. A proteína ECAD, codificada pelo gene CDH1, localiza-se na superfície celular, entre as junções intercelulares. A expressão positiva da ECAD pode favorecer tumores de baixo grau histológico e limitado número de metástases linfáticas¹⁰. Ao contrário, observa-se que níveis reduzidos de ECAD, prevalecem entre os casos de câncer de mama triplo-negativo (CMTN) e metastáticos de mau prognóstico¹¹. Ao contrário da ECAD, o aumento da expressão da proteína NCAD, codificada pelo gene CDH2, vem sendo referido por favorecer a motilidade e a capacidade de invasão das células cancerosas^{1, 12-14}. A habilidade da NCAD em acelerar os processos de mobilidade e invasão pode ser atribuída por sua aparente interação com o fator de crescimento de fibroblastos (FGF) e seu receptor (FGFR), e a via GTPases Rho^{4,15,16}. A expressão da NCAD é comum em tumores mais agressivos, Receptor de estrógeno-negativos (RE) ou HER2-

positivos, sugerindo que esta molécula possa atuar conduzindo a progressão maligna¹⁶.

O objetivo deste trabalho foi observar os níveis de expressão imunohistoquímica das proteínas ECAD e NCAD no câncer de mama e correlacionando os mesmos com fatores clinicopatológicos.

Materiais e Métodos

Pacientes

Foram incluídas 143 pacientes do sexo feminino, diagnosticadas com câncer de mama (CM) submetidas à ressecção cirúrgica na Unidade de Mastologia do Hospital Fêmima (Grupo Hospitalar Conceição) no período de outubro de 2010 a outubro de 2011. Todas as pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Este estudo foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA (Parecer 1221/10) e do GHC (Parecer 11-037).

As características clinicopatológicas foram obtidas através dos exames anatomopatológicos e informações de registros médicos. O estadiamento tumoral foi estabelecido de acordo com o sistema TNM¹⁷.

A análise de sobrevida global e livre de doença foi realizada através do acompanhamento seriado das pacientes, realizado ambulatorialmente do Hospital Fêmima, de acordo com o protocolo padronizado pela Sociedade Brasileira de Mastologia.

Reação imuno-histoquímica (IHQ)

As reações IHQ foram realizadas no Laboratório de Pesquisa em Patologia da UFCSPA, conforme o Procedimento Operacional Padrão do laboratório. Na realização do estudo imuno-histoquímico utilizou-se espécime tumoral fixado em formalina 10%, incluso em parafina. Os blocos foram seccionados em espessura de 3µm, desparafinados e reidratados. Para ambas as proteínas a recuperação antigênica para foi realizada com Tris/EDTA® (pH 9,0), aquecido, 30 minutos, em banho-maria à temperatura de 92°C. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada. A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada, utilizando-se três banhos de 10 min em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 30V, a 5%, em metanol, posterior repetiu-se a lavagem anterior e mais duas em PBS, durante 5 minutos por agitação. O bloqueio das proteínas inespecíficas foi realizado com BSA® (albumina de soro bovino fração V) 1% por 1 hora. Utilizou-se anticorpo monoclonal mouse para detecção das proteínas, nas seguintes titulações: E-caderina 1/300 (G-10 Santa Cruz Biotechnology®) e N-caderina 1/100 (6G-11 DAKO®), incubando-se durante toda a noite, overnight, à temperatura de 4°C. Para os anticorpos secundários e terciários, utilizou-se o Kit PictureTM-MAX Polymer®, incubando-se por 40min (cada) à temperatura ambiente. Na incubação do controle interno negativo, foi utilizado uma amostra positiva do mesmo tecido, com os mesmos anticorpos, exceto o primário, que foi substituído por BSA 1%. Para controle positivo externo, foi utilizado tonsila palatina. A ligação antígeno-anticorpo foi visualizada com o cromógeno DAB (diaminobenzidina). A contra coloração foi feita com hematoxilina de Harris (Merck®); as lâminas foram desidratadas e montadas com resina sintética.

Análise das Reações IHQ

As lâminas foram digitalizadas em aumento de 400 X, utilizando o software (DP2-BSW) da câmera (Olympus DP72) acoplada ao microscópio (Olympus BX51), conectado ao computador. Áreas com hotspots IHQ foram registradas de forma não compactada (formato TIFF - Tagged Image File), com resolução de 1360 x 1024 pixels e 24 bits, no modelo de cor Vermelho Verde Azul (RGB). Visando obter dados quantitativos sobre a expressão dos anticorpos utilizamos o método de deconvolução de cor, como previamente descrito (18). Imagens de cor castanha, que representam DAB (áreas IHQ positivas), foram transformadas em imagens binárias, com um método automático implementado através de uma macro NIH- ImageJ, conforme desenvolvido por Landini (2012). Este plugin destaca imagens RGB, separando a hematoxilina (cor 1), o DAB (cor 2) e as cores complementares (cor 3, verde). A imagem é processada permitindo a quantificação da imunopositividade. Para analisar os nossos casos, uma macro foi programada para criar uma máscara de 50x50 pixels com fins de enquadrar as regiões de interesse (ROI). A máscara foi posicionada em quatro regiões da imagem binária, com foco nas regiões com maior positividade IHQ. As ROI foram lidas utilizando o software ImageJ, e os resultados foram registados como percentagem de ROI marcadas por transformação binária (percentagem de área positiva, PPA). Em cada caso, quatro medidas foram tomadas em quatro imagens, resultando em 16 medidas. Estas imagens foram analisadas como histograma e importadas para uma planilha (Excel 2007, Microsoft Office, CA, EUA). O histograma especifica dados sobre o número e a intensidade de pixels, permitindo a quantificação da quantidade de DAB em cada imagem, através de porcentagem. A Figura 1

mostra um caso de CMs com positividade para ECAD e a Figura 2 descreve a análise de deconvolução de cor.

Análise Estatística

Os dados foram analisados usando SPSS versão 23.0 para Windows. As variáveis quantitativas foram registradas como média e desvio padrão ou mediana e intervalo interquartil. As variáveis categóricas foram analisadas através de frequências absolutas e relativas. Utilizou-se o a Correlação de Pearson entre os dois marcadores analisados. Anova ou teste T com teste de Bonferroni para comparações múltiplas. Para determinar o ponto de corte com melhor sensibilidade e especificidade de cada anticorpo, para a análise de sobrevida, foi realizada uma análise Receiver Operating Characteristic (ROC). A análise de sobrevida foi demonstrado pela curva de Kaplan-Meier. Foi utilizada regressão de Cox para controlar possíveis fatores de confusão. Consideraram-se valores de p significativos menores do que 0,05.

Resultados

Foram estudadas 143 pacientes, com idade média de 54,70 anos (25 – 85 anos). A expressão IHQ ECAD positiva foi encontrada em 136 (95,1%) pacientes, com percentual médio de expressão 86,24% (\pm 59,78). A NCAD estava presente em 14 (9,8%) pacientes, com média de expressão de 81,99% (\pm 7,51). Entretanto correlação inversa entre os dois marcadores não significativa ($r = -0,391$; $p = 0,167$). A elevada expressão da ECAD parece diminuir a expressão da NCAD, figura 1. Os resultados das reações de IHQ

para ECAD e NCAD, considerando-se os pontos de corte estabelecidos na análise de imagem são expressos na Tabela 1.

O ponto de corte com melhor sensibilidade (40,0%) e especificidade (63,9%) para ECAD em 0,47 PPA foi de 83,4%. Ocorreu uma associação estatisticamente significativa entre expressão positiva deste marcador e o grau histológico do tumor ($p = 0,041$). Pacientes com tumores de grau 3 apresentaram maior média de positividade de ECAD 82,40%, em relação às pacientes com tumores de grau 1. O tempo médio de sobrevida livre doença (SLD) foi de 52,36 meses. Não houve associação estatisticamente significativa entre esse marcador e a SLD ($p = 0,079$), figura 2. Embora, a SLD diminua 3,7% para cada expressão ECAD positiva (OR = 0,96; IC 95%: 0,92-1,00). Em relação ao estadiamento tumoral, observou-se, que as pacientes em estágio I tiveram uma tendência a expressarem menores valores de ECAD ($p = 0,057$).

Considerando a NCAD, o ponto de corte com melhor sensibilidade (57,1%) e especificidade (98,3%) foi de 86,5% (PPA 0,48). Quatorze pacientes (9,79%) tiveram expressão IHQ positiva para NCAD, as análises foram realizadas somente em amostras que apresentaram marcadores. Entretanto, o número de pacientes com NCAD ficou pequeno para encontrar associações significativas, figura 3. Não foi observada relação estatisticamente positiva entre este marcador e as características clinicopatológicas estudadas.

Discussão

Alterações na expressão das moléculas ECAD e NCAD são frequentemente associadas com a progressão neoplásica do câncer de mama, devido ao fenômeno da EMT⁶.

Neste estudo procuramos estabelecer resultados quantitativos para expressão IHC das proteínas ECAD e NCAD, através de análise digital de imagem, e analisar sua relação com fatores clinicopatológicos no câncer de mama, incluindo sobrevida.

Observamos uma associação estatisticamente significativa entre expressão positiva da ECAD e o grau histológico. Pacientes com grau tumoral 1 tiveram menor expressão média do marcador. Resultado semelhante foi observado por Qureshi e cols, (2006) e Quezoli e cols., (2010), que relataram uma forte relação entre a hiperexpressão da ECAD com o grau histológico tumoral. Outros estudos também observaram que elevada expressão de ECAD pode estar relacionada com parâmetros de prognóstico desfavorável, como pior sobrevida, maior tamanho tumoral e presença de metástases linfonodais²⁰⁻²².

Em nosso estudo, não encontramos uma associação estatisticamente significativa entre os marcadores e a sobrevida livre de doença. No entanto, observamos que a SLD diminuiu 3,7% e 11,3% à medida que a expressão da ECAD e da NCAD elevam-se respectivamente. Demais estudos, de modo semelhante, mostraram maior relação dos marcadores com graduação e tipo histológico e não conseguiram estabelecer relação forte com a sobrevida^{1,23,24}.

Outro dado conflitante da literatura, em relação ao papel da ECAD sobre as neoplasias de mama, refere-se ao fato de que este marcador tem forte associação com o câncer de mama inflamatório (CMI), conhecido como uma das neoplasias de mama de maior agressividade²⁵. Resultados importantes demonstram que 100% dos casos de CMI, possuíam expressão ECAD positiva, independentemente do tipo histológico do tumor ou presença de ER, receptor de progesterona (PR) ou HER2/neu²⁵.

Considerando o estadiamento, observamos dados com relevância estatística limítrofe ($p = 0,057$) entre ECAD positiva e estágio IV. Querzoli e cols. (2010) também evidenciaram relação entre fatores de prognóstico desfavorável e alta expressão de ECAD. Segundo os autores, deve-se considerar a possibilidade de interação com outras proteínas da família das caderinas para melhor compreensão do mecanismo de atuação das mesmas sobre a EMT.

Fundamentado em um dos aspectos peculiares da transição epitelial-mesenquimal, a “*comutações de isoformas caderinas*”, que consiste numa regulação negativa de expressão de ECAD e uma regulação positiva concomitante de NCAD com efeitos profundos no fenótipo celular e comportamento, este estudo se propôs ainda à análise da relação entre ECAD e NCAD. Observamos uma correlação inversa, embora não estatisticamente relevante, entre os dois marcadores. Nossos resultados mostram que a elevada da expressão da ECAD parece diminuir a expressão da NCAD. Este achado está em concordância com o a troca de fenótipo epitelial para mesenquimal observada nas células com maior capacidade invasora, que define a EMT^{26,27}.

Os resultados deste estudo sugerem que a contribuição da expressão IHQ das proteínas ECAD e NCAD no câncer de mama talvez deva esconder interações biológicas complexas, que permeiam a EMT. A real contribuição da ECAD e da NCAD em relação ao câncer de mama ainda necessita uma investigação mais aprofundada.

Referências

- 1 Querzoli P, Coradini D, Pedriali M, Boracchi P, Ambrogi F, Raimondi E, et al. An immunohistochemically positive E-cadherin status is not always predictive for a good prognosis in human breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Dec7;103(12):1835-9.
- 2 Onder TT, Gupta PB, Mani SA, Yang J, Lander ES, Weinberg RA. Loss of E-cadherin promotes metastasis via multiple downstream transcriptional pathways. *Cancer Res*. 2008;68:3645–3654.
- 3 Horne SD, Stevens JB, Abdallah BY, Liu G, Bremer SW, Ye CJ, et al. Why imatinib remains an exception of cancer research. *J Cell Physiol*. 2013 Apr;228(4):665-70.
- 4 Suyama K, Shapiro I, Guttman M, Hazan RB. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell*. 2002 Oct;2(4):301-14.
- 5 Younis LK, El Sakka H, Haque I. The Prognostic Value of E-cadherin Expression in Breast Cancer. *Int J Health Sci (Qassim)*. 2007 Jan;1(1):43-51.
- 6 Karray-Chouayekh S, Trifa F, Khabir A, Sellami-Boudawara T, Frikha M, Gargouri A, Mokdad-Gargouri R. Negative/low HER2 expression alone or combined with E-cadherin positivity is predictive of better prognosis in patients with breast carcinoma. *Histol Histopathol*. 2012 Mar; 27(3):377-85
- 7 Breier G, Grosser M, Rezaei M. Endothelial cadherins in cancer. *Cell Tissue Res*. 2014 Mar;355(3):523-7.
- 8 Bremmer F, Schallenberg S, Jarry H, Küffer S, Kaulfuss S, Burfeind P, et al. Role of N-cadherin in proliferation, migration, and invasion of germ cell tumours. *Oncotarget*. 2015 Oct 20;6(32):33426-37.
- 9 Cao YW, Wan GX, Sun JP, Cui XB, Hu JM, Liang WH, et al. Implications of the Notch1-Snail/Slug-epithelial to mesenchymal transition axis for lymph node metastasis in infiltrating ductal carcinoma. *Kaohsiung J Med Sci*. 2015 Feb;31(2):70-6.
- 10 Lialiaris TS, Kouskoukis A, Georgiou G, Tripsianis G, Fiska A, Giatromanolaki A, et al. Expression of 6 common antigenic markers in invasive ductal breast carcinoma: potential clinical implications. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2011 Mar;19(2):106-11.
- 11 Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, Nomura S, Noda S, Kawajiri H, Ishikawa T, Wakasa K, Hirakawa K. Significance of E-cadherin expression in triple-negative breast cancer. *Br J Cancer*. 2010 Jul 13;103(2):249-55.

- 12 Nieman MT, Prudoff RS, Johnson KR, Wheelock MJ. N-cadherin promotes motility in human breast cancer cells regardless of their E-cadherin expression. *J Cell Biol.* 1999 Nov 1;147(3):631-44.
- 13 Li G, Satyamoorthy K, Herlyn M. N-cadherin-mediated intercellular interactions promote survival and migration of melanoma cells. *Cancer Res.* 2001 May 1;61(9):3819-25.
- 14 Rakha EA, Teoh TK, Lee AH, Nolan CC, Ellis IO, Green AR. Further evidence that E-cadherin is not a tumour suppressor gene in invasive ductal carcinoma of the breast: an immunohistochemical study. *Histopathology.* 2013 Apr;62(5):695-701.
- 15 Yilmaz M, Christofori G. Mechanisms of motility in metastasizing cells. *Mol Cancer Res.* 2010 May;8(5):629-42.
- 16 Qian X, Anzovino A, Kim S, Suyama K, Yao J, Hulit J, et al. N-cadherin/FGFR promotes metastasis through epithelial-to-mesenchymal transition and stem/progenitor cell-like properties. *Oncogene.* 2014 Jun 26;33(26):3411-21.
- 17 Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene FL, Trotti A, editors. *AJCC cancer staging manual (7th ed).* New York, NY:Springer; 2010.
- 18 Wang ZY, Zeng FQ, Zhu ZH, Jiang GS, Lv L, Wan F, et al. Evaluation of thymosin β 4 in the regulation of epithelial-mesenchymal transformation in urothelial carcinoma. *Urol. Oncol.* 2012 mar;30(2):167-76.
- 19 McConkey DJ, Lee S, Choi W, Tran M, Majewski T, Lee S, et al. Molecular genetics of bladder cancer: Emerging mechanisms of tumor initiation and progression. *Urol. Oncol.* 2010 ago;28(4):429-40.
- 20 Tan DS, Potts HW, Leong AC, Gillett CE, Skilton D, Harris WH, et al. The biological and prognostic significance of cell polarity and E-cadherin in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast. *J Pathol.* 1999 Sep;189(1):20-7.
- 21 Howard EM, Lau SK, Lyles RH, Birdsong GG, Tadros TS, Umbreit JN, Kochhar R. Correlation and expression of p53, HER-2, vascular endothelial growth factor (VEGF), and e-cadherin in a high-risk breast-cancer population. *Int J Clin Oncol.* 2004 Jun;9(3):154-60.
- 22 Howard EM, Lau SK, Lyles RH, Birdsong GG, Umbreit JN, Kochhar R. Expression of e-cadherin in high-risk breast cancer. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2005 Jan;131(1):14-8.

- 23 Cobanoglu U, Ersoz S, Turgutalp H, Reis A, Ozoran Y. Correlation of E-cadherin expression with clinicopathological parameters in breast carcinoma. *Saudi Med J*. 2004 Aug;25(8):1024-7.
- 24 Qureshi HS, Linden MD, Divine G, Raju UB. E-cadherin status in breast cancer correlates with histologic type but does not correlate with established prognostic parameters. *Am J Clin Pathol*. 2006 Mar;125(3):377-85.
- 25 Kleer CG, van Golen KL, Braun T, Merajver SD. Persistent E-cadherin expression in inflammatory breast cancer. *Mod Pathol*. 2001 May;14(5):458-64.
- 26 Nolan ME, Aranda V, Lee S, Lakshmi B, Basu S, Allred DC, Muthuswamy SK. The polarity protein Par6 induces cell proliferation and is overexpressed in breast cancer. *Cancer Res*. 2008 Oct 15;68(20):8201-9.
- 27 Ma L, Weinberg RA. Micromanagers of malignancy: role of microRNAs in regulating metastasis. *Trends Genet*. 2008 Sep;24(9):448-56.

Tabela 1. Demonstração dos resultados das reações de IHQ positivas para ECAD e NCAD, considerando-se os pontos de corte estabelecidos na análise de imagem.

Variáveis	ECAD n=136			NCAD n=14		
	n	média ± dp	p-valor	n	média ± dp	p-valor
Subtipos			0,628 **			0,925**
Luminal A	49	80,25 ±8,49		5	84,26 ±9,98	
Luminal B	18	80,92 ±6,17		2	82,72 ±5,13	
Luminal B HER2+	16	81,43 ±6,34		1	84,86 (—)	
HER2+	9	83,96 ±6,34		—	—	
Triplo negativo	20	79,47 ±7,01		3	79,81 ±10,33	
NI	24	—		3	—	
Grau histológico			0,041**			0,643**
T1	16	76,95 ^a ± 7,87		1	75,99(—)	
T2	73	80,99 ^{ab} ±7,57		9	83,24 ±9,03	
T3	38	82,40 ^d ±5,93		4	80,70±2,79	
NI	9	—		—	—	
Óbitos			0,263*			S/ p-valor
Sim	14	78,95 ±8,73		1	86,54(—)	
Não	113	81,243 ±6,98		12	81,86±7,99	
NI	9	—		1	—	
Números linfonodos			0,622**			0,464**

0	76	—	8	—
1	22	83,56 ± 4,95		
2	23	81,59 ± 8,48	2	87,28±10,55
3	7	83,05 ±6,05	2	80,47±1,95
NI	8	—	2	—
Tu cm de diâmetro		0,654**		0,292**
T1 - < 2 cm	47	80,69 ±7,45	2	78,27(±5,08)
T2 - 2 cm – 5 cm	43	81,85 ±5,92	1	76,80(—)
T3 - > 5 cm	7	78,30 ±11,70	1	94,74(—)
T4 - tamanho invadiu tórax ou pele.	24	81,49 ±8,55	6	82,63 ±7,11
NI	15	—	4	—
Metástase		0,951*		S/ p-valor
Sim	10	80,90 ±5,74	0	
Não	125	81,14 ±7,36	14	81,99(—)
NI	1	—		—
Recidiva		0,668*		0,944*
Sim	38	80,59 ±5,21	2	82,82 ±5,27
Não	90	81,36 ±7,40	10	82,34 ±8,75
NI	8	—	2	—
Estadiamento clínico		0,057**		S / p-valor
1	25	77,77 ±8,03	1	74,67 (—)
2	42	82,75 ±5,72	1	76,80(—)

3	58	81,16 ±7,75	12	83,04 ±7,62
4	9	81,09 ±5,06		
NI	2	—		
Receptor estrógeno			0,921*	0,495*
Sim	102	81,13 ±7,28	9	83,07 ± 7,79
Não	34	80,99 ±7,18	5	80,06 ±7,38
HER—2/neu			0,368*	0,793*
Sim	26	82,24 ±6,44	2	83,36 ± 2,12
Não	110	80,820 ± 7,40	12	81,77 ±8,11
Invasão vascular			0,171*	0,627*
Sim	55	82,36 ±7,74	5	80,47 ± 3,89
Não	54	80,49 ±6,39	5	82,51 ±8,17
NI	27	—	4	—
Idade	136	54 ,82±12,97	14	53,57±12,14

n = número de pacientes; NI = número sem informações para a variável; S/ p-valor = p sem valor; Tu cm = tumor em centímetro. * Teste t,** Anova.

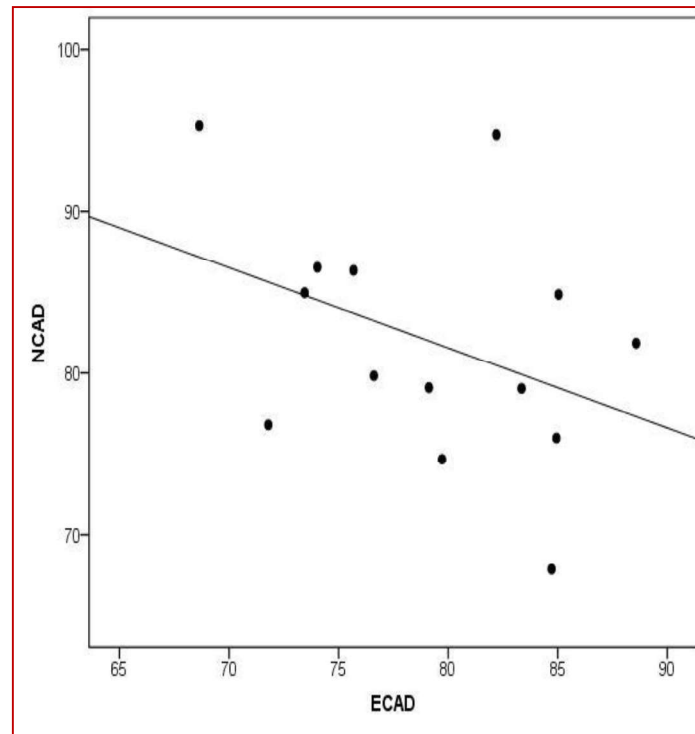


Figura 1. Aumento da expressão de ECAD induz a reduzida expressão da NCAD. Embora, a diferença não seja significativa ($r = -0.391$, $p = 0.167$).

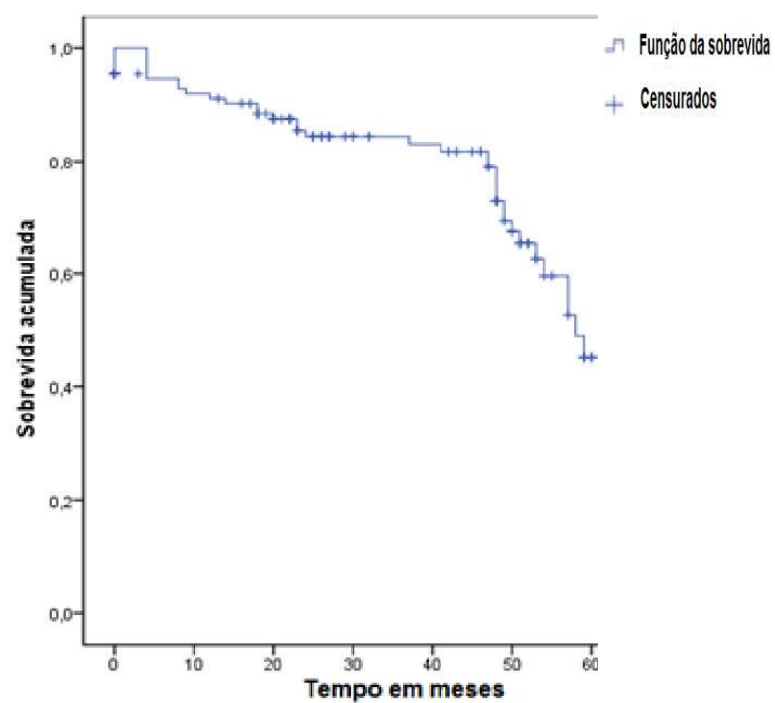


Figura 2. Curva de Kaplan-Meier, sobrevida livre de doença.

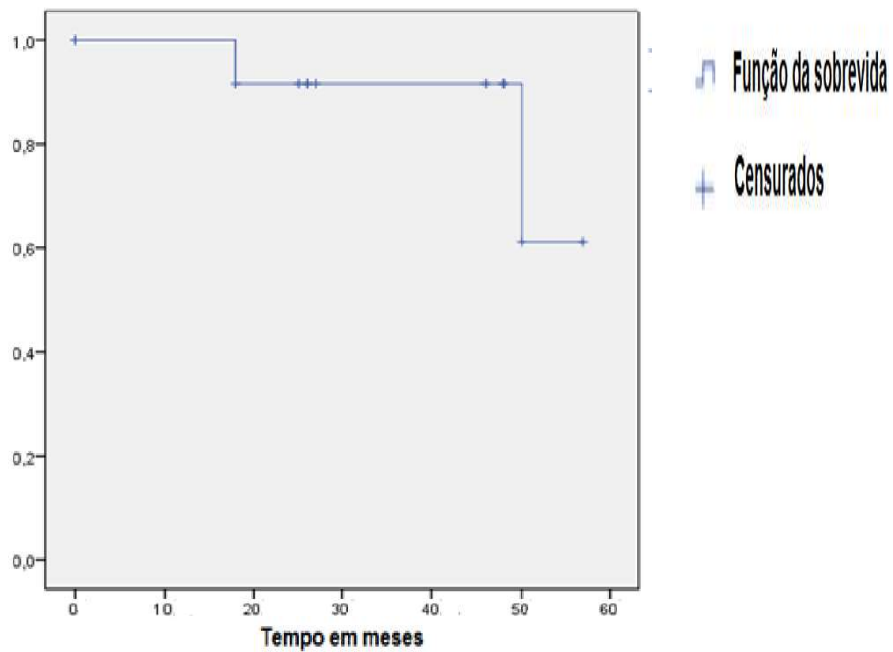


Figure 3. Curva de Kaplan-Meier para sobrevida livre de doença.

4. Considerações finais

A estimativa da taxa bruta de incidência por 100 mil habitantes, para o sexo feminino, do câncer de mama primário, para 2016 é de 90,20 para o estado do Rio Grande do Sul (RS) e 130,99 para capital Porto Alegre. Dada à magnitude destes dados a investigação de fatores relacionados à patogênese e ao prognóstico do câncer de mama é mandatória no RS.

Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi analisar o perfil de expressão de duas proteínas que participam da EMT, ECAD e NCAD utilizando a técnica de imuno-histoquímica, com análise digital de imagem, em pacientes com diagnóstico de carcinoma mama primário. Os resultados foram correlacionados com aspectos clínicopatológicos. Embora tenhamos encontrado resultados estatisticamente relevantes em relação à expressão da ECAD e o grau tumoral, ainda permanecem muitas dúvidas a respeito do papel das proteínas estudadas no CM e também na EMT. Entende-se que a EMT é um fenômeno extremamente complexo, que envolve diversas famílias de proteínas e fatores de transição e, que, dificilmente, o estudo isolado de duas proteínas seria capaz de elucidar todo seu mecanismo. Desta forma, ressalta-se a necessidade de amplos estudos, envolvendo um maior número de proteínas que atuam na EMT e com maior número de pacientes. Somente assim poderemos contribuir para elucidação de fatores relacionados à carcinogênese mamária.

5. Anexos

5.1. Materiais e Métodos

5.1.1. Análise Digital das Reações Imuno-Histoquímicas.

Para seleção e aquisição das áreas de interesse as imagens obtidas para análise, foram capturadas com microscopia de campo claro (microscópio *Olympus BX51*) em aumento de 400 X. Selecionou-se o campo com maior imunexpressão (alta marcação pelo cromógeno DAB, ou seja, maior tonalidade marrom) dos anticorpos estudados, as áreas foram digitalizadas utilizando o próprio software (DP2-BSW) da câmera acoplada (*Olympus DP72*) ao microscópio. Para cada lâmina (uma por caso), foram digitalizadas 04 imagens distintas, conforme ilustra figura 1.

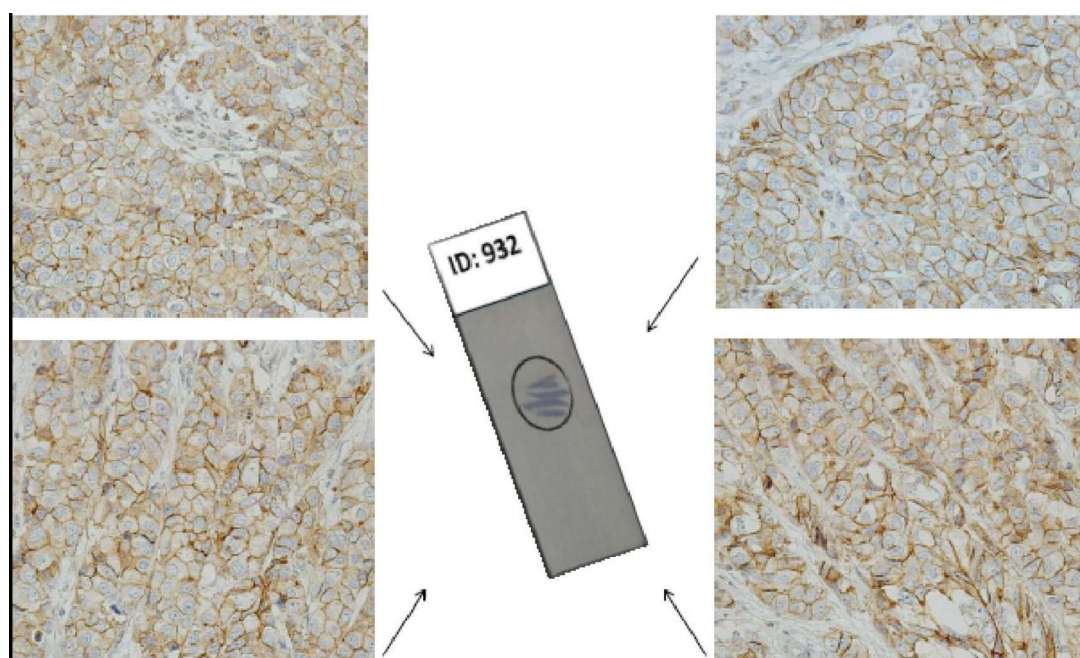


Figura 1. Em cada caso foram digitalizadas 04 imagens distintas. Posterior, analisada 04 áreas de cada, totalizando 16 áreas de maior interesse para cada caso.

As imagens foram gravadas em RGB (*Red, Green, Blue*) com profundidade de cor de 24 bits, dimensão de 1360 x 1024 pixels, em formato Tiff (*Tagged Image File Format*), arquivos de 5,3 megabyte .Figura 2.

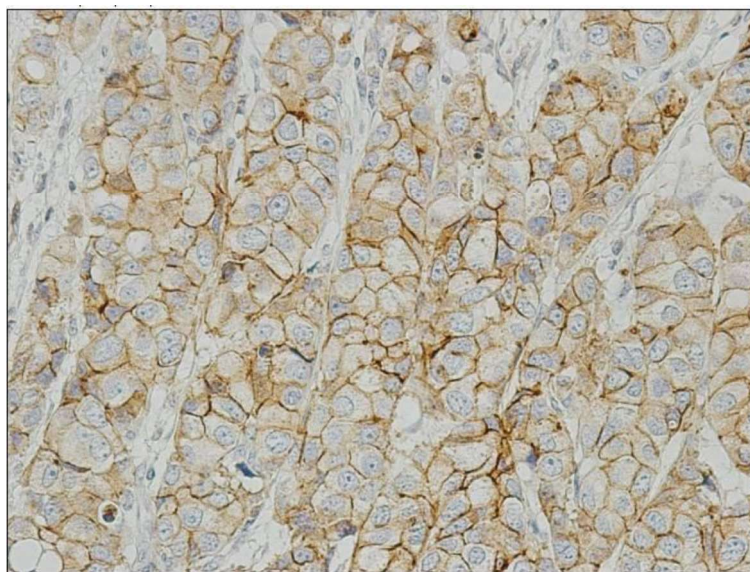


Figura 2. Exemplo de imagem de um caso armazenado em formato TIFF.

O processamento das áreas com maior imunorreação, foi realizado com o software de domínio publico ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, USA; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>), um aplicativo Java que pode ser executado na maioria dos sistemas operacionais. Figura (Laste, 2012; Landini, 2012).

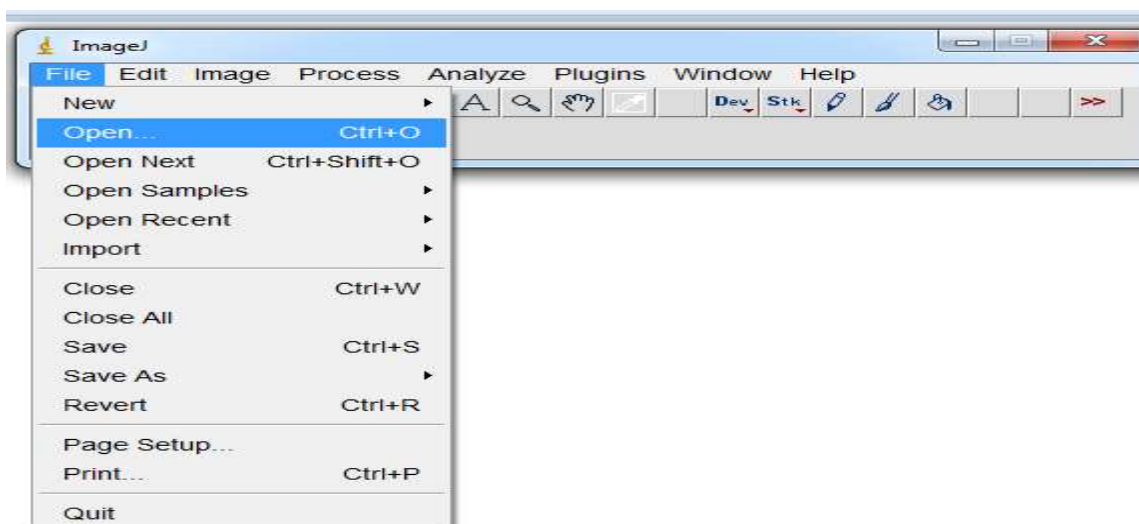


Figura 3. Acesso ao software ImageJ.

No presente estudo, o software ImageJ foi instalado em um computador, particular, com processador Intel® Core™ i5 (Intel Corporation, USA), com 4 gigabytes de memória RAM e sistema operacional Windows 7®, de 64 bits (Microsoft Corporation, USA). A análise da expressão dos anticorpos foi realizada através do método da deconvolução (DC), um plugin disponível no ImageJ. Figura 4.

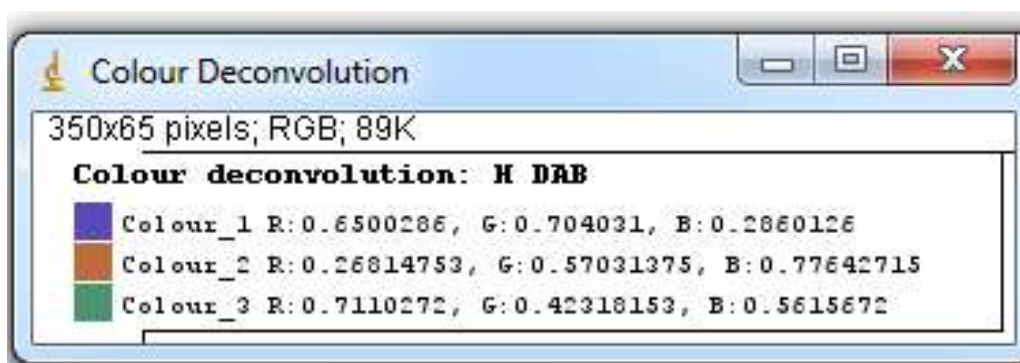


Figura 4. DC plugin

O método, distingue, isola as células marcadas positivamente com DAB das células negativas, ou seja, coradas com hematoxilina (Laste, 2012; Landini, 2012). Ao acessar o plugin DC, a cor da imagem decompõe-se em três outras imagens distintas: azul, verde, vermelha (Figura 5).

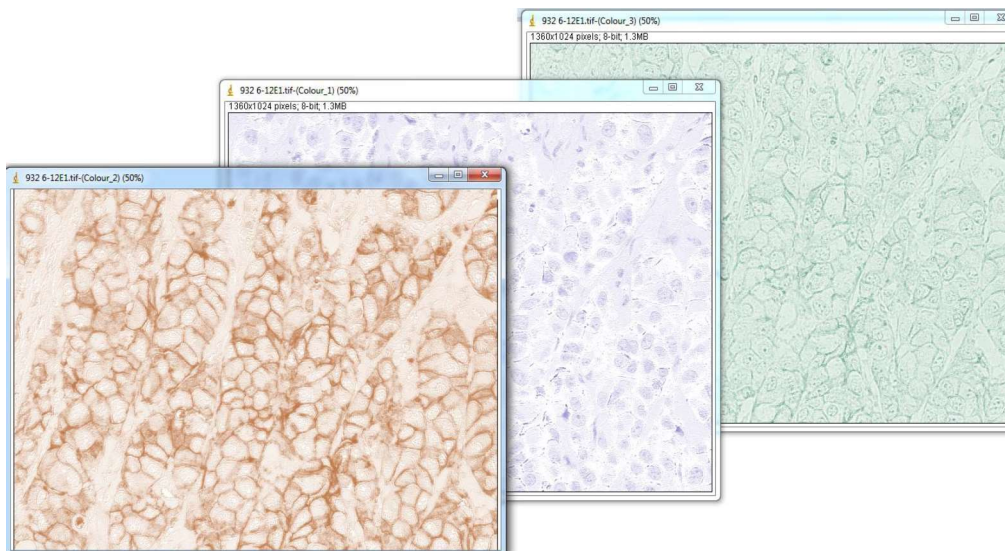


Figura 5. Decomposição da imagem em análise, em imagens azul, verde, vermelha.

5.1.1.2. Acessando o Plugin Deconvolução

A imagem vermelha corresponde à marcação positiva do cromógeno DAB, locais de imunorreação positiva. Consequentemente, esta imagem foi utilizada na quantificação dos anticorpos, descartando-se as demais. Seguidamente, através do *plugin* DC solicitou-se a transformação binária (separação das cores) da imagem vermelha e posterior quantificação das áreas de interesse. Figura 6.

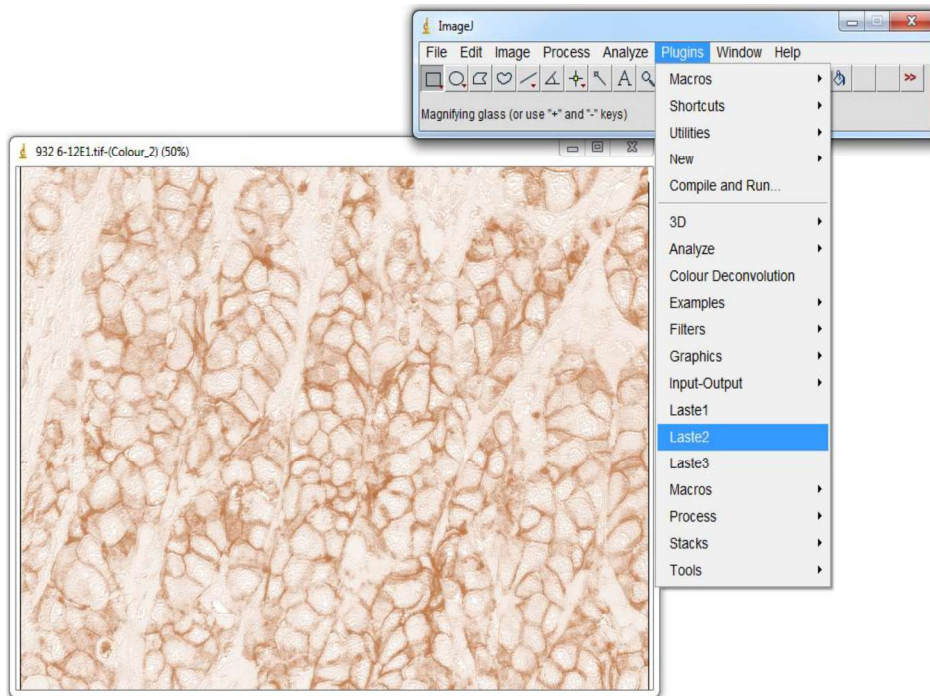


Figura 6. Transformação binária da imagem vermelha .

Utilizando-se a configuração padrão pré-determinada pelo *software* ImageJ na conversão binária, a imagem de cor vermelha foi convertida em cores preto e branco. As regiões pretas são as áreas de interesse, locais de imunorreação positiva (Figura 7).

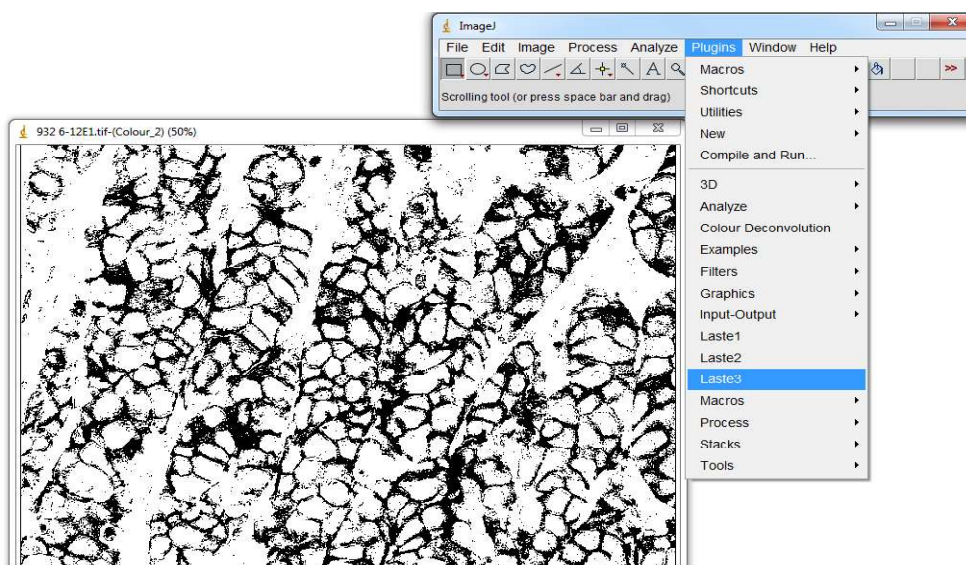


Figura 7. Imagem binária proveniente da cor vermelha, apresentando as áreas de maior interesse na cor preta.

5.1.1.3. Obtenção de dados quantitativos

Uma macro foi programada, no ImageJ, para a obtenção de uma máscara em forma de quadrado de 50 por 50 pixels na imagem binária (total 2500 pixels). O quadrado era direcionado para áreas de maior coloração preta, fixado no local adequado. Acionando, a tecla de atalho Ctrl M, atalho corresponde à seleção do comando Analyze (Analisar) seguida da seleção do sub-comando Measure (Medir); o Imagej calculava o percentual da fração da área e simultaneamente o resultado era transferido para na janela de resultados. Figura 8.

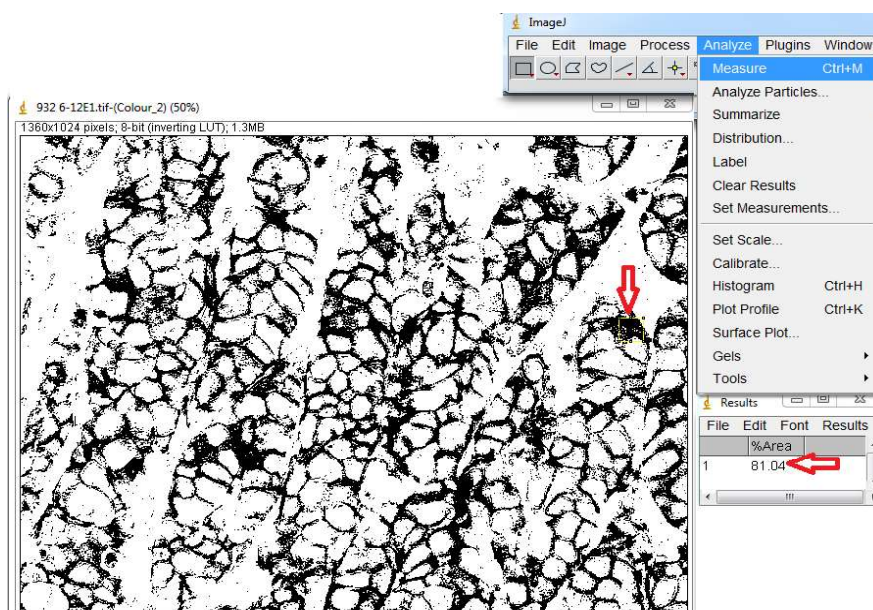


Figura 8. Resultado do cálculo do percentual da fração da área, quadrado de 50 por 50 pixels.

Quatro medidas foram realizadas, em cada uma das quatro imagens adquiridas por caso, totalizando 16 áreas de maior interesse. O resultado total

da porcentagem das frações das áreas foi transferido à tabela de cálculo da média e desvio padrão. Figura 9 e 10.

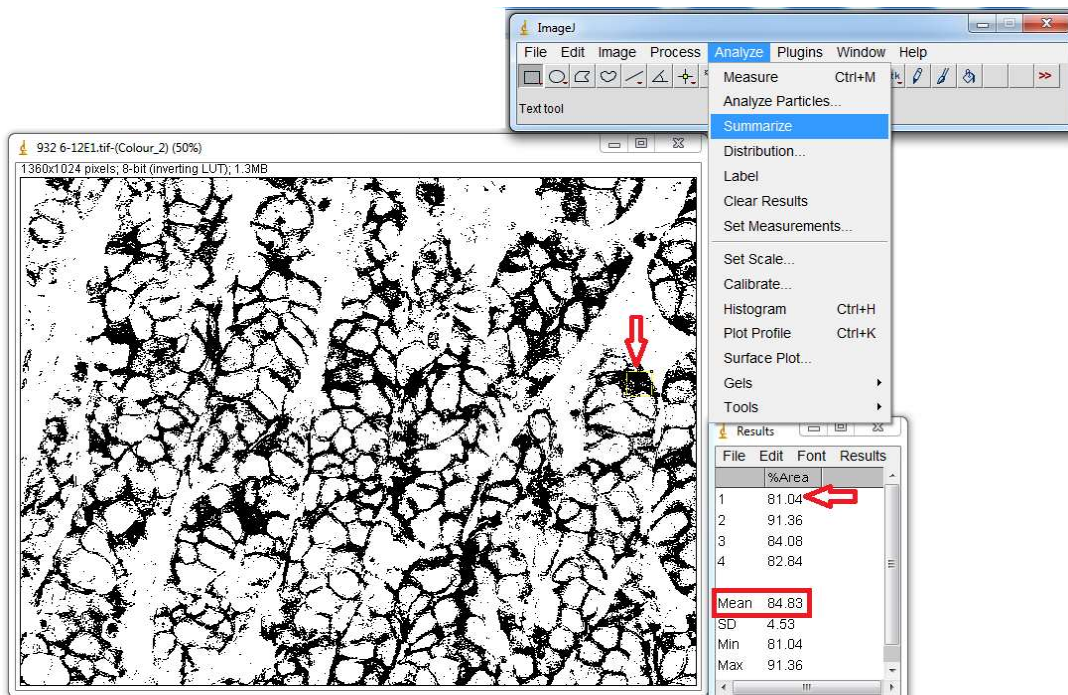


Figura 9. Quatro medidas foi realizada, em cada uma das quatro imagens adquiridas por caso.

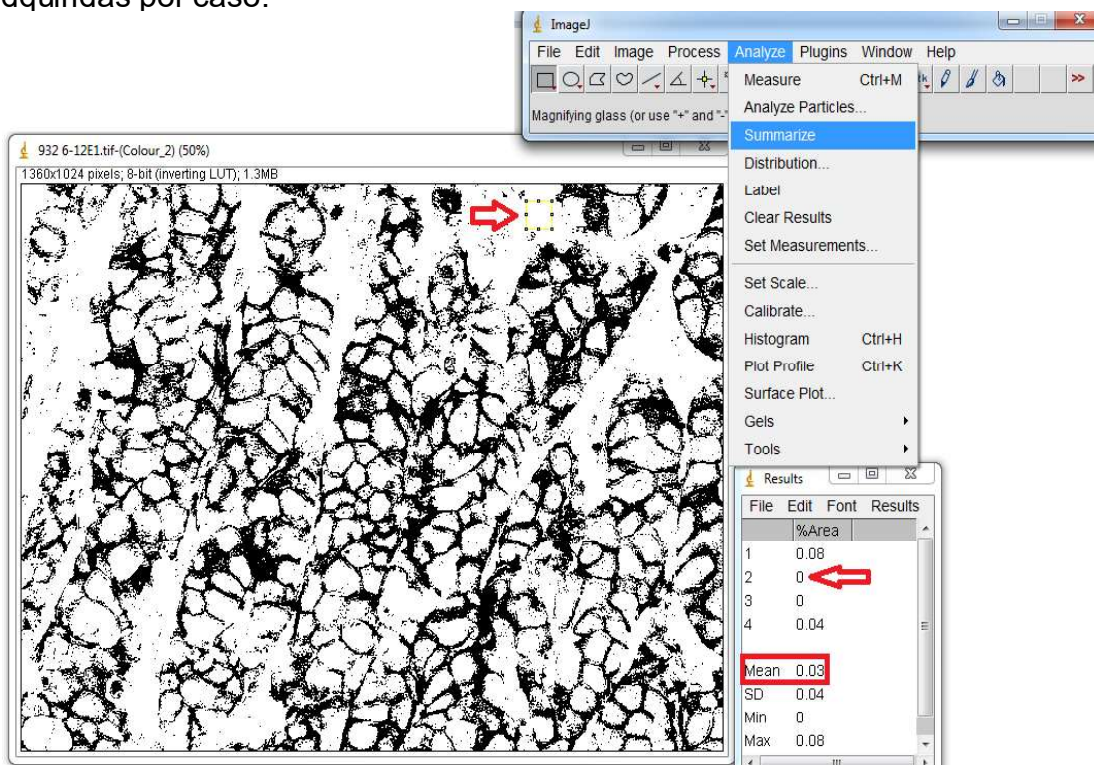


Figura 10. Exemplo do resultado, de área branca, sem marcação do cromógeno DAB.

5.2 Tabelas e Figuras da Análise Estatística

Tabela 1. Características gerais da amostra

Variáveis	n=143 f (%)*
Idade (anos) média \pm dp	54,71 (\pm 12,8)
Subtipo histológico	
1-Luminal A	52 (36,36)
2-Luminal B	18 (12,58)
3-Luminal B HER2+	17 (11,88)
4-HER2+	9 (6,29)
5-Triplo negativo	20 (13,98)
NI	27 (18,88)
Grau histológico	
G1	16 (11,19)
G2	76 (53,15)
G3	41 (28,67)
*SI	10 (6,99)
Números de linfonodos	
0	80 (55,94)
1	24 (16,78)
2	23 (16,08)
3	8 (5,59)
NI	8 (5,59)
Estadiamento clínico	
1	27(18,88)
2	44 (30,77)

3	61 (42,66)
4	9 (6,29)
NI	2 (1,40)

Tu cm de diâmetro.

T1 - < 2 cm	50 (34,97)
T2 - 2 cm – 5 cm	45 (31,47)
T3 - > 5 cm	8 (5,59)
T4 - qlq tamanho, invadiu tórax ou pele.	24 (16,78)
NI -	16 (1,19)

Metástase

Sim	10 (6,99)
Não	132 (92,31)
NI	1 (0,70)

Recidiva

Sim	40 (27,97)
Não	95 (66,43)
NI	8 (5,59)

Óbito

Sim	15 (10,49)
Não	119 (83,22)
NI	9 (6,29)

Recptor de estrógeno

Sim	109 (76,22)
Não	34 (23,78)

HER—2/neu

Sim	27 (18,88)
-----	------------

Não	16 (11,19)
Invasão vascular	
Sim	57 (39,86)
Não	58 (40,56)
NI	28 (19,58)
Marcadores	
N-cadherin	14 (9,79)
E-caderin	136 (95,10)

*Valores apresentados com números absolutos e percentuais (%), com o percentual obtido sobre o total de casos válidos.

**NI: número sem informações para a variável.

Ponto de corte para IHQ ECAD positiva, de acordo com a análise ROC, com a melhor sensibilidade (40,0%) e especificidade (63,9%) foi de 83,4% sob área positiva 0,47.

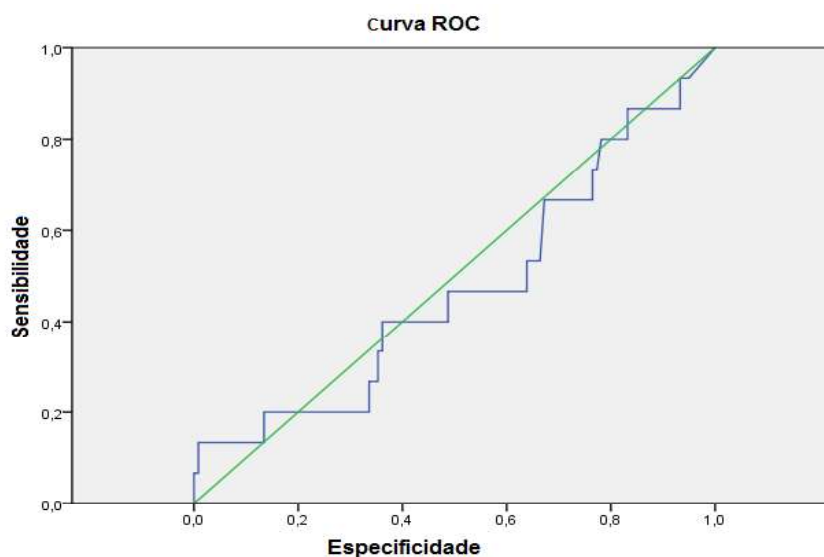


Figura 1. Curva ROC ECAD

Ponto de corte para IHQ NCAD positiva, de acordo com a análise ROC, com a melhor sensibilidade (7,1%) e especificidade (98,3%), foi de 86,5%, sob a área positiva 0,49.

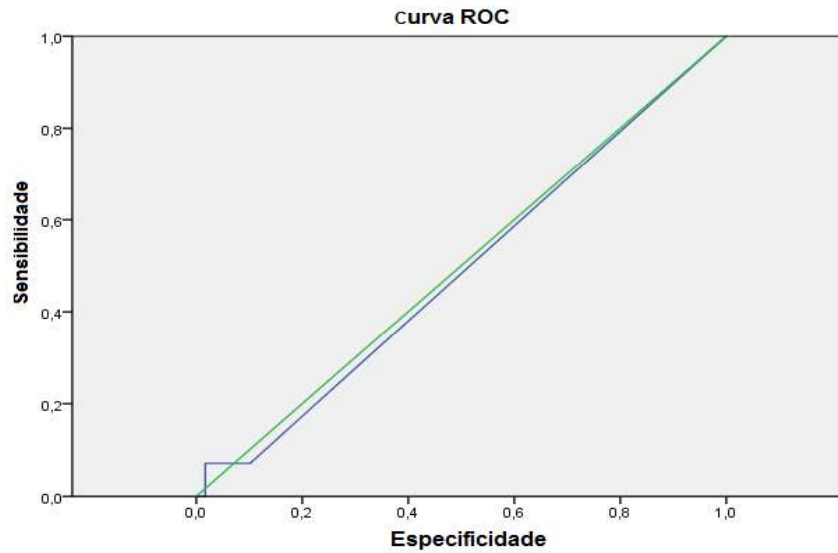


Figura 2. Curva ROC NCAD.

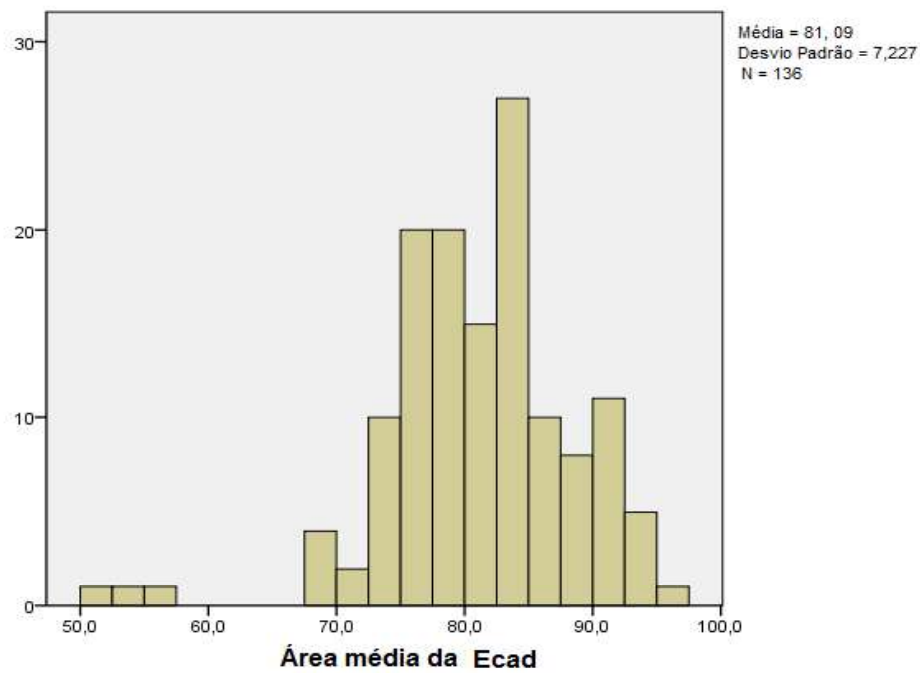


Figura 3. Área média da ECAD

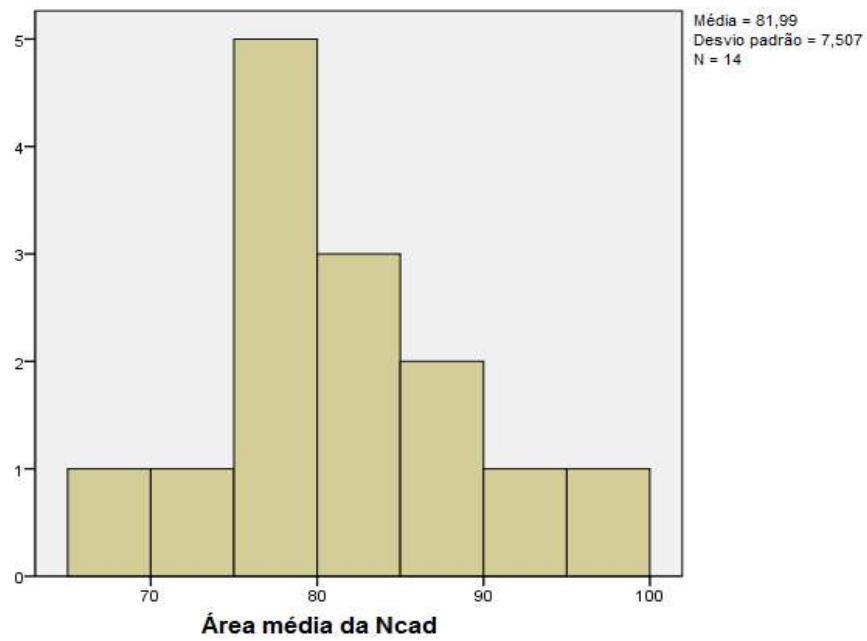


Figura 4. Área média da NCAD

5.3. Fotos da Imuno-Histoquímica

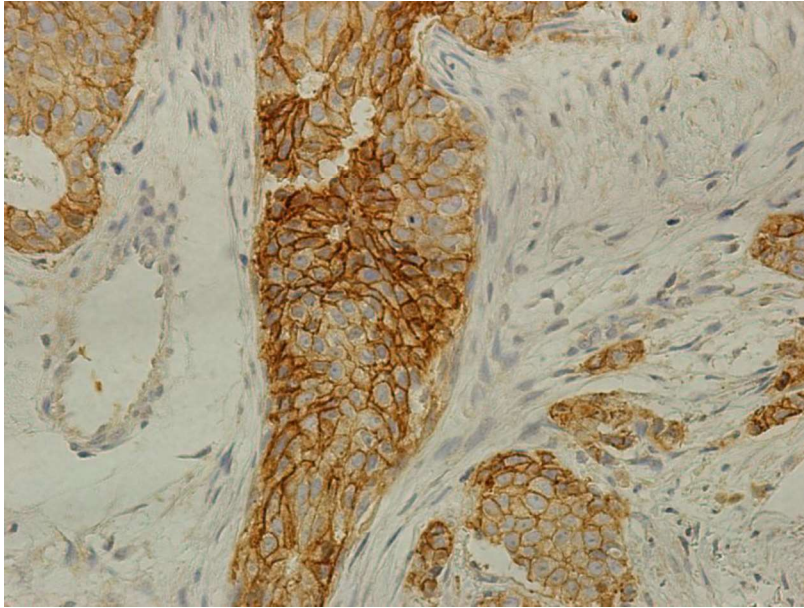


Foto 1. Expressão da ECAD no tumor 400X

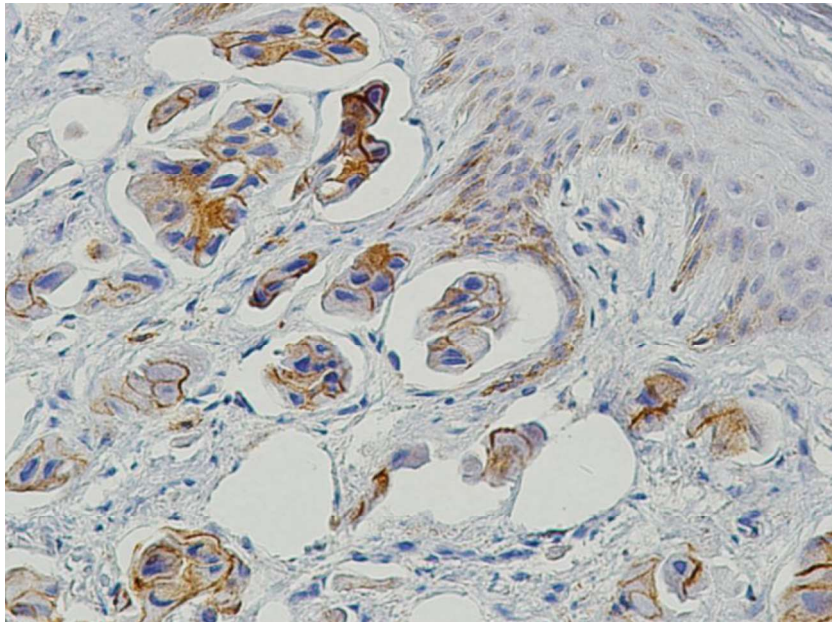


Foto 2. Expressão da NCAD no tumor 400X

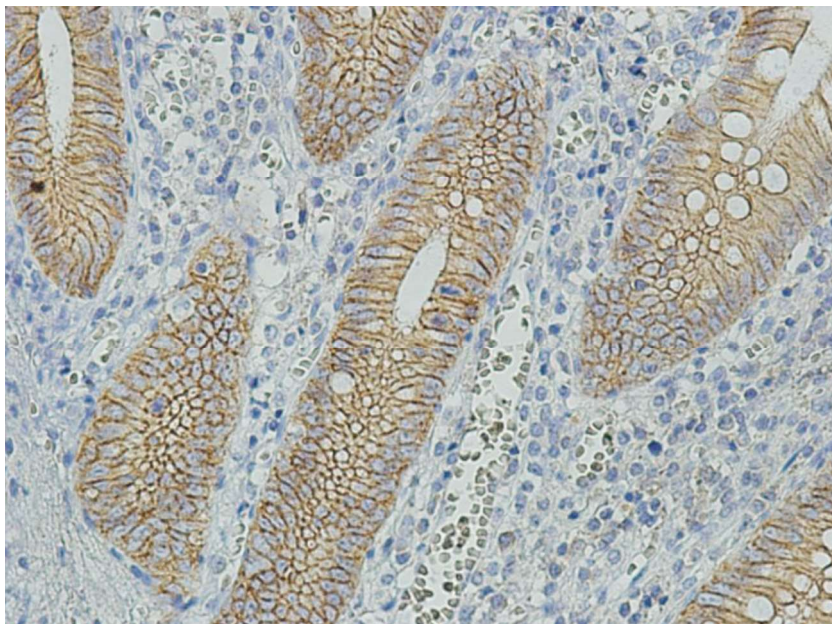


Foto 3. Expressão da ECAD no tumor 400X

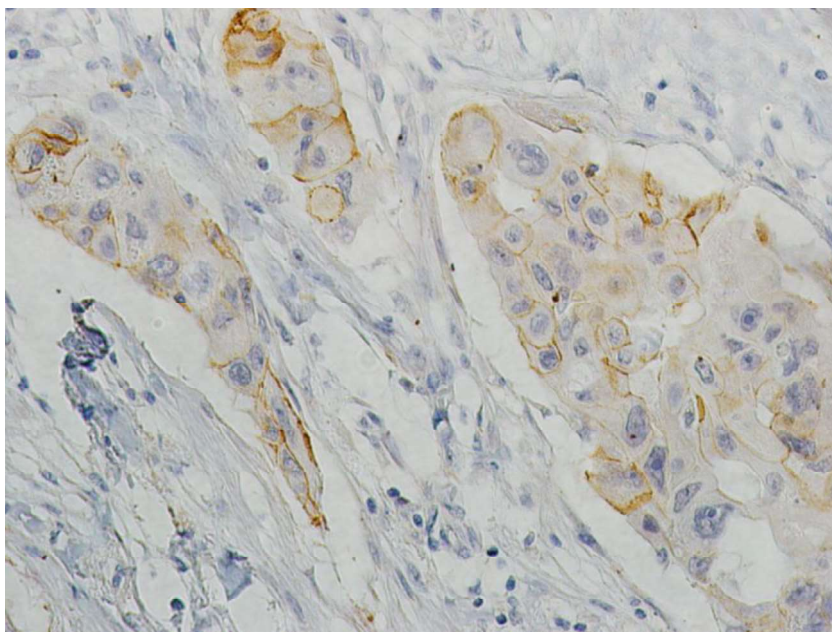


Foto 4. Expressão da NCAD no tumor 400X

5.4. Pareceres do Comitê de Ética



COMISSÃO CIENTÍFICA E COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA EM SAÚDE

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
UFCSPA

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

Projeto: 10-641

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

ADRIANA ROEHE

GRASIELA AGNES

CARMELA NICOLINI

BRUNA PEIXOTO DE SOUZA

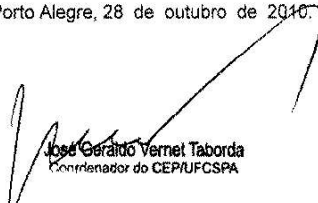
TALITA HAUBERT CERUTTI

CLÁUDIO OSMAR PEREIRA ALEXANDRE

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

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

Porto Alegre, 28 de outubro de 2010.


José Gerardo Vernet Taborda
Coordenador do CEP/UFCSPA



HOSPITAL N. S. DA CONCEIÇÃO S.A.
R. Francisco Teles, 596
CEP 91555-200 - Porto Alegre - RS
Fone: 3332.2200
CNPJ: 02.787.118/0001-20

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

HOSPITAL CRISTO REDENTOR S.A.
Rua Domingos Ribbo, 20
CEP 91340-000 - Porto Alegre - RS
Fone: 3357.4100
CNPJ: 02.787.126/0001-76

HOSPITAL FEMINA S.A.
Rua Mostardem, 11
CEP 91430-001 - Porto Alegre - RS
Fone: 3314.5200
CNPJ: 02.693.134/0001-63



Vinculados ao Ministério da Saúde - Decreto nº 99.244/90

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP/GHC

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

Projeto: 11-037

Versão do Projeto:

Versão do TCLE:

Pesquisadores:

ADRIANA VITAL ROEHE
GRASIELA AGNES
DANIELE L. DOS REIS SCHNEIDER
ANDRÉA PIRES SOUTO DAMIN

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

Documentação: Aprovados

Aspectos Metodológicos: Aprovados

Aspectos Éticos: Aprovados

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

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

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

Porto Alegre, 27 de abril de 2011.