

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

**Jaqueline Lessa Pinheiro**

**Marcadores de Apoptose no Câncer  
de Mama Metastático**

**UFCSPA**

Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre

**Porto Alegre  
2015**

**Jaqueline Lessa Pinheiro**

# **Marcadores de Apoptose no Câncer de Mama Metastático**

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

Orientador: Dr<sup>a</sup>. Claudia Giuliano Bica  
Co-orientador: Dr. João Carlos Prolla

**Porto Alegre  
2015**

#### Catologação na Publicação

Lessa Pinheiro, Jaqueline  
Marcadores de Apoptose no Câncer de Mama Metastático /  
Jaqueline Lessa Pinheiro. -- 2015.  
78 p. : graf., tab. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) -- Universidade Federal de  
Ciências da Saúde de Porto Alegre, Programa de  
Pós-Graduação em Patologia, 2015.

Orientador(a): Claudia Giuliano Bica ;  
coorientador(a): João Carlos Prolla .

1. BCL-2. 2. BAX. 3. Apoptose. 4. Câncer de mama. 5.  
Imunohistoquímica. I. Título.

## **Agradecimentos**

Primeiramente a Deus, por me guiar constantemente.

Aos meus pais, Luiz Carlos e Ceci, ao meu namorado, Marcelo, e ao meu cunhado João Pedro, pelo apoio imensurável durante toda esta caminhada, estando sempre ao meu lado. Vocês compartilharam comigo, durante os dois últimos anos, todas as alegrias, escolhas e desafios desta jornada, sempre com muito amor e incentivo. Com todo amor e carinho, é para vocês que dedico esta dissertação e a conclusão de mais esta etapa.

A todos familiares e amigos que torceram por esta conquista, que direta ou indiretamente dividiram histórias e momentos de descontração. Sem esquecer os companheiros, Bolinha, Choco, Royce e Toquinho, que cheios de lambidas e amor, sempre transformaram as horas de descanso na maior diversão.

A amiga e professora orientadora, Claudia G. Bica, pela oportunidade concedida, por demonstrar paciência e compreensão durante as limitações encontradas, e principalmente pela amizade e carinho compartilhado desde o início do TCC. Impossível não estender os agradecimentos, a amizade e gratidão das colegas orientandas da “Prof. Claudia”, que dividiram os sentimentos durante as dificuldades, o sucesso, as aflições e as comemorações. As alunas de IC, por todo o aprendizado e dedicação compartilhados. Ao Co-Orientador Dr. João Carlos Prolla, por sempre acrescentar conhecimento a todos que tem o privilégio de lhe conhecer. Muito obrigada.

A todos que direta ou indiretamente fazem o trabalho e a pesquisa acontecer. Aos funcionários do Arquivo Médico do Hospital Santa Rita - ISCMPA, do Laboratório de Patologia da ISCMPA, da UFCSPA, do Laboratório de Patologia da UFCSPA, da Secretaria e Coordenação do PPG – Patologia da UFCSPA, aos Professores. Sem palavras para agradecer o carinho, a amizade e principalmente os ensinamentos compartilhados. Impossível agradecer nominalmente todos que me ajudaram, seja participando com informações, ideias, ações, sugestões ou elaborando críticas. A todos que dividiram experiências nestes dois anos, deixo o meu muito obrigado de coração, e o desejo de que Deus sempre ilumine o caminho destes abençoados profissionais, que contribuem diariamente para a saúde da nossa comunidade.

*“Seja você quem for, seja qual for a posição social que você tenha na vida, a mais alta ou a mais baixa, tenha sempre como meta muita força, muita determinação e sempre faça tudo com muito amor e fé em Deus, que um dia você chega lá. De alguma maneira, você chega lá. ”*

*Ayrton Senna.*

## Sumário

<b>I. Lista de Abreviaturas</b>	V
<b>II. Resumo da Dissertação</b>	VI
<b>1. Introdução</b>	8
1.1. Epidemiologia do câncer de mama	8
1.2. Fatores de Risco	9
1.3. Patogenia	10
1.4. Câncer de Mama Metastático	11
1.5. Derrame Pleural Neoplásico	13
1.6. Sobrevida	14
1.7. Diagnóstico	15
1.8. Estadiamento	17
1.9. Marcadores Tumorais	19
1.10. Apoptose	21
1.11. Marcadores de Apoptose	24
1.12. Justificativa	26
1.13. Referências Bibliográficas	27
<b>2. Objetivos</b>	33
<b>3. Artigo Científico</b>	34
<b>4. Considerações Finais</b>	52
<b>5. Anexos</b>	54

**Lista de abreviaturas utilizadas**

*Bax*: *Bcl-2* “associated protein” X

*Bcl-2*: B-cell lymphoma protein 2

*BI-RADS*: Breast imaging reporting and data system

*EGFR*: epidermal growth factor receptor

*HER-2*: human epidermal growth factor

*Ki67*: antigen identified by monoclonal antibody ki-67

*Mib1*: Mindbomb E3 ubiquitin protein ligase 1

*p53*: gene de supressão tumoral

*RE*: Receptores de Estrógeno

*RP*: Receptores de Progesterona

*rTNF*: Receptores de fatores de necrose tumoral

*TGF- $\beta$* : transforming growth factor beta

*TNM*: Tumor-Nodo-Metástase

## Resumo da Dissertação

**Introdução:** O câncer de mama representa atualmente a principal causa de morte por câncer em mulheres. Estudos com genes envolvidos no processo apoptótico, visam ampliar o conhecimento da progressão tumoral, e estabelecer novos marcadores de prognóstico para estes pacientes.

**Objetivos:** Verificar a expressão de marcadores apoptóticos no câncer de mama metastático, e correlacionar com dados clínicos e patológicos destas pacientes.

### Material e Métodos:

Foram avaliadas 25 amostras de parafina de carcinomas mamários e 25 amostras de *cell block* do derrame pleural neoplásico, das mesmas pacientes. Os cortes foram submetidos à técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos de marcadores apoptóticos, *Bcl-2* e *Bax*. A avaliação imunohistoquímica foi executada por dois analistas, de forma independente, em microscopia óptica, e a análise dos dados foi executada com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007 e do software estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 18®).

**Resultados:** Observou-se que 100% (n=25) das amostras de tumor mamário e 96% (n= 24) das amostras de derrame pleural neoplásico foram positivas para o marcador Bax. Houve associação significativa entre o aumento da expressão de Bcl-2 no tumor mamário e a consequente diminuição da expressão de Bax



no derrame pleural neoplásico ( $p=0,045$ ). A proteína Bax esteve significativamente aumentada nos tumores mamários de estádios iniciais ( $p=0,040$ ). O desfecho óbito foi observado em 72% ( $n=18$ ) dos casos. Foi encontrada correlação entre a expressão de proteína pró – apoptótica e a diminuição do tempo de sobrevida entre o diagnóstico do derrame pleural e o óbito ( $p=0,041$ ).

**Conclusão:** Podemos observar que há relação entre o aumento da expressão de marcador anti-apoptótico no tumor primário e a conseqüente diminuição do marcador pro-apoptótico na metástase, e que o marcador de promoção apoptótica (Bax), está associado a melhores prognósticos e ao aumento da sobrevida de pacientes com câncer de mama metastático.

**Palavras-chave:** BCL-2, BAX, Apoptose, Câncer de mama, Imunohistoquímica

## **1. Introdução**

O carcinoma de mama é mundialmente conhecido como a neoplasia maligna mais comum entre o sexo feminino. Em função da crescente incidência mundial, das altas taxas de mortalidade e do elevado custo com o tratamento, o câncer mamário representa atualmente um importante problema de saúde pública em diversos países (Azevedo e Silva, 2012).

### **1.1. Epidemiologia do câncer de mama**

Conforme a International Agency for Research on Cancer, as incidências do câncer de mama variam de 19,3/100 mil mulheres na África Oriental para 89,7/100.000 mulheres na Europa Ocidental, sendo observadas em regiões desenvolvidas e em desenvolvimento. Segundo os últimos dados divulgados pelo Globocan 2012, o mais completo relatório sobre câncer no mundo, 1,7 milhões de novos casos de câncer de mama foram diagnosticados em 2012, representando 25% de todos os tipos de câncer (IARC, 2012).

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer estimou 57.120 novos casos para 2014. O Rio Grande do Sul é o segundo estado brasileiro com maior prevalência de tumores com localização primária na mama, com uma taxa bruta incidente de 87,72 casos para cada 100 mil habitantes, e Porto Alegre ocupa o primeiro lugar, entre as capitais brasileiras, com as maiores estimativas para esta neoplasia (INCA - 1, 2014).

Além destas altas taxas de incidência, o câncer de mama, é a quinta causa de morte por câncer em geral (522.000 óbitos) e a causa mais frequente

de morte por câncer em mulheres (IARC, 2012). Somente no ano de 2011, esta neoplasia ocasionou 13.345 óbitos no Brasil, sendo 99,10% no sexo feminino. Em nosso país, o Instituto Nacional do Câncer atribui tal fato ao grande número de diagnósticos realizados já em estádios avançados da doença (INCA - 2, 2014).

## **1.2. Fatores de Risco**

A etiologia desta neoplasia é multifatorial, englobando uma interação entre fatores genéticos, ambientais e um grupo amplo de fatores comportamentais (Pollock e cols., 2006).

Alguns dos principais fatores de risco para neoplasia mamária são: o uso de hormônios (anticoncepcionais orais e a terapia de reposição hormonal), a idade da menarca (precoce, antes dos 12 anos) e menopausa tardia (após os 50 anos), a obesidade, o tabagismo e consumo diário de bebidas alcoólicas, a paridade e a idade da primeira gestação (após os 30 anos), a predisposição genética e o histórico familiar de câncer de mama (Barnett e cols., 2008).

Pesquisadores ainda ressaltam que os fatores de risco para câncer de mama representam importantes indicadores para o prognóstico da doença, e assim estão diretamente relacionados à sobrevida das pacientes (Nelson e cols., 2012).

A prevenção torna-se possível quando existe uma relação clara entre a doença e seus agentes causadores. O câncer de mama tem sua etiologia ainda desconhecida, entretanto existem vários fatores de risco amplamente conhecidos e identificados nas pacientes diagnosticadas com esta neoplasia, o

que auxilia a elaboração e implementação de programas educativos, de promoção à saúde e controle a esta doença (Borghesan e cols., 2008).

### 1.3. Patogenia

O câncer mamário é uma patologia heterogênea, podendo ser apresentada através de variadas manifestações clínicas e morfológicas, além de suas diferentes assinaturas genéticas e graus de agressividade, que refletem em consequentes diferenças nas respostas terapêuticas (Cianfrocca M, Gradishar W, 2009).

O tipo histológico de neoplasia da mama mais frequente é o adenocarcinoma (tumor originado do epitélio glandular), que pode ser de origem ductal ou lobular, em 90% e 5% dos casos respectivamente (Li Ci e cols., 2005). Todos os outros tipos possíveis, como tumores filóides, sarcomas, carcinomas de células escamosas e linfomas compõem menos que 5% do total (Kumar e cols., 2005).

Os carcinomas ainda podem ser divididos em *in situ* e *invasivos*. O carcinoma *in situ* representa de 1 a 6% de todos os tumores malignos da mama, e refere-se à neoplasia de células limitadas aos ductos e lóbulos pela membrana basal. Já o carcinoma *invasivo* difunde-se ao estroma por ultrapassar a membrana basal, e também pode causar invasão vascular linfática, alcançando os linfonodos regionais e distantes. O *carcinoma invasor* representa cerca de 65 a 85% dos tumores de mama, além de apresentar normalmente um pior prognóstico para as pacientes (Kumar e cols., 2005).

#### **1.4. Câncer de Mama Metastático**

O câncer de mama metastático é em grande parte incurável, exceto quando ocorrem casos locorreionais operáveis. Metástases à distância estão diretamente relacionadas às baixas taxas de sobrevivência de pacientes com carcinoma mamário (Jung e cols., 2012).

Sabe-se que o risco de recorrência neoplásica é influenciado, entre outros fatores, pelo estágio no momento do diagnóstico inicial e pela biologia tumoral apresentada. O tamanho da massa tumoral, o envolvimento dos linfonodos, o grau histológico e a expressão dos receptores hormonais (RE e RP) e do oncogene HER2 são fatores de risco independente para a ocorrência de metástase (Chia e cols., 2008; Kennecke e cols., 2010).

Embora não haja locais preferenciais, os sítios mais frequentes são pulmões, ossos, fígado e cérebro (Yokota e cols., 2000).

Os pulmões representam um frequente sítio de metástase por tumor mamário (Yhim e cols., 2010). Acredita-se que 55% das pacientes com carcinoma de mama evoluam ao óbito por complicações pulmonares. As metástases pulmonares podem ser divididas de duas formas: viscerais e pleurais, e os sintomas são variáveis, além de indicarem um mau prognóstico quando estão presentes. Embora possam ocorrer lesões endobrônquicas, as formas nodulares são mais comuns, e não produzem sintomas. O tratamento padrão para a maioria dos eventos pulmonares é a quimioterapia (Menke e cols., 2007).

O esqueleto é um dos órgãos mais suscetíveis a sítio de metástase, e a maioria dos pacientes que morrem por câncer de mama e de pulmão, possui

metástase óssea (De Vita e cols., 2008). Através da corrente sanguínea, as células tumorais atingem os ossos, preferencialmente os de sustentação, instalando-se e produzindo peptídeos que transformam o fator de crescimento TGF- $\beta$ , que então passa a destruir o osso. A sobrevida média após a recorrência da doença nos ossos é de 20 meses, e tumores com receptor estrogênico positivo, de graus I e II, e lobulares tem maior tendência a desenvolver esse tipo de metástase. O tratamento para pacientes com metástase única nos ossos baseia-se em radioterapia e uso de hormonioterapia, como tamoxifeno e modernos inibidores da aromatase (anastrozole e letrozole). Em casos que há associação com metástases em outros sítios utiliza-se a quimioterapia (Menke e cols., 2007).

As metástases hepáticas são geralmente fatais, e quando surgem os sintomas, muitas pacientes apresentam-se debilitadas, com um grau importante de disfunção. O tratamento é quimioterápico, pois exige uma resposta imediata sobre as células tumorais, e quando há ascite volumosa, impõe-se a paracentese de alívio (Menke e cols., 2007). Atualmente, vêm sendo estudadas as vantagens da realização da hepatectomia, que têm apresentado relação com o aumento da sobrevida destes pacientes (Chua e cols., 2011).

Em 10% dos casos de neoplasia mamária, ocorrem metástases cerebrais, onde a sobrevida média com bons fatores prognósticos é em torno de 6 meses, uma vez que as pacientes tratadas geralmente morrem de doença disseminada, antes de ter recorrência dos sintomas neurológicos. A radioterapia é considerada o tratamento padrão para estes casos (Menke e cols., 2007).

Também com frequência acontecem as metástases axilares, que em 50% das vezes acometem mulheres com câncer de mama. O tratamento apresenta bons resultados através da mastectomia, da radioterapia da mama e de drenagens linfáticas seguidas de quimioterapia adjuvante (Forones e cols., 2005).

### **1.5. Derrame Pleural Neoplásico**

O derrame pleural neoplásico é uma frequente complicação de pacientes oncológicos, e indica a disseminação ou progressão da doença primária, além de relacionar-se à redução da expectativa de vida (Van Galen e cols., 2010). A média de sobrevida após o diagnóstico depende diretamente do estágio e do tipo de tumor primário, sendo o câncer de pulmão, linfoma e de mama os maiores responsáveis pela formação destes derrames metastáticos (Teixeira e cols., 2006).

Os derrames pleurais são comumente observados em pacientes com câncer de mama metastático (Pokieser e cols., 2004). Especialmente, entre as mulheres, cerca de 65% dos casos de derrames pleurais neoplásicos são decorrentes da neoplasia mamária (Santos e cols., 2000). Este sítio metastático tem sido associado a maus prognósticos nestas pacientes, com sobrevida média de 6 meses (Santos e cols., 2012).

Fatores prognósticos favoráveis são encontrados quando o derrame pleural é o único sítio de metástase do câncer de mama, bem como, tem relação com o tempo de retardo de seu surgimento, a partir do diagnóstico da neoplasia mamária (Van Galen e cols., 2010).

O líquido pleural torna-se um sítio de células malignas, quando existe neoplasia primária ou metastática, e o diagnóstico definitivo do derrame pleural neoplásico exige a confirmação citológica. O líquido coletado é coado e centrifugado, e o sedimento é utilizado na preparação de lâminas que são coradas por Papanicolau, para a pesquisa e identificação de células neoplásicas (Fauci e cols., 2008).

### **1.6. Sobrevida**

Apesar do câncer de mama ser considerado um carcinoma de bom prognóstico, o Brasil ainda possui elevadas taxas de mortalidade relacionadas a esta neoplasia, e provavelmente isso ocorra em virtude da doença ainda ser diagnosticada em estádios avançados (INCA - 2, 2014).

Na população mundial, estima-se entre os pacientes com câncer de mama uma sobrevida média de cinco anos em 61% casos, sendo que em países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 85%, e nos países em desenvolvimento esta taxa varia entre 50% e 60% (INCA - 2, 2014).

O estadiamento, a idade durante o diagnóstico do câncer de mama, o tipo histológico do tumor e o status dos receptores hormonais estão entre os principais fatores prognósticos relacionados com a sobrevida de mulheres com carcinoma mamário (Schneider e d'Orsi. 2009).

Em relação aos estádios clínicos do câncer de mama, a probabilidade de sobrevida de cinco anos é: Estádio 0: 98%, Estádio I: 90%, Estádio II: 70%, Estádio III: 50%, Estádio IV: 15% (Silveira, 2008).

Pacientes com carcinoma de mama metastático apresentam baixos índices de sobrevida, e em recente estudo, pesquisadores observaram que a



expressão de receptores hormonais e da proteína HER-2, o intervalo livre de metástases, e a localização do foco metastático, foram os fatores prognósticos mais relevantes para a sobrevida (Jung e cols., 2012).

Em relação aos sítios de metástase associados ao carcinoma de mama metastático, observa-se que pacientes com recorrência da doença nos ossos apresentam uma sobrevida média de 20 meses, e nos casos em que há disseminação da doença para o cérebro, a sobrevida média cai para aproximadamente 6 meses (Menke e cols., 2007). Quanto ao diagnóstico de derrame pleural neoplásico em pacientes com tumor primário na mama, pesquisadores verificaram que a sobrevida média varia entre 6 a 9 meses (Santos e cols., 2012; Van Galen e cols., 2010).

As taxas de sobrevida podem ser utilizadas para estimar a acessibilidade ao diagnóstico e tratamento do câncer de mama. Desta forma, dados que referem a sobrevida de pacientes com carcinoma mamário contribuem para as medidas de controle a esta neoplasia (Moraes e cols., 2006).

### **1.7. Diagnóstico**

O câncer é uma patologia com diversos aspectos clínico-patológicos, podendo ser detectado em vários estágios de evolução histopatológica e clínica (INCA - 2, 2014).

O acesso e o tempo para o diagnóstico do câncer de mama variam nas diversas regiões de nosso país, e estão diretamente relacionados às chances

de cura, (Trufelli e cols., 2008), e as taxas de sobrevida dos pacientes (Tierney e cols., 2006).

A **Mamografia** é uma técnica útil para a detecção precoce do câncer de mama, e está relacionada à redução da mortalidade por neoplasia mamária em mulheres entre 39 e 69 anos de idade (Nelson e cols., 2012). Cânceres de crescimento lento podem ser identificados por este exame, por pelo menos dois anos antes de alcançar um tamanho detectável à palpação. As pacientes que apresentam uma massa dominante ou suspeita, devem ser submetidas à biopsia, apesar dos achados mamográficos. A mamografia nunca substitui a biopsia, pois pode não revelar câncer em mamas muito densas, e alterações fibrocísticas em mulheres jovens (Tierney e cols., 2006). Cerca de 30% das anormalidades detectadas por esta técnica são carcinomas ductais *in situ*, e mais de 50% dos cânceres invasivos tem diâmetro inferior a 1 cm (Pollock e cols., 2006).

Para a padronização dos laudos de mamografia, foi criada a classificação conhecida pela sigla BI-RADS (*Breast imaging reporting and data system*), que tem por objetivo a sistematização dos laudos (ACR, 2013).

O exame de **Ultrassonografia** é realizado principalmente para diferenciar lesões sólidas de lesões císticas. Embora não seja utilizado para o diagnóstico confirmatório, o ultrassom pode revelar aspectos altamente sugestivos de malignidade, tais como margens irregulares em uma nova massa sólida, além de identificar cistos em carcinomas intracísticos (Tierney e cols., 2006). Esta técnica deve ser utilizada como complemento ao exame físico e à mamografia e diminui as taxas de resultados falsos – negativos (Taylor e Potts, 2008).

O diagnóstico de câncer de mama depende do exame do tecido ou das células obtidas pela biópsia. O método mais simples é a **biópsia com agulha fina**, onde as células são aspiradas e examinadas pelo patologista. A biópsia também pode ser realizada com agulha grande, quando é retirado um pedaço central de tecido com uma agulha cortante. Quando estas duas técnicas não estabelecem o diagnóstico, realiza-se a biópsia aberta, um procedimento com anestesia local, baseado em uma incisão que remove uma parte ou toda a área com anormalidade da mama, para então encaminhar o tecido para exame histológico (Tierney e cols., 2006).

O exame **Anatomopatológico** é de fundamental importância para determinar a natureza da lesão mamária, sendo assim, considerado o exame padrão ouro para o diagnóstico da neoplasia. A amostra coletada é incluída em parafina, o que permite a adequada conservação do material, inclusive para posteriores avaliações de marcadores tumorais através do painel imunohistoquímico (Tierney e cols., 2006). Com esta técnica, obtém-se: o *Tipo histológico do carcinoma mamário*, padronizado pelas instituições “Armed Forces Institute of Pathology” (AFIP) e Organização Mundial de Saúde (OMS); o *Grau histológico do tumor* (Scarff, Bloom, Richardson modificado por Elston-Ellis), e conseqüentemente a *Classificação patológica* baseada no sistema TNM (INCA - 2, 2014).

## 1.8. Estadiamento

Preconizado pela *União Internacional Contra o Câncer*, o *TNM* (Tumor-Nodo-Metástase) é o sistema de estadiamento mais utilizado, sendo: T - a

extensão do tumor primário, N - a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais, e M - a ausência ou presença de metástase à distância (Pollock e cols., 2006). A adição de números a estes três componentes, indicam a extensão da doença maligna, recebendo, portanto graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente (INCA - 2, 2014).

Outros fatores contribuem para a classificação do estadiamento do câncer de mama pelo sistema TNM, como: a presença de receptores de estrógeno e progesterona, a superexpressão de *HER-2* (um receptor de fator de crescimento, envolvido na proliferação celular por meio de vias de sinalização intracelulares), a presença de embolia tumoral nos vasos linfáticos ou sanguíneos, a presença de marcadores de proliferação e atividade mitótica (como o Mib1 e o ki67), e de reguladores de apoptose e do ciclo celular (bcl-2 e p53) (Pollock e cols., 2006).

O **Painel Imuno-histoquímico** é utilizado em diferentes situações da patologia mamária, sendo as mais importantes: a avaliação dos fatores preditivos e do prognóstico de câncer de mama, pesquisa de células epiteliais metastáticas e para o diagnóstico diferencial de lesões mamárias. A avaliação de fatores preditivos permite identificar características clínicas, patológicas e biológicas, usadas para estimar a probabilidade de resposta do paciente a um determinado tipo de tratamento (Nofech-Mozes e cols., 2012).

O painel preditivo, estabelecido pelo Consenso de Saint Gallen de 2011, recomenda para todos os casos de câncer mamário, a avaliação de Receptores de estrógeno (RE), progesterona (RP), e receptor de fator de crescimento epidérmico HER-2, incluindo a pesquisa do Ki-67 (marcador para a

determinação da fração de crescimento), o qual avalia a atividade proliferativa (Goldhirsch e cols., 2011). Para a identificação dos subtipos basalóides através da imunistoquímica, recomenda-se a avaliação da citoceratina 5 e do EGFR (Livasy e cols., 2005).

Estes marcadores permitem a identificação dos seguintes subtipos moleculares de carcinoma mamário: *Luminal A*, *Luminal B*, *Superexpressão de HER-2*, *Basalóide* e *Triplo-Negativo não basalóide*. As características moleculares associadas à histologia do tumor mamário e aos aspectos clínicos do paciente estabelecem o melhor tratamento a ser realizado (Sorlie, 2004).

### **1.9. Marcadores Tumorais**

Os marcadores tumorais têm apresentado um papel fundamental na evolução do prognóstico do câncer de mama, e seu uso tem crescido e se aperfeiçoado muito nos últimos anos. Alguns marcadores têm importância na condução do tratamento da doença, podendo inclusive apontar a história natural do tumor (Arenas e cols., 2007).

A expressão de receptores hormonais pelas células neoplásicas representa um parâmetro biológico com significado preditivo e prognóstico. Dois terços dos carcinomas ductais e lobulares expressam receptores hormonais de estrógeno e progesterona. A ausência de expressão para tais receptores está associada ao mau prognóstico e a ausência de benefícios com a terapia hormonal (Pollock e cols., 2006). Pacientes com tumores positivos para receptores de progesterona apresentam ainda um maior intervalo de tempo livre da doença, e quando são positivos para receptores de estrógeno,

há a associação com o aumento da sobrevida total dos pacientes (Eisenberg e Koifman, 2001).

A identificação do HER-2, uma proteína da família do receptor de fator de crescimento epidermal, também conhecida como c-erbB-2, está relacionada ao mau prognóstico (Tapia e cols., 2007) e a ocorrência de metástases à distância (Hoefnagel e cols., 2010). A positividade para este marcador ocorre em aproximadamente 25% dos carcinomas e associa-se com o grau elevado de proliferação celular, baixa concentração de RE, maior resistência ao tamoxifeno e à quimioterapia com ciclosfosfamida, metotrexato, e fluorouracil (Forones e cols., 2005).

Em relação aos tumores mamários que apresentam o fenótipo triplo-negativo, ou seja, que não expressam RE, RP e HER-2, a principal característica reconhecida está relacionada à progressão rápida da doença e ao menor tempo de sobrevida dos pacientes (Chacon e Costanzo, 2010). Pesquisas identificam este fenótipo, como um tumor mais agressivo (Tischkowitz e cols., 2007), em que há maior ocorrência de metástases à distância, (Koo e cols., 2010), principalmente em órgãos viscerais, como o pulmão (Keam e cols., 2011). Neste contexto, a presença de tal fenótipo sugere um prognóstico muito ruim para as pacientes com câncer de mama (Rakha e Chan, 2011).

O marcador ki-67 em elevados níveis de expressão nas células neoplásicas, tem associação com o aumento do risco de recorrência da doença, uma vez que este é um anticorpo monoclonal específico para um antígeno nuclear expresso apenas em células de proliferação (Scholzen e Gerdes, 2000). Além da relação com o curso clínico da doença, a alta

expressão deste marcador, associa-se com o tamanho do tumor, com o grau histológico pouco diferenciado, com a invasão vascular e com o comprometimento dos linfonodos axilares e com RE negativo (Menke e cols., 2007).

O gene TP53 é um gene supressor tumoral que codifica a proteína p53, responsável pela promoção do reparo ao DNA, e também pelo controle da apoptose (Gao e cols., 2005). Este gene está comumente mutado em pacientes com câncer e conseqüentemente, a proteína mutada perde sua função (Leong e cols., 2000). A superexpressão da proteína p53 está envolvida na progressão do câncer de mama e tem associação com tumores mais agressivos e um pior prognóstico para o paciente (Yamashita e cols., 2004).

O oncogene bcl-2, apesar de ter função antiapoptótica é descrito com um marcador de bom prognóstico e boa resposta ao tratamento com tamoxifeno em pacientes com câncer de mama. A presença de bcl-2 correlaciona-se com bons fatores prognósticos tais como a positividade para receptores de estrógeno, baixo grau tumoral e uma maior sobrevida dos pacientes (Menke e cols., 2007).

### **1.10. Apoptose**

A apoptose ou “morte celular programada” requer a interação de diversos fatores. Através da indução de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos, regulados geneticamente, desencadeia-se um conjunto de alterações morfológicas e bioquímicas que possibilitam que as células danificadas sejam reconhecidas e eliminadas (Saraste e Pulkki, 2000).

A ativação da apoptose pode ser iniciada pela *via extrínseca* (citoplasmática) ou pela *via intrínseca* (mitocondrial) (Grivicich e cols., 2007).

A *via extrínseca* é desencadeada pela ligação de ligantes específicos a um grupo de receptores de morte celular: Fas, r(TNF), DR3, DR4, e DR5. Quando os receptores de morte celular reconhecem um ligante específico, os seus domínios de morte interagem com moléculas conhecidas como FADD (*proteínas adaptadoras – figura abaixo*). Essas moléculas têm a capacidade de recrutarem a caspase-8 que irá ativar a caspase-3, executando a morte por apoptose (Wong, 2011; Grivicich e cols., 2007; Schneider e Tschopp, 2000).

A *via intrínseca* é ativada por estresse intracelular ou extracelular como a deprivação de fatores de crescimento, danos no DNA, hipóxia ou ativação de oncogenes. A mitocôndria é o principal mediador desse tipo de morte celular, pois induz a liberação de moléculas pró-apoptóticas tais como o citocromo-c no citoplasma. A liberação de citocromo-c no citosol forma um complexo chamado apoptossomo, que promove a clivagem da pró-caspase-9, liberando assim caspase-9 que ativa a caspase-3 e ocasiona a apoptose (Wong, 2011; Grivicich e cols., 2007; Rupnarain e cols., 2004; Danial e Korsmeyer, 2004).

A figura abaixo representa de modo esquemático, as possíveis vias e os mecanismos da apoptose.



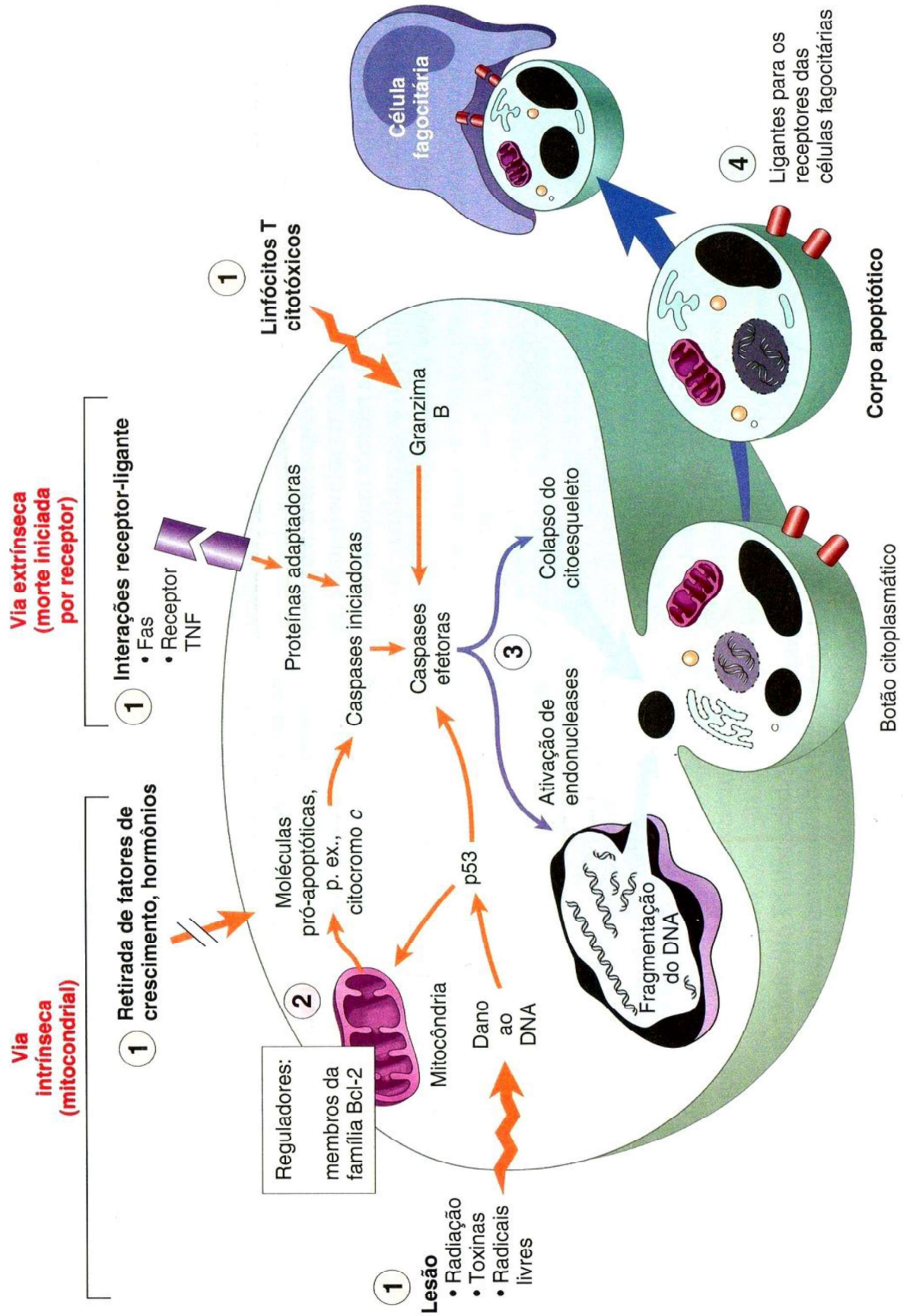


Figura: Vias e mecanismos apoptóticos.

Obtida: Kumar V., Abbas A. K., Fausto N., Aster, J. C. "ROBBINS & COTRAN – PATOLOGIA: Bases Patológicas das Doenças". 8ª Ed. RJ: Elsevier, p. 26, 2011.

### 1.11. Marcadores de Apoptose

A manutenção das células relaciona-se com um rigoroso equilíbrio entre as vias que regulam a morte e a proliferação celular. Por muitos anos, as pesquisas em oncogênese abordavam apenas os mecanismos de crescimento e proliferação celular, no entanto nas últimas décadas, diversas pesquisas sobre os mecanismo de controle da apoptose vem sendo realizadas, no intuito de ampliar os conhecimentos e efeitos da morte celular no processo neoplásico (Grivicich e cols., 2007).

Alguns genes são estudados por estarem envolvidos nos mecanismos de apoptose, seja como inibidores ou promotores. A via mitocondrial e extrínseca da apoptose é controlada pela família das proteínas Bcl-2 (*"B-cell lymphoma protein 2"*). O Bcl-2 é um protooncogene, descoberto em linfomas *não Hodgkin* humanos, que produz a proteína Bcl-2, cuja função fisiológica é prevenir a liberação de citocromo *c*, e inibir a morte celular programada, agindo assim como reguladores antiapoptóticos (Hockenbery e cols., 1990; Jacobson e cols., 1993; Grivicich e cols., 2007).

Em linfomas, gliomas e câncer de próstata a expressão da proteína Bcl-2 apresenta-se com a função de ongene (Callagy e cols., 2008). Entretanto, estudo realizado para identificar a associação desta proteína com o câncer de mama, relata seu efeito protetor, como um gene supressor tumoral, pois sua expressão tem relação com fatores de bom prognóstico, como a expressão de RE e baixo grau tumoral (Callagy e cols., 2006).

Em sua metanálise, Callagy (2008) relata diversas pesquisas em que o aumento da expressão de proteína Bcl-2 associa-se ao bom prognóstico de

pacientes com carcinoma mamário, independente do status linfonodal, do tamanho e grau do tumor. Entretanto, ressalta que o mecanismo pelo qual a proteína exerce sua função protetora, ainda é desconhecido. Sabe-se apenas que a Bcl-2 é capaz de aumentar os efeitos inibitórios do crescimento celular analogamente ao *p53*, e que tumores que expressam o Bcl-2 têm melhor resposta à terapia endócrina e quimioterápica (Callagy e cols., 2008).

A proteína Bax (*Bcl-2* “associated protein” X) pertence às subfamílias da proteína Bcl-2 e tem função pró-apoptótica (Kuan e cols., 2003). A homeostasia das células é mantida pelo controle dos níveis de proteínas antiapoptóticas e pró-apoptóticas. Após um estímulo de morte, por exemplo, a Bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo seqüestro da proteína Bax ou por competir com sítios que seriam ocupados pela Bax na membrana mitocondrial externa. Já a Bax pode promover a apoptose através da interação com a mitocôndria, de forma independente, sem interação com as proteínas antiapoptóticas (Murphy e cols., 2000; Petros e cols., 2004).

As proteínas Bcl-2 e Bax têm sido relacionadas ao gene *p53*. Este gene é capaz de regular positivamente a Bax e negativamente a Bcl-2, estimulando assim a apoptose. Entretanto observa-se a mutação da proteína *p53* em tumores invasivos de mama, o que torna incapaz a expressão da Bax e sua habilidade para promover a apoptose (Perego e cols., 1996; De Jong e cols., 2000; Farias e cols., 2005).

A expressão anormal da proteína Bax, leva à “imortalização” da célula, predispondo-a ao desenvolvimento de neoplasias, entretanto a relação específica da Bax com o câncer de mama é pouco descrita na literatura. Além de sua associação com a tumorigênese, à baixa expressão de Bax está

associada à diminuição da sobrevida dos pacientes (Schelwies e cols., 2002; Zhivotovsky e cols., 2006; Méndez-Catalá e cols., 2013).

Recente estudo refere que junto a Bcl-2, a proteína Bax pode desenvolver um papel importante na resistência das células aos tratamentos quimioterápicos. Portanto, a inibição destas proteínas apoptóticas nos pacientes, representam hoje uma estratégia promissora para o tratamento do câncer de mama (Hong Li e cols., 2011).

### **1.12. Justificativa**

A utilização de marcadores tumorais na avaliação do câncer de mama tem crescido muito nos últimos anos. O estudo dos genes envolvidos na apoptose destes tumores, podem fornecer um marcador de comportamento tumoral confiável e, por sua vez, torna-se utilizável para estabelecer o prognóstico dos pacientes.

Tendo em vista o elevado número de pacientes afetados pelo câncer de mama, tornam-se necessários mais estudos que contribuam para o conhecimento do processo de carcinogênese e da progressão deste tumor.

Desta forma, a proposta deste estudo é avaliar a expressão de marcadores de apoptose em células neoplásicas do tumor mamário e da metástase pleural, bem como correlacionar a expressão destes marcadores com aspectos clínico-patológicos dos pacientes, visando compreender os mecanismos e desfecho desta doença.

### 1.13. Referências Bibliográficas

American College of Radiology (ACR). Breast Imaging-Reporting and Data System Atlas. 5ª Edição, American College of Radiology, p.193-197, 2013.

Arenas LAS, Cáez C, Camargo P, Castro Y, Moreno A, Rodríguez C, *et al.* Análisis de los factores inmunohistopatológicos (receptores hormonales, estrógenos, progesterona y ERB-2) asociados al pronóstico del cáncer de mama en la población de Barranquilla. *Salud Uninorte.* 2007;232:150-61.

Azevedo e Silva G. Câncer de mama no Brasil: estratégias para o seu enfrentamento. *Cad Saúde Pública.* 2012;28(1):4.

Barnett GC, Shah M, Redman K, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD. Risk Factors for the Incidence of Breast Cancer: Do They Affect Survival From the Disease? *J Clin Oncol.* 2008;26(20):3310-3316.

Borghesan, Deise H., Pelloso, Sandra M., Carvalho, Maria Dalva de B. Câncer de mama e fatores associados. *Cienc Cuid Saude.* 2008;7(1):62-68.

Callagy GM, Pharoah PD, Pinder SE, Hsu FD, Nielsen TO, Ragaz J, Ellis IO, Huntsman D, Caldas C. Bcl-2 is a prognostic marker in breast cancer independently of the Nottingham Prognostic Index. *Clin Cancer Res.* 2006;12(8):2468-75.

Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer.* 2008; 8(153):1-10.

Cianfrocca M, Gradishar W. New molecular classifications of breast cancer. *CA Cancer J Clin.* 2009;59(5):303-13

Chacon RD, Costanzo MV. Triple-negative breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2010;12 Suppl 2: S3,1-9.

Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM, *et al.* Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol.* 2008;2635:5697-704.

Chua, Terence C., *et al.* Hepatic resection for metastatic breast cancer: a systematic review. *European Journal of Cancer.* 2011;47(15):2282-2290.

Danial NN, Korsmeyer SJ. Cell death: critical control points. *Cell.* 2004;23;116(2):205-19.

De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2000;82(2):368-73.

De Vita Jr VT, Lawrence TS, Rosenberg AS. Cancer: principles and practice of Oncology. 8th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2008.

Eisenberg ALA, Koifman S. Câncer de Mama: Marcadores Tumorais (revisão da literatura). Rev Bras. de Cancerol. 2001;474:377-88.

Farias, R. E., Souza, A. R., Aarestrup, F. M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. Rev Bras. de Cancerol. 2005;51(3):209-218.

Fauci, Anthony S. et al.; Harrison: Medicina Interna. 17ª Edição. Rio de Janeiro: McGraw-Hill Interamericana do Brasil, p. 1659, 2008.

Forones, Nora Monoukian, et al. Guia de Medicina Ambulatorial e hospitalar de Oncologia. 1ª Edição. Barueri, SP: Manole, p. 70 - 85, 2005.

Gao RJ, Bao H, Yang Q, Cong Q, Song J, Wang L. The presence of serum anti-p53 antibodies from patients with invasive ductal carcinoma of breast: Correlation to other clinical and biological parameters. Breast Cancer Res Treat. 2005;93(2):111-5.

Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn H-J, 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;22(8):1736-47.

Grivicich, Ivana, Regner, Andréa, da Rocha, Adriana B. "Morte celular por apoptose." Rev Bras Cancerol. 2007;53(3):335-43.

Hockenbery D, Nuñez G, Milliman C, Schreiber RD, Korsmeyer SJ. Bcl-2 is an inner mitochondrial membrane protein that blocks programmed cell death. Nature. 1990;348(6299):334-6.

Hoefnagel LD, van de Vijver MJ, van Slooten HJ, Wesseling P, Wesseling J, Westenend PJ, et al. Receptor conversion in distant breast cancer metastases. Breast Cancer Res. 2010;125:1-9,R75.

Hong Li, et al. Liposomes Containing (-)-Gossypol-Enriched Cottonseed Oil Suppress Bcl-2 and Bcl-xL Expression in Breast Cancer Cells. Pharm Res. 2011;28(12):1-15.

INCA – 1. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>. Acessado em: 25 de novembro de 2014.

INCA – 2. Instituto Nacional de Câncer. Tipos de câncer: Mama. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acessado em: 30 de novembro de 2014.

Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*. 1993;361(6410):365-9.

Jung, Su Yon, et al. Factors associated with mortality after breast cancer metastasis. *Cancer Causes and Control*. 2012;23(1):103-112.

Keam B, Im SA, Lee KH, Han SW, Oh DY, Kim JH, et al. Ki-67 can be used for further classification of triple negative breast cancer into two subtypes with different response and prognosis. *Breast Cancer Res*. 2011;132:1-7,R22.

Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang MC, Voduc D, Speers CH, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;2820:3271-3277.

Koo JS, Jung W, Jeong J. Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. *Tumori*. 2010;963:424-32.

Kuan CY, Kuida K. Cell death in mammalian development. In: Yin XM, Dong Z, editors. *Essentials of Apoptosis*. New Jersey:Humana Press Inc. p.163-75, 2003.

Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson; Aster, Jon C. Robbins & Cotran: *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 8ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 26, 2011.

Kumar, Vinay; Abbas, Abul K.; Fausto, Nelson. Robbins & Cotran: *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7ª Edição. Rio de Janeiro: Elsevier, p. 1504, 2005.

Leong ACK, Hanby AM, Potts HWW, Tan DSP, Skilton D, Ryder K, et al. Cell cycle proteins do not predict outcome in grade I infiltrating ductal carcinoma of the breast. *Int J Cancer*. 2000;89(1):26-31.

Li Ci, et al. Clinical characteristics of different histologic types of breast cancer. *Br J Cancer*. 2005;93(9):1046-1052.

Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2005;19(2):264-271.

Méndez-Catalá CF, et al. A Novel Mechanism for CTCF in the Epigenetic Regulation of Bax in Breast Cancer Cells. *Neoplasia* (New York, N.Y.). 2013;15(8):898-912.

Menke, Carlos H., et al. *Rotinas em Mastologia*. 2ª Edição. Porto Alegre: Artmed, p. 160-224, 2007.

Moraes, A. B. D., Zanini, R. R., Turchiello, M. S., Riboldi, J., & Medeiros, L. D. Estudo da sobrevida de pacientes com câncer de mama atendidas no hospital da Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, Brasil. *Cad Saúde Pública*. 2006;22(10):2219-28.

Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits Bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ*. 2000;7:102-11.

Nelson HD, Zakher B, Cantor A, R Fu, Griffin J, O'Meara ES, et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012;156(9):635-648.

Nofech-mozes, Sharon, et al. Systematic review on hormone receptor testing in breast cancer. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012;20(3):214-263.

Perego P, Giarola M, Righetti SC, Supino R, Caserini C, Delia D, et al. Association between cisplatin resistance na mutation of p53 gene and reduced bax expression in ovarian carcinoma cell system. *Cancer Res*. 1996;56:556-62.

Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644:83-94.

Pokieser W, Cassik P, Fischer G, Vesely M, Ulrich W, Peters-Engl C. Malignant pleural and pericardial effusion in invasive breast cancer: impact of the site of the primary tumor. *Breast Cancer Res Treat*. 2004;832:139-42.

Pollock, Raphael E., et al. *Manual de Oncologia Clínica da UICC*. 8ª Edição. São Paulo: Fundação Oncocentro de São Paulo, p. 506-536, 2006.

Rakha EA, Chan S. Metastatic triple-negative breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2011;239:587-600.

Rupnarain C, Dlamini Z, Naicker S, Bhoola K. Colon cancer: genetics and apoptotic events. *Biol Chem*. 2004;385:449-64.

Santos, Gina de M. C., et al. Derrame pleural neoplásico: diagnóstico e tratamento. *Rev. Bras. Clín ter*. 2000;26(4):153-158.

Santos GT, Prolla JC, Camillo ND, Zavalhia LS, Ranzi AD, Bica CG. Fatores clínicos e anatomopatológicos que influenciam a sobrevida de pacientes com



câncer de mama e derrame pleural neoplásico. *J Bras Pneumol*. 2012; 38(4):487-493.

Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45:528-37.

Schelwies K, et al. Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *Int J Cancer*. 2002;99:589–596.

Schneider P, Tschopp J. Apoptosis induced by death receptors. *Pharm Acta Helv*. 2000;74(2-3):281-6.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000;182:311-22.

Silveira, Gustavo P. G. *Ginecologia Baseada em Evidências*. 2ª Edição. São Paulo: Atheneu, p.563–564, 2008.

Schneider, Ione Jayce Ceola, and Eleonora d'Orsi. Sobrevida em cinco anos e fatores prognósticos em mulheres com câncer de mama em Santa Catarina, Brasil. *Cad. Saúde Pública*. 2009;25(6):1285-1296.

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

Tapia C, Savic S, Wagner U, Schonegg R, Novotny H, Grilli B, et al. HER2 gene status in primary breast cancers and matched distant metastases. *Breast Cancer Res*. 2007;9:3:1-8,R31.

Taylor, Paul; Potts, Henry W. Computer aids and human second reading as interventions in screening mammography: two systematic reviews to compare effects on cancer detection and recall rate. *Eur J Cancer*. 2008;44(6):798-807.

Teixeira, Lisete R., et al. Derrame pleural neoplásico. *J Bras de Pneumol*. 2006;32(4):182–189.

Tierney, Lawrence; Mcphee, Stephen J.; Papadakis, Maxine A. *Current: Medicina Diagnóstico e Tratamento*. 45ª Edição. Rio de Janeiro: McGranw-Hilll Interamericana do Brasil, p. 655-663, 2006.

Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:134:1-11.

Trufelli, Damila Cristina, et al. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. *Rev Assoc Med Bras*. 2008;54(1):72-76.

Van Galen KP, Visser HP, van der Ploeg T, Smorenburg CH. Prognostic factors in patients with breast cancer and malignant pleural effusion. *Breast J.* 2010;166:675-677.

Wong RS. Apoptosis in cancer: from pathogenesis to treatment. *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2011;30 (1):87.

World Health Organization. International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acessado em: 20 de novembro de 2014.

Yamashita H, Nishio M, Toyama T, Sugiura H, Zhang Z. Coexistence of HER 2 over- expression and p53 protein accumulation is a strong prognostic molecular marker in breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2004;6(1):R24-30.

Yhim, Ho-Young , et al. Prognostic factors for recurrent breast cancer patients with an isolated, limited number of lung metastases and implications for pulmonary metastasectomy. *Cancer.* 2010;116(12):2890-2901.

Yokota, Takashi, et al. Metastatic breast carcinoma masquerading as primary colon cancer. *Am J Gastroenterol.* 2000;95(10):3014-3016.

Zhivotovsky B, Orrenius S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis.* 2006;27:1939–1945.

## **2. Objetivos**

### **2.1 Objetivo Geral**

Avaliar a expressão de marcadores da apoptose no câncer de mama metastático.

### **2.2 Objetivos Específicos**

Identificar a expressão do marcador anti-apoptótico *Bcl-2* e do marcador pró-apoptótico *Bax* em amostras de câncer de mama e de derrame pleural neoplásico, de pacientes com carcinoma de mama metastático.

Correlacionar à expressão dos marcadores de apoptose *Bcl-2* e *Bax* com:

- o estadiamento do câncer de mama,
- o desfecho óbito,
- o tempo de sobrevivência das pacientes.

### 3. Artigo científico

#### **“Marcadores de Apoptose no Câncer de Mama Metastático”**

Autores: Jaqueline Lessa Pinheiro, Grazielle Silveira Fardin, Cassia Braz Caurio, Rosicler Brackmann Mendes, Rosalva Thereza Meurer, Teresinha Stein, Ana Paula Thiesen, Giovana Tavares Dos Santos, João Carlos Prolla, Claudia Giuliano Bica.

Enviado para publicação no “*Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial*”

**Abstract:**

**Introduction:** Breast cancer is currently the leading cause of cancer death in women. Studies of genes involved in the apoptotic process aimed at broadening the knowledge of humoral progression, and establish new prognostic markers for these patients. **Objective:** investigate the expression of apoptosis markers in metastatic breast cancer. **Methodology:** A total of 25 paraffin samples of breast carcinomas and 25 samples of cell block of malignant pleural effusion were evaluated, for the same patients. The sections were subjected to immunohistochemistry using antibodies markers of apoptosis, Bcl-2 and Bax. **Results:** It was observed that 100% (n = 25) of primary tumor samples and 96% (n = 24) samples of malignant pleural effusion were positive for marker Bax. There was a significant association between increased Bcl-2 expression in breast tumor and the consequent decrease of Bax expression in malignant pleural effusion (p = 0.045). Bax protein was significantly increased in cases where there is low spread of breast tumors (p = 0.040). The outcome of death was observed in 72% (n = 18) case. Correlation was found between the pro-apoptotic protein expression and decreased survival time from diagnosis of pleural effusion and death (p = 0.041). **Conclusion:** It is observed that there is a relationship between increased anti-apoptotic marker expression in the primary tumor and the consequent reduction of the pro-apoptotic marker in metastasis, and the marker of apoptotic promotion (Bax), is associated with better outcomes and increased survival of patients with metastatic breast cancer.

**Key Words:** BCL-2, BAX, Apoptosis, Breast cancer, Immunohistochemistry.

**Resumo:**

**Introdução:** O câncer de mama representa atualmente a principal causa de morte por câncer em mulheres. Estudos com genes envolvidos no processo apoptótico, visam ampliar os conhecimentos da progressão tumoral, e estabelecer novos marcadores de prognóstico para estes pacientes. **Objetivo:** Verificar a expressão de marcadores da apoptose no câncer de mama metastático. **Metodologia:** Foram avaliadas 25 amostras de parafina de carcinomas mamários e 25 amostras de *cell block* do derrame pleural neoplásico, das mesmas pacientes. Os cortes foram submetidos à técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos de marcadores da apoptose, *Bcl-2* e *Bax*. **Resultados:** Observou-se que 100% (n=25) das amostras de tumor mamário e 96% (n= 24) das amostras de derrame pleural neoplásico foram positivas para o marcador *Bax*. Houve associação significativa entre o aumento da expressão de *Bcl-2* no tumor mamário e a consequente diminuição da expressão de *Bax* no derrame pleural neoplásico ( $p=0,045$ ). A proteína *Bax* esteve significativamente aumentada nos tumores mamários de estádios iniciais ( $p=0,040$ ). O desfecho óbito foi observado em 72% (n=18) dos casos. Foi encontrada correlação entre a expressão de proteína pró – apoptótica e a diminuição do tempo de sobrevida entre o diagnóstico do derrame pleural e o óbito ( $p=0,041$ ). **Conclusão:** Podemos observar que há relação entre o aumento da expressão de marcador anti-apoptótico no tumor primário e a consequente diminuição do marcador pro-apoptótico na metástase, e que o marcador de promoção apoptótica (*Bax*), está associado a melhores prognósticos e ao aumento da sobrevida de pacientes com câncer de mama metastático.

**Palavras chave:** BCL-2, BAX, Apoptose, Câncer de mama, Imunohistoquímica

## Introdução:

O câncer de mama apresenta mundialmente, altas taxas de incidência, e atualmente representa a principal causa de morte por câncer em mulheres<sup>1</sup>. Através de estudos com genes envolvidos no processo apoptótico destes tumores, são conhecidos novos marcadores, que ampliam a compreensão da progressão tumoral, e por sua vez, tornam-se utilizáveis para estabelecer o prognóstico destas pacientes<sup>2</sup>.

A apoptose ou morte celular programada requer a indução de uma cascata de eventos moleculares e bioquímicos, regulados geneticamente<sup>3</sup>. Alguns genes são estudados por estarem envolvidos nestes mecanismos, seja como inibidores ou promotores. A via mitocondrial e extrínseca da apoptose é controlada pela família das proteínas Bcl-2 (*"B-cell lymphoma protein 2"*)<sup>4</sup>.

O Bcl-2 é um protooncogene, que produz a proteína Bcl-2, cuja função fisiológica é inibir a morte celular programada, agindo assim como regulador antiapoptótico<sup>5</sup>. No câncer de mama esta proteína associa-se a um efeito protetor, como um gene supressor de tumor, pois sua expressão tem relação com fatores de bom prognóstico, como a expressão de receptores de estrógeno e tumores de baixo grau, independente do status linfonodal e do tamanho do tumor<sup>6</sup>.

A proteína Bax (*Bcl-2 "associated protein" X*) pertence às subfamílias da proteína Bcl-2 e tem função pró-apoptótica<sup>7</sup>. A expressão anormal desta proteína predispõe o desenvolvimento de neoplasias, entretanto a relação específica da Bax com o carcinoma mamário é pouco descrita na literatura.



Além de sua associação com a tumorigênese, à baixa expressão de Bax está associada diminuição da sobrevida dos pacientes<sup>8-9</sup>.

Frente ao exposto, no intuito de ampliar os conhecimentos sobre os efeitos da morte celular no processo neoplásico, o objetivo deste estudo foi verificar a expressão de marcadores da apoptose no câncer de mama metastático.

## **Metodologia**

O presente trabalho caracteriza-se como um estudo transversal, de base hospitalar, sendo adotados os seguintes critérios de inclusão: amostras de pacientes do sexo feminino com histórico de câncer de mama e derrame pleural neoplásico diagnosticado pelo exame citopatológico, no Laboratório de Patologia do Hospital de Referência, entre 2011 a 2013. Para acompanhar o desfecho dos casos, a história clínica das pacientes foi seguida por 1 ano, até dezembro de 2014.

Foram selecionados, concomitantemente, 25 casos de carcinomas mamários, de diferentes graus histológicos e 25 amostras de derrame pleural neoplásico das mesmas pacientes. Para análise do tumor de mama, obteve-se a amostra a partir do bloco de parafina, e para pesquisa da metástase, utilizou-se o *cell block* do líquido pleural.

Para selecionar áreas com boa representatividade de tecido tumoral, as amostras foram analisadas em lâminas coradas com hematoxilina-eosina, através de microscopia óptica. Após seguir este critério de seleção, os cortes

foram submetidos à técnica de imunohistoquímica, baseada em protocolo de *Prophet, EB et al., 1992*. Como marcadores de apoptose, utilizaram-se anticorpos *Bcl-2* e *Bax*, ambos da marca DakoCytomation®, California,USA. Para a determinação imunohistoquímica, foi diluído 1 microlitro do anticorpo *Bcl-2* para cada 100 microlitros de diluente, e 1 microlitro do anticorpo *Bax* para cada 800 microlitros de diluente.

A avaliação imunohistoquímica foi executada por dois analistas, em microscopia óptica, de forma independente, e os resultados conflitantes foram interpretados por um terceiro analista e definidos consensualmente. Em ambos os anticorpos estudados, a *marcação positiva* foi definida pela coloração marrom no citoplasma celular. Foram capturadas imagens de todas as lâminas, selecionando em cada uma, três áreas de *hot spots* (locais de maior marcação do anticorpo) (**Figura 1**). Os analistas realizaram uma contagem qualitativa, baseada no estudo de *Faria, MHG et al., 2006*,<sup>10</sup> considerando a *intensidade* de marcação, e adotando os valores: 0 (ausente), 1+ (fraca), 2+ (moderada) e 3+ (intensa), de acordo com a coloração.

Através dos prontuários das pacientes, ainda foram investigadas as seguintes informações: tipo histológico, estadiamento, perfil imunohistoquímico e subtipo molecular do carcinoma mamário, presença de outras metástases, idade durante o diagnóstico do câncer primário e do derrame pleural neoplásico, e óbito.

O processamento e análise dos dados foram executados com o auxílio do programa Microsoft Office Excel 2007 e do software estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS 18®, Hong Kong, China). Foram

descritas informações por meio de frequências absolutas e relativas (contagem e percentual), e os resultados foram comparados através do Teste não paramétrico para amostras independentes Man – Whitney e da Correlação de Spearman para associações não – paramétricas, sendo atribuído o nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ). A sobrevida das pacientes é apresentada pela curva de Kaplan-Meier.

O presente trabalho está de acordo com a Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, respeitando o compromisso ético e legal do anonimato e sigilo das informações, com aprovação dos Comitês de Ética das instituições vinculadas, sob os pareceres: 193.243/13 e 252.516/13. Finalmente os autores declaram que não houve conflito de interesses.

## **Resultados**

O presente estudo avaliou 25 casos de câncer de mama metastático. Na **Tabela 1**, estão apresentados detalhadamente os resultados da expressão dos marcadores de apoptose nas reações imunohistoquímicas, conforme a intensidade de marcação observada. Considerando apenas os casos com positividade para os marcadores estudados, observa-se que 100% (n=25) das amostras de tumor mamário e 96% (n= 24) das amostras de derrame pleural neoplásico foram positivas para o marcador pró-apoptótico Bax.

Foram correlacionados a expressão dos marcadores Bcl-2 e Bax nas amostras de tumor primário e de metástase, das pacientes. Identificou-se uma associação estaticamente significativa entre o aumento da expressão de Bcl-2

no tumor mamário e a consequente diminuição da expressão de Bax no derrame pleural neoplásico ( $p=0,045$  – Correlação de Spearman).

Na **Tabela 2**, estão descritas informações clínicas e patológicas do tumor mamário, dos 25 casos incluídos neste estudo.

Também se realizou a investigação da relação destes marcadores de promoção e inibição da apoptose com o nível de estadiamento do câncer de mama. Foi identificado que a expressão da proteína Bax está significativamente aumentada nos tumores mamários de estágios iniciais. ( $p=0,040$  - Correlação de Spearman).

Entre os casos selecionados para este estudo, observou-se que as pacientes com câncer de mama e derrame pleural neoplásico, também desenvolveram outros sítios metastáticos, sendo estes: ósseo em 44% ( $n=11$ ), recidiva mamária em 44% ( $n=11$ ), hepático em 24% ( $n=6$ ) e cerebral 16% ( $n=4$ ),

O desfecho óbito foi observado em 72% ( $n=18$ ) dos casos estudados. Verifica-se nas amostras de tumor mamário das pacientes com este desfecho, que 55,5% ( $n=10$ ) apresentavam baixa intensidade de marcação (*fraco 1+*) para o anticorpo Bax, e 61,1% ( $n=11$ ) expressavam forte marcação (*intensa 3+*) para o anticorpo antiapoptótico Bcl-2. Entretanto ao testar a associação entre os marcadores de apoptose nas amostras da mama e do derrame pleural e a evolução ao óbito, não foi identificada correlação significativa entre os mesmos ( $p \geq 0,05$  – Teste Mann-Whitney).

As **Figuras 2 e 3** demonstram o tempo de sobrevivência entre o diagnóstico do câncer de mama e do derrame pleural neoplásico em relação ao óbito,

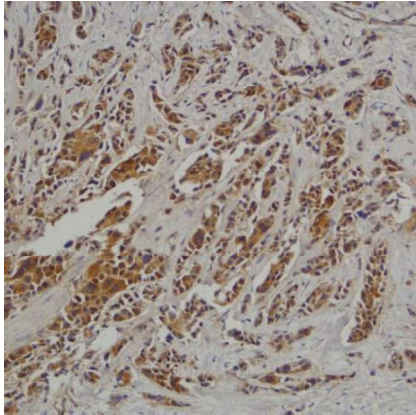
respectivamente. A expressão dos marcadores apoptóticos, de ambas as amostras, também foram relacionados ao tempo de sobrevivência das pacientes, sendo observado que há correlação significativa entre a diminuição da expressão de proteína pró – apoptótica Bax, e a diminuição do tempo de sobrevivência entre o diagnóstico do derrame pleural e o óbito ( $p=0,041$  - Correlação de Spearman).

Entre as pacientes que evoluíram ao óbito ( $n=18$ ), observa-se que 66,6% ( $n=12$ ) registraram este desfecho antes de completar 5 anos do diagnóstico do câncer de mama, e em 61,1% ( $n=11$ ) das pacientes, o óbito ocorreu antes de completar 3 meses do diagnóstico da metástase pleural.

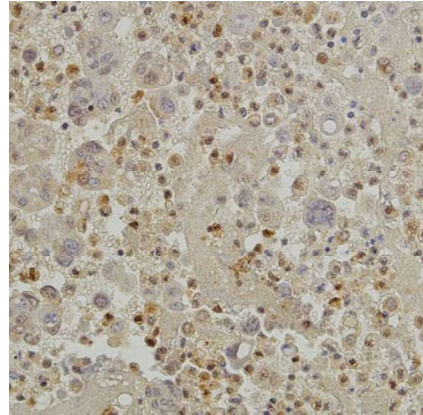
A média e o desvio padrão da idade das pacientes durante os eventos acompanhados no estudo foram: no diagnóstico do câncer de mama: 53 anos e 8 meses (DP = 13 anos e 4 meses), no diagnóstico do derrame pleural neoplásico: 56 anos e 6 meses (DP = 14 anos) e para idade do óbito: 57 anos e 7 meses (DP = 13 anos e 9 meses).

**Figura 1.** Áreas de *hot spots* das amostras estudadas

Expressão proteína Bax

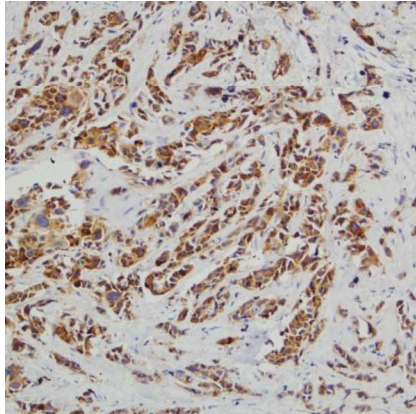


Carcinoma Mamário

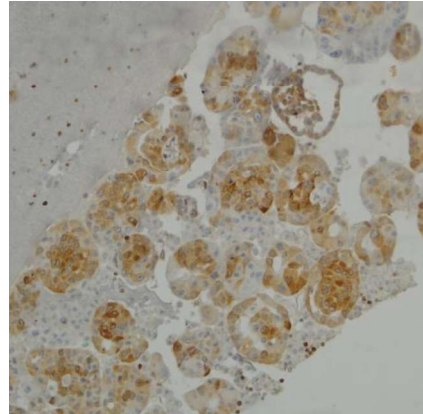


Derrame Pleural Neoplásico

Expressão proteína Bcl-2



Carcinoma Mamário



Derrame Pleural Neoplásico

**Tabela 1.** Resultados da reação imunohistoquímica dos marcadores apoptóticos, em microscopia óptica.

Intensidade da Marcação do Anticorpo	Carcinoma Mamário		Derrame Pleural Neoplásico	
	<i>Bcl-2</i> n (%)	<i>Bax</i> n (%)	<i>Bcl-2</i> n (%)	<i>Bax</i> n (%)
0 (ausente)	3 (12)	0 (0)	11 (44)	1 (4)
1+ (fraca)	5 (20)	15 (60)	6 (24)	5 (20)
2+ (moderada)	4 (16)	8 (32)	6 (24)	11 (44)
3+ (intensa)	13 (52)	2 (8)	2 (8)	8 (32)
<i>Total</i>	<i>25 (100)</i>	<i>25 (100)</i>	<i>25 (100)</i>	<i>25 (100)</i>

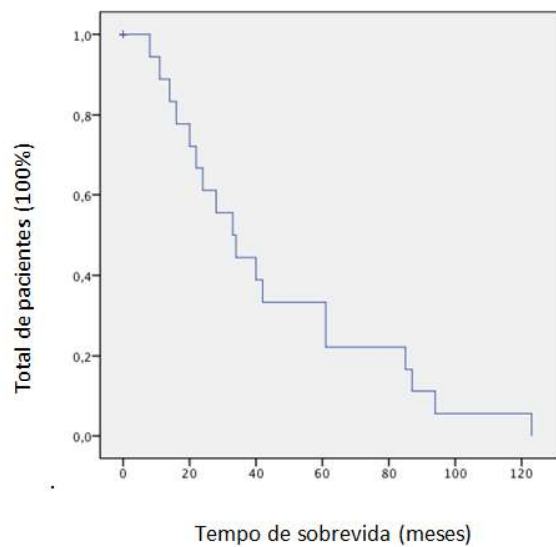
**Tabela 2.** Informações clínicas e patológicas dos casos estudados.

Achados Clínicos Patológicos	N 25
<b>Tipo Histológico do Carcinoma Mamário</b>	Carcinoma Ductal Infiltrante 21 (84%) Carcinoma Lobular Infiltrante 4 (16%)
<b>Estadiamento do Carcinoma Mamário</b>	Estadio I 4 (16%) Estadio II 12 (48%) Estadio III 9 (36%) Estadio IV 0 (0%)
<b>Perfil Imunohistoquímico do Carcinoma Mamário</b>	Receptor de Estrógeno <i>Positivo</i> 18 (72%) <i>Negativo</i> 7 (28%) Receptor de Progesterona <i>Positivo</i> 17 (68%) <i>Negativo</i> 8 (32%) Expressão HER-2 <i>Positivo</i> 8 (32%) <i>Negativo</i> 17 (68%) Expressão Ki-67 <i>Positivo</i> 21 (84%) <i>Negativo</i> 4 (16%) Expressão P53 <i>Positivo</i> 6 (24%) <i>Negativo</i> 19 (76%)
<b>Subtipo molecular do Carcinoma Mamário</b>	Luminal A 5 (20%) Luminal B 15 (60%) Superexpressão HER-2 1 (4%) Triplo Negativo 4 (16%)



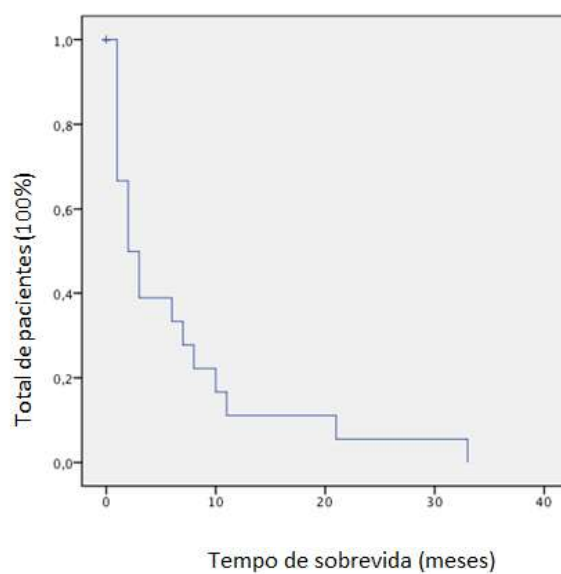
**Figura 2.** Curva de sobrevida entre o diagnóstico do câncer de mama e o óbito

*Curva de Kaplan – Meier*



**Figura 3.** Curva de sobrevida entre o diagnóstico do derrame pleural neoplásico e o óbito

*Curva de Kaplan – Meier*



## Discussão

Em relação à positividade para expressão de marcadores apoptóticos, observou-se nos casos estudados, que todas as amostras de tumor mamário expressavam o marcador pro-apoptótico Bax, entretanto todas as pacientes apresentaram progressão da doença, evoluindo ao processo metastático. Estudos abordam <sup>11,12</sup> que mutações na proteína p53 em tumores de mama, podem comprometer a habilidade da proteína Bax, em promover a apoptose. Na amostra estudada, 76% (n=19) dos casos não expressavam p53 no câncer de mama (tabela 2), podendo assim, estar relacionada à progressão tumoral destas pacientes, e a incapacidade da proteína Bax executar sua função apoptótica.

A associação dos marcadores apoptóticos em relação ao tumor primário e a metástase identificou correlação estatisticamente significativa entre o aumento da expressão de marcador anti-apoptótico Bcl-2 no câncer de mama e a consequente diminuição do marcador pro-apoptótico Bax no derrame pleural neoplásio. Este achado ressalta que quando existem falhas no rigoroso equilíbrio entre as vias de morte e proliferação celular, há a predisposição para desenvolvimento de neoplasia <sup>5,13</sup>.

O presente estudo identificou ainda, que os maiores níveis de expressão da proteína Bax tem associação estatisticamente significativa com a os casos de baixa disseminação do tumor mamário, os quais apresentam as maiores chances de sobrevida. Constatou-se também, no presente trabalho, a correlação significativa entre a diminuição da expressão de Bax e a diminuição do tempo de sobrevida entre o diagnóstico da metástase e o óbito. Estudos <sup>8, 9</sup>,

<sup>13</sup>ressaltam que a relação específica desta proteína de promoção da apoptose com o carcinoma de mama é pouco descrita e conhecida, entretanto concordam que quando é intensamente expressa, ressalta-se sua associação com melhores prognósticos e o aumento da sobrevida dos pacientes.

Entre as pacientes que evoluíram ao óbito, 55% (n=10) expressavam intensamente a proteína anti-apoptótica Bcl-2 em seu tumor de mama. Tal achado discorda de Callagy (2008) <sup>6</sup>, que relata em sua metanálise, diversas pesquisas em que a proteína Bcl-2 associa-se ao bom prognóstico de pacientes com carcinoma mamário, independente do status linfonodal, do tamanho e grau do tumor. Entretanto, ressalta que este mecanismo de proteção, ainda é desconhecido.

## **Conclusão**

Com base nos resultados encontrados, podemos concluir que há correlação significativa entre o aumento da expressão de marcador anti-apoptótico no tumor primário e a consequente diminuição do marcador pro-apoptótico na metástase, bem como o marcador de promoção apoptótica (Bax), está associado a melhores prognósticos e ao aumento da sobrevida de pacientes com câncer de mama metastático.

As vias que envolvem o processo de apoptose e de carcinogênese são de grande importância para o entendimento das condutas de tratamento a serem adotadas, e podem contribuir diretamente para evoluções no prognóstico e sobrevida de pacientes acometidas pela neoplasia mamária.

## Referências Bibliográficas

1. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. Globocan 2012. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acessado em: 20 de novembro de 2014.
2. Sambaziotis D, Kapranos N, Kontogeorgos G. Correlation of bcl-2 and bax with apoptosis in human pituitary adenomas. *Pituitary*. 2003;6(3):127-33.
3. Saraste A, Pulkki K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res*. 2000;45:528-37.
4. Jacobson MD, Burne JF, King MP, Miyashita T, Reed JC, Raff MC. Bcl-2 blocks apoptosis in cells lacking mitochondrial DNA. *Nature*. 1993;361(6410):365-9.
5. Grivicich, Ivana, Andréa Regner, Adriana Brondani da Rocha. "Morte celular por apoptose." *Rev Bras Cancerol*. 2007;53(3):335-43.
6. Callagy GM, Webber MJ, Pharoah PD, Caldas C. Meta-analysis confirms BCL2 is an independent prognostic marker in breast cancer. *BMC Cancer*, 2008; 8(153):1-10.
7. Petros AM, Olejniczak ET, Fesik SW. Structural biology of the Bcl-2 family of proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2004;1644:83-94.
8. Zhivotovsky B, Orrenius S. Carcinogenesis and apoptosis: paradigms and paradoxes. *Carcinogenesis*. 2006;27:1939–1945.
9. Méndez-Catalá CF, et al. A Novel Mechanism for CTCF in the Epigenetic Regulation of Bax in Breast Cancer Cells. *Neoplasia (New York, N.Y.)* 2013;15(8):898-912.

10. Faria MHG, et al. Expressão das proteínas BCL-2 e BAX em tumores astrocíticos humanos. *J Bras Patol Med Lab.* 2006;42(4):271-278.
11. De Jong JS, Van Diest PJ, Baak JP. Number of apoptotic cells as a prognostic marker in invasive breast cancer. *Br J Cancer.* 2000;82(2):368-73.
12. Farias, R. E., Souza, A. R., Aarestrup, F. M. Avaliação da apoptose no carcinoma ductal infiltrante da mama: associação com graus histológicos e fatores prognósticos. *Rev Bras. de Cancerol.* 2005;51(3):209-218.
13. Schelwies K, et al. Analysis of p53/BAX in primary colorectal carcinoma: low BAX protein expression is a negative prognostic factor in UICC stage III tumors. *Int J Cancer.* 2002;99:589–596.

#### 4. Considerações finais

O presente estudo faz parte de um grande projeto intitulado “**Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama**”, aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre - UFCSPA (Parecer N° 252.516/13) e Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA (Parecer N° 193.243/13). Deste projeto maior estão sendo desenvolvidos diversos outros trabalhos e projetos, incluindo uma tese de doutorado.

O Serviço do Laboratório de Patologia da ISCMPA é um centro de referência para o diagnóstico de pacientes com câncer de mama e outras neoplasias. A parceria deste serviço, com os pesquisadores pertencentes ao *Grupo de Pesquisa de Câncer de Mama*, orientado pela Profa. Dra. Claudia G. Bica da UFCSPA teve início em 2012, tendo como objetivo comum aos dois grupos, à criação de um banco de dados que possibilite traçar um perfil completo destas pacientes, a fim de aprimorar a correlação da expressão de marcadores tumorais no tumor primário de mama e na metástase pleural.

Através da presente pesquisa, que avaliou os marcadores de apoptose no câncer de mama metastático, podemos concluir que houve correlação significativa entre o aumento da expressão de marcador anti-apoptótico no tumor mamário e a consequente diminuição do marcador pro-apoptotico na metástase pleural, bem como o marcador de promoção apoptotica (Bax), está associado com melhores prognósticos e o aumento da sobrevida nestas pacientes.

Neste contexto, aprofundar os conhecimentos nesta linha de pesquisa, com marcadores tumorais, pode contribuir nas condutas de tratamento e nos fatores prognósticos do carcinoma mamário, e assim interferir no desfecho do paciente, visto que esta neoplasia é atualmente um grave problema de saúde pública, que acomete milhares de mulheres em todo o mundo.

## 5. Anexos

### 5.1. Parecer do Comitê de Ética da UFCSPA

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama.

**Pesquisador:** Claudia Giuliano Bica

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 06624712.0.0000.5335

**Instituição Proponente:** Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 252.516

**Data da Relatoria:** 18/04/2013

#### Apresentação do Projeto:

Estudo de coorte, para aproximadamente 50 mulheres, no período de março de 2013 a março de 2017, com exame para diagnóstico de derrame pleural neoplásico realizado no Laboratório de Patologia da ISCMPA, com diagnóstico prévio de câncer de mama e com acompanhamento de sobrevida pelo período de 5 anos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Traçar um perfil de pacientes femininas com câncer de mama metastático e derrame pleural metastático e seus respectivos marcadores de riscos / expressão / morfologia, a fim de associar o perfil de derrame pleural maligno ao câncer de mama, aprimorando assim maior conhecimento desta neoplasia.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos: possibilidade de risco no momento de colheita de sangue, pertinente a este procedimento.

Para obtenção de amostra do derrame pleural não haverá risco pois já foi obtido em momento anterior.

Sobre os benefícios: maior conhecimento a respeito da neoplasia.

Endereço: Rua Sarmiento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (513)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
CIÊNCIAS DA SAÚDE DE  
PORTO ALEGRE



**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo a ser realizado na ISCMPA com coparticipação da UFCSPA e da PUC. Já analisado e aprovado pela ISCMPA, conforme parecer 226.214 de 22/03/2013.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados.

**Recomendações:**

Anexar os documentos solicitados pelo CEP/UFCSPA.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

-

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Encaminhar ao CEP/UFCSPA o formulário de encaminhamento e o termo de entrega de relatório semestral/final.

PORTO ALEGRE, 23 de Abril de 2013

---

Assinador por:  
José Geraldo Vernet Taborda  
(Coordenador)

Endereço: Rua Sarmento Leite ,245

Bairro:

CEP: 90.050-170

UF: RS

Município: PORTO ALEGRE

Telefone: (51)303-8804

E-mail: cep@ufcspa.edu.br

## 5.2. Parecer do Comitê de Ética da ISCMPA

IRMANDADE DA SANTA CASA  
DE MISERICORDIA DE PORTO  
ALEGRE - ISCMPA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama.

**Pesquisador:** Claudia Giuliano Bica

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 06624712.0.0000.5335

**Instituição Proponente:** Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de Porto Alegre - ISCMPA

**Patrocinador Principal:** Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 193 243

**Data da Relatoria:** 29/01/2013

#### Apresentação do Projeto:

Estudo de coorte, para aproximadamente 50 mulheres, no período de março de 2013 a março de 2017, com exame para diagnóstico de derrame pleural neoplásico realizado no Laboratório de Patologia da ISCMPA, com diagnóstico prévio de câncer de mama e com acompanhamento de sobrevida pelo período de 5 anos.

#### Objetivo da Pesquisa:

Traçar um perfil de pacientes femininas com câncer de mama metastático e derrame pleural metastático e seus respectivos marcadores de riscos / expressão / morfologia, a fim de associar o perfil de derrame pleural maligno ao câncer de mama, aprimorando assim maior conhecimento desta neoplasia.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Sobre os riscos: possibilidade de risco no momento de colheita de sangue, pertinente a este procedimento.

Para obtenção de amostra do derrame pleural não haverá risco pois já foi obtido em momento anterior.

Sobre os benefícios: maior conhecimento a respeito da neoplasia.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sobre os critérios de inclusão: pacientes provenientes do Hospital Santa Rita - ISCMPA, do sexo feminino, com diagnóstico de derrame pleural neoplásico, com câncer de mama, no período de janeiro/2013 a julho/2013.

**Endereço:** R. Profº Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer  
**Bairro:** 6º andar - Centro **CEP:** 90.020-090  
**UF:** RS **Município:** PORTO ALEGRE  
**Telefone:** 5132-1485 **Fax:** 5132-1485 **E-mail:** cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA  
DE MISERICORDIA DE PORTO  
ALEGRE - ISCMPA



Sobre os critérios de exclusão: pacientes do sexo masculino, do sexo feminino com o mesmo quadro clínico mas com tumor primário em outra localização, que não exclusivamente na mama.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Já referidos em parecer emitido anteriormente.

**Recomendações:**

Não aplicável.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Foram adequadas as seguintes situações:

Foram adequadas as seguintes situações:

- Cronograma: para início das atividades em março/ 2013.
- Nome do projeto para "Estudo da associação entre o derrame pleural e o câncer de mama", nos seguintes documentos: "Folha de rosto para pesquisa envolvendo seres humanos" e na Plataforma Brasil.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Após reavaliação do protocolo acima descrito, o presente comitê não encontrou óbices quanto ao desenvolvimento do estudo em nossa Instituição e poderá ser iniciado a partir da data deste parecer.

Obs.: 1 - O pesquisador responsável deve encaminhar à este CEP, Relatórios de Andamento dos Projetos desenvolvidos na ISCMPA. Relatórios Parciais (pesquisas com duração superior à 6 meses), Relatórios Finais (ao término da pesquisa) e os Resultados Obtidos (cópia da publicação).

2 - Para o início do projeto de pesquisa, o investigador deverá apresentar a chefia do serviço (onde será realizada a pesquisa), o Parecer Consubstanciado de aprovação do protocolo pelo Comitê de Ética.

Endereço: R. Profº Annes Dias, 285 Hosp. Dom Vicente Scherer  
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: 5132-1485 Fax: 5132-1485 E-mail: cep@santacasa.tche.br

IRMANDADE DA SANTA CASA  
DE MISERICORDIA DE PORTO  
ALEGRE - ISCMPA



PORTO ALEGRE, 05 de Fevereiro de 2013

---

Assinador por:  
Claudio Teloken  
(Coordenador)

Endereço: R. Profº Annes Dias,285 Hosp.Dom Vicente Scherer  
Bairro: 6º andar - Centro CEP: 90.020-090  
UF: RS Município: PORTO ALEGRE  
Telefone: 5132-1485 Fax: 5132-1485 E-mail: cep@santacasa.tche.br

### 5.3. Parecer de Submissão do Artigo “Marcadores de Apoptose no Câncer de Mama Metástático”

+ Novo
 ↳ Responder
 ↳ Excluir
 ↳ Arquivar
 ↳ Lixo Eletrônico
 ↳ Limpar
 ↳ Mover para
 ↳ Categorias
 ⚙️

Artigo Submetido SGP/ JBPMML

---

**JORNAL BRASILEIRO DE**  
**PATOLOGIA**  
**E MEDICINA LABORATORIAL**

Rio de Janeiro, segunda-feira, 2 de março de 2015

**Ilmo(a) Sr.(a)**  
**Prof(a), Dr(a) Jaqueline Lessa Pinheiro**

Referente ao código de fluxo: **1501**  
Classificação: **Artigo Original**

Informamos que recebemos o manuscrito **Marcadores de Apoptose no Câncer de Mama Metastático** será enviado para apreciação dos revisores para possível publicação/participação na(o) **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**. Por favor, para qualquer comunicação futura sobre o referido manuscrito cite o número de referência apresentado acima.

**O (s) autor (es) declara(m) que o presente trabalho é original, sendo que o seu conteúdo não foi nem está sendo considerado para publicação em outro periódico, brasileiro ou do Exterior, seja no formato impresso ou eletrônico.**

Obrigado por submeter seu trabalho a(o) **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**.

Atenciosamente,

**Adagmar Andriolo**  
Editor

**SILVANA MARIA ELOI SANTOS – Patologia Clínica (Medicina Laboratorial)**  
Editor

© 2015 Microsoft | Termos | Privacidade e cookies | Desenvolvedores: Português (Brasil)

#### 5.4. Atividades Complementares

Além da realização do presente estudo com marcadores de apoptose, e das disciplinas e estágio docente, exigidos pelo PPG-Patologia UFCSPA, trabalhei na elaboração do artigo “*METASTATIC BREAST CANCER: CLINICAL ASPECTS AND RISK FACTORS*”, submetido em novembro de 2014, ao ***International Journal of Clinical Oncology***. Atualmente este artigo encontra-se em análise, e apresenta os resultados encontrados no meu Trabalho de Conclusão do Curso de Biomedicina da Ufcsa. (Em Anexo item 5.5.).

Entre as atividades propostas no mestrado e executadas no trabalho de conclusão de curso, estavam à busca de informações clínicas das pacientes, através de seus prontuários. Durante esta busca, encontramos muitas dificuldades em virtude da falta de informações presente nestes documentos. A partir desta situação, surgiu o objetivo de descrever a qualidade dos prontuários médicos. Em consequência a esta proposta, primeiramente originou-se um trabalho de apresentação oral, para o XVII Congresso Gaúcho de Educação Médica, intitulado “*Qualidade dos prontuários Oncológicos em Hospital Escola da UFSCPA*”. (Em Anexo item 5.6.). Posteriormente, junto à colega de mestrado, Grazielle Silveira Fardin, também acadêmica do PPG – Patologia foi realizado um estudo detalhado sobre a presença de informações clínicas em prontuários médicos. Os dados preliminares foram apresentados pela aluna de iniciação científica, Patricia Manfroi, na III Semana Acadêmica da UFCSPA, e atualmente estamos trabalhando na elaboração do artigo científico: *Qualidade de Prontuários Oncológicos em Hospital Escola de Referência do RS*, que será submetido à Revista Brasileira de Educação Médica.

Como atividade complementar ainda, orientei a aluna de iniciação científica, Cassia Braz Caurio, acadêmica do curso de Biomedicina da UFCSPA. Em resultado, obtivemos em 2014 dois **Destaques na III Semana Acadêmica da UFCSPA**, com os trabalhos: “Marcadores de Apoptose no câncer de mama metastático” e “Câncer de Mama Metástático: Aspectos Clínicos e Fatores de Risco”. (Em Anexo item 5.7.).

5.5. Artigo “Metastatic Breast Cancer: Clinical Aspects and Risk Factors”,  
 submetido ao International Journal of Clinical Oncology.

**International Journal of Clinical Oncology**  
**METASTATIC BREAST CANCER: CLINICAL ASPECTS AND RISK FACTORS**  
 --Manuscript Draft--

<b>Manuscript Number:</b>	
<b>Full Title:</b>	METASTATIC BREAST CANCER: CLINICAL ASPECTS AND RISK FACTORS
<b>Article Type:</b>	Original Article
<b>Section/Category:</b>	Gynecology
<b>Abstract:</b>	<p>Background: The developing of breast carcinoma is related to the risk factors and this patients are prone to develop metastases. This study verifies the prevalence of risk factors and presents clinical aspects in patients with metastatic breast cancer.</p> <p>Methods: Descriptive study, in which information from female patients were collected, these patients have a history of breast cancer and a clinical presentation of malignant pleural effusion diagnosed between 2006-2011. Environmental, hereditary and hormonal risk factors were investigated in addition to present clinical features medical reviews. Results: 99 patients with metastatic breast cancer were included in the study. The environmental risk factors, 64.6% of patients were overweight and 64.8% denied being smokers. In hereditary risks, 89.5% were white race and 73.7% reported family history of cancer. In hormonal factors, 86.0% has children and 60.0% used to use hormones. Major metastatic sites found were bones (39.4%) and breast recurrence (22.2%). Infiltrating ductal carcinoma was prevalent in 88.9% of the patients, and 17.3% had triple - negative phenotype. Among the patients, 64.6% progressed to death, and this significant outcome in patients: smokers (<math>p = 0.01</math>), with BMI <math>\geq 30</math> (<math>p = 0.01</math>), family history of cancer (<math>p = 0.01</math>), history of chronic disease (<math>p = 0.004</math>), menarche between 12-14 years (<math>p = 0.006</math>), and menopause between 40-55 years (<math>p = 0.01</math>). Conclusion: With the identification of risk factors prevalent, it is possible to have a clinical trial directed for each group of patients, with effective diagnostic sensitivity, reflecting the control of breast cancer.</p>
<b>Corresponding Author:</b>	Claudia Giuliano Bica, Ph.D Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre Porto Alegre, Rio Grande do Sul BRAZIL
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>	
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal de Ciencias da Saude de Porto Alegre
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>	
<b>First Author:</b>	Jaqueline Lessa Pinheiro, Biomedical
<b>First Author Secondary Information:</b>	
<b>Order of Authors:</b>	Jaqueline Lessa Pinheiro, Biomedical Grazielle Silveira Fardin, Biomedical Stephanie Damasceno Rocha, Master Pathology Cássia Ferreira Braz Caurio, graduate student Giovana Tavares Dos Santos, Master Pathology Claudia Giuliano Bica, PhD
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>	
<b>Author Comments:</b>	



## Abstract

Background: The developing of breast carcinoma is related to the risk factors and this patients are prone to develop metastases. This study verifies the prevalence of risk factors and presents clinical aspects in patients with metastatic breast cancer. Methods: Descriptive study, in which information from female patients were collected, these patients have a history of breast cancer and a clinical presentation of malignant pleural effusion diagnosed between 2006-2011. Environmental, hereditary and hormonal risk factors were investigated in addition to present clinical features medical reviews. Results: 99 patients with metastatic breast cancer were included in the study. The environmental risk factors, 64.6% of patients were overweight and 64.8% denied being smokers. In hereditary risks, 89.5% were white race and 73.7% reported family history of cancer. In hormonal factors, 86.0% has children and 60.0% used to use hormones. Major metastatic sites found were bones (39.4%) and breast recurrence (22.2%). Infiltrating ductal carcinoma was prevalent in 88.9% of the patients, and 17.3% had triple - negative phenotype. Among the patients, 64.6% progressed to death, and this significant outcome in patients: smokers ( $p = 0.01$ ), with BMI  $\geq 30$  ( $p = 0.01$ ), family history of cancer ( $p = 0.01$ ), history of chronic disease ( $p = 0.004$ ), menarche between 12-14 years ( $p = 0.006$ ), and menopause between 40-55 years ( $p = 0.01$ ). Conclusion: With the identification of risk factors prevalent, it is possible to have a clinical trial directed for each group of patients, with effective diagnostic sensitivity, reflecting the control of breast cancer.

**Keywords:** breast; breast neoplasia; malignant pleural effusion; metastatic disease; risk factors; Health Care services.

## Introduction

Breast carcinoma is widely known as the most common cancer among women, with an increasing incidence, currently representing a major public health problem [1].

According to the latest estimate from the International Agency for Research on Cancer in 2008, approximately 1.38 million new cases of breast cancer were diagnosed in the world [2], while in Brazil, the National Cancer Institute estimates 57,120 new cases in 2014. the Rio

Grande do Sul is the Brazilian state with the second highest prevalence of tumors with primary site in the breast with a 87.72 gross incident rate of cases per 100 000 inhabitants [3]. breast cancer is the leading cause of death in world among women, and only in 2011, caused 13,345 deaths in Brazil, these, 99.10% were female [4].

Patients with this malignancy are at risk for developing metastases even after long periods of remission [5]. The main metastatic sites of breast carcinoma are the lungs, bones, brain and liver, and are directly related to the most deaths [6]. the incidence of lung metastases is recurrent in patients with breast cancer and malignant pleural effusion occurs as a frequent complication in these patients [7] and is recognized as a marker of poor prognosis, as well as being associated with a reduction in survival rates of cancer patients [8].

The development of breast carcinoma is related to risk factors of Origin: hormonal, environmental and hereditary [9]. Some of the main risk factors for breast cancer are hormone use, age at late menarche and menopause, obesity [10], smoking and daily alcohol consumption, parity and age at first pregnancy, genetic predisposition and family history of breast cancer, and may be related to patient survival, in addition to influence the prognosis of the disease [11].

Currently the clinical features presented by these patients also represent important indicators for the prognosis and outcome of câncer [12]. Clinical features include the histopathological criteria of the tumor and its immunohistochemical markers that provide classify breast cancer and guide the optimal therapy for each patient [13].

However, data that reflects the surveillance of risk factors and the monitoring of disease progression serve as a tool for cancer hospitals formulate their care practices for these patients and contribute to the epidemiologic basis of this malignancy [14] which represents a serious public health problem [15].

Based on these, the aim of this study was to determine the prevalence of risk factors and clinical features present in patients with metastatic breast cancer.

## **Methodology**

The work is characterized as a descriptive, hospital-based. Inclusion criteria for this study were: female patients with a history of breast cancer and malignant pleural effusion

diagnosed by cytological exam, performed in the pathology laboratory of a referral hospital, between 2006 and 2011. To monitor the outcome of cases the medical history of the patients was followed for 1 year, until December 2012.

The study was based on the gathering of information from the following sources: medical records, Bone scintigraphy, computerized tomography and x-rays, originating from the Referral Hospital, in addition to reports of pathoanatomical exams, cytological, immunohistochemical, and issued by the pathology laboratory at the same Referral Hospital.

The authors categorized the risk factors for breast cancer studied in 3 groups: environmental factors, hereditary factors and hormonal factors.

Representing the environmental factors, the investigated variables were: smoking, alcohol use, and BMI (Body Mass Index).

Related to hereditary factors corresponded to the following variables: race, family history of breast cancer, family history of cancer at another site and history of chronic disease.

And to hormonal factors were checked: Age at menarche, parity, age at first live birth, breastfeeding, use of hormones and menopausal age. In relation to clinical features present, the following information were investigated: histological type of breast cancer, immunohistochemical profile of breast carcinoma, the presence of other metastases, age at diagnosis of the primary cancer and malignant pleural effusion, and death date.

The processing and analysis were performed with the aid of Microsoft Office Excel 2007 program and the statistical software Statistical Package for Social Sciences (SPSS 18®). The risk factors and clinical features were described using absolute and relative frequencies (counts and percentages). To compare risk factors and outcome of patients (death) was used the variance test A NOVA. For this analysis, we considered the significance level of 5% ( $\alpha = 0.05$ ).

This work is in accordance with Resolution 466/12 of the National Health Council, respecting the ethical and legal commitment of anonymity and confidentiality of information, with the approval of the Ethics Committees of the institutions linked under the advice: 1074/10 and 188 / 11. Finally the authors declare that there is no conflict of interest.

## Results

In this study 99 patients with a history of breast cancer and malignant pleural effusion were included, however data loss occurred in each of the risk factors related variables, since the study design is based on a retrospective analysis of medical records. The losses are observed for each variable in Tables 1 and 2.

Table 1 shows the results pertaining to environmental, hormonal and hereditary risk for breast cancer, in patients with secondary to primary breast tumor malignant pleural effusion factors. (Table 1).

In reference to environmental factors, it is noteworthy that among the 19 smokers, 68.4% (n = 13) reported the habit for over 20 years.

In hereditary factors, it was observed that among the 8 patients who reported a family history of breast cancer, 75% (n = 6) had such a history of relatives with I Grade (father, mother and / or siblings). It is worth noting that among the 20 patients who reported a family history of cancer at another site, 80% (n = 16) also had such a history with relatives I Grade

Still corresponding to hereditary factors, it is noteworthy that among the 23 patients with chronic disease, 26.1% (n = 6) reported having a previous diagnosis of Hypertension (HBP) and 30.4% (n = 7) had concomitant diagnosis of hypertension and *diabetes mellitus*. The investigation of this variable also provided to identify patients with: Hypothyroidism, Chronic Kidney Disease, Chronic Obstructive Pulmonary Disease (COPD), hepatitis and human papillomavirus (HPV).

In relation to the hormonal factors of 37 patients who have children, 62.1% (n = 23) completed two or more pregnancies. In 18 patients who were taking hormones, 38.9% (n = 7) reported oral contraception and 5.5% (n = 1) took hormone replacement therapy. Among these 18 patients, 84.7% (n = 13) also reported that they used hormones for more than 5 years period.

Risk factors for breast cancer were also related to the outcome of the patients. (Table 2) fatal outcomes was frequently significant in patients: smokers (73.7% (p = 0.01)), with an index of body mass  $\geq 30$  (76.9% (p = 0.01)) with a family history of breast cancer (75.0% (p = 0.03)), and cancer at another site (70% (p = 0.01)), with a history of chronic disease (87% (p = 0.004))

with menarche 12 - 14 years (87.5% ( $p = 0.006$ )), and menopause from 40 - 55 years (70.8% ( $p = 0.01$ )).

In addition to malignant pleural effusion, are shown in Figure 1, other metastatic sites developed for these patients (Figure 1). It was found that at the time of diagnosis of dissemination breast cancer, 16.1% ( $n = 16$ ) of women had 2 metastatic foci concomitantly.

In the presence of bone metastasis ( $n = 39$ ), shows that the most affected regions were the spine and thorax, 20.5% ( $n = 8$ ) and 15.3% ( $n = 6$ ) of cases, respectively.

Regarding the characteristics of the development of metastasis, the diagnosis of malignant pleural effusion was the first metastatic manifestation in 45.4% ( $n = 45$ ) of patients surveyed in this study ( $n = 99$ ). (Table 3). The appearance of a second prevalent in metastasis was 69.6% ( $n = 69$ ) patients, and third metastasis in 32.3% ( $n = 32$ ).

In 23.2% ( $n = 23$ ) of patients, the first metastatic foci arose before reaching 1 year of diagnosis of breast cancer, and 77.7% ( $n = 77$ ) of women before completing five years of primary neoplasm.

It was also identified that the interval between the diagnosis of the first and second metastatic foci was less than 1 year, 48.8% ( $n = 48$ ) of the cases studied, thus demonstrating the rapid evolution of the disease. It was also observed that 6.06% ( $n = 6$ ) of patients only came to develop some focus of metastasis, 10 years after the occurrence of breast carcinoma.

Histological prevalence in the study group ( $n = 99$ ) showed that 88.9% ( $n = 88$ ) of patients had ductal carcinoma, 6.1% ( $n = 6$ ) infiltrating carcinoma of lobular type and 5.0% ( $n = 5$ ) other histological types.

The immunohistochemical profile of breast carcinoma was identified in 75 patients. This, 62.6% ( $n = 47$ ) showed positive expression of estrogen receptors and 56.0% ( $n = 42$ ) for progesterone receptors. The p53 protein was found in 45.3% ( $n = 34$ ) patients, the c-erbB-2 in 38.6% ( $n = 29$ ) and Ki-67 showed a higher expression 50% in 26,6% ( $n = 20$ ) of patients. The expression of the triple-negative phenotype was identified in 17.3% ( $n = 13$ ) of the cases studied.

Among the 99 patients followed in the study, 64.6% ( $n = 64$ ) progressed to death. The interval between the last diagnosed metastasis and death was less than 6 months in 39.3% ( $n =$

39) patients, and did not exceed the period of 1 year and 10 months, this group of women studied.

The mean and standard deviation of age of the patients during the most prevalent events were in the diagnosis of breast cancer: 51 years and 7 months (SD = 13 years 5 months), in the diagnosis of malignant pleural effusion, 56 years old and 6 months (SD = 12 years and 6 months) and age at death: 58 years (SD = 13 years).

## **Discussion**

The present study has methodological limitations. Data collection was based mainly on information from the medical records. In this respect, there was inconsistency in this database since, in relation to risk factors, the records were incomplete, thus yielding different data loss for each of the variables investigated. A previous study [16] has highlighted the difficulty in research with medical records, and stressed the need to have highly qualified records, as these documents are widely useful, both for patient care and for research activities.

Among the environmental risk factors, smoking and alcohol consumption were denied by most patients, but among women smokers, the mortality rate was very significant (73.7% ( $p = 0.01$ )), the which reinforces the complications and co-morbidities related to smoking and extols the importance of implementing community actions that propose avoiding smoking. The Body Mass Index (BMI) in our study demonstrated that the majority of women surveyed had overweight. The body weight gain in breast cancer survivors, was also demonstrated in a study [17] conducted in southern Brazil, noted that overweight and obesity in 57.13% of adult women ( $\leq 59$  years) and 63.4% older women ( $\geq 60$  years). We also found that 55.5% of overweight patients and 76.9% of women with obesity nonsurvivor was also a significant relationship between this outcome and the body mass index  $\geq 30$  ( $p = 0.01$ ). Recent study [18] in patients with breast cancer noted this association between excess weight and the increased risk of mortality and interference factor in this decreased response to treatment. Knowledge about environmental risk factors and information on its clinical effects should always be highlighted in the population, as has been associated with increased recurrence of cancer and complications after breast surgery, as well as increasing the probability of detecting the disease at an advanced stage [19].

About hereditary risk factors, we highlight the prevalence of family history of breast cancer in 21.1% of patients studied. The literature widely describes the relationship of this factor with significantly increased risk of developing breast cancer [10], and a recent study in Minas Gerais [20] also recorded the presence of such history in 20.1% of their patients and identify the association of this variable with the degree of staging breast cancer. This study also noted the relationship of this hereditary factor in the prognosis of neoplastic disease, since fatal outcomes was significant in the presence of family history of breast cancer ( $p = 0.03$ ) and family history of cancer at another site ( $p = 0.01$ ). However, deem it necessary to emphasize to managers of health services, we should update the clinical approaches used for patients with a family history of cancer, and the development of important actions to increase access to biological screening tests to inherited mutations in order to promote increase control to breast cancer.

In hormonal factors, we found that 86.0% of the patients surveyed reported having children, agreeing with the study of Soares et al. (2012) [20], in which 87.8% of patients with breast cancer had children. Studies investigating the relationship between hormonal factors and breast carcinoma indicate that women who have their first child after age 30 have a higher risk of developing this disease [21,22]. In our study only one patient reported metastatic parity after 30 years, not suggesting this relationship. A study on the variables associated with breast cancer quotes that oral contraceptives increase the proliferation of malignant cells already present in the breast tissue, and identified oral contraception in 41.1% of the women screened [23], agreeing with the frequency observed in our study, in which 38.9% of patients were using such hormones. Knowing these hormonal characteristics allows to develop community action, to clarify the effects of such habits in the life of the female population.

The histological type of breast câncer prevalente in this study was ductal carcinoma in 88.9% of women agreeing with a recent study [24], which showed this histological type in 73.3% of their patients. Similarly to the study of Salles et al. (2009) [25], which classified 21.8% of their cases as triple - negative, the expression of this phenotype was observed in 17.3% of patients studied. Recent study by Taggart (2012) [5], explains that patients with breast cancer have risk for breast recurrence by up to 20 years. Among the patients in the present study, recurrence was identified in 22.2% of women.

The rate of patients who progressed to death was statistically significant in our study, affecting 64% of women, thus agreeing with previous studies [7,8] that recognize the malignant pleural effusion as a marker of poor prognosis, being related to lower survival rates in oncology patients. In this context, we need to increase knowledge about the causes that favor the progression of metastatic breast cancer in our population.

## **Conclusion**

Based on these results, we conclude that obesity and a family history of cancer were the most frequent risk factors in patients studied concurrently presenting a significant relationship with death as the outcome. Whereas all patients surveyed had a malignant pleural effusion, and the vast majority progressed to death, suggest that this metastatic site is associated with poor prognosis and increased mortality rates.

The data that reflects the risk factors associated with breast cancer and such knowledge of the clinical aspects related to the development of metastatic disease, directly contribute to the epidemiologic basis of this malignancy, and offer subsidies to promote public actions to combat breast cancer, which currently represents a serious public health problem.

Finally, we suggest the identification of the most prevalent risk factors in different population groups, to establish the profile of breast carcinoma in each group of patients, and thus promote a targeted clinical screening with diagnostic sensitivity effectively, which reflects the control measures to breast cancer and promoting women's health.

## **References**

1. Azevedo e Silva G. Câncer de mama no Brasil: estratégias para o seu enfrentamento. *Cad Saúde Pública*. 2012; 28(1):4.
2. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer. *Globocan 2008*. [citado 24 abr 2013]. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>.
3. Instituto Nacional de Câncer. *Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil*. [citado 25 mar 2014]. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014>.
4. Instituto Nacional de Câncer. *Tipos de câncer: Mama*. [citado 25 mar 2014]. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>
5. Taggart FM , Donnelly PK , Dunn JA. Options for early breast cancer follow-up in primary and secondary care - a systematic review. *BMC Cancer*. 2012; 12(1):238.



6. Koo JS, Jung W, Jeong J. Metastatic breast cancer shows different immunohistochemical phenotype according to metastatic site. *Tumori*. 2010; 96(3):424-432.
7. Matsubara N, Itoh K, H Mukai, Nagai S. Long-term outcome of pleurodesis with OK-432 in metastatic breast cancer: a new risk model for success from an analysis of 75 cases. *Int J Clin Oncol*. 2011; 16:312-315.
8. Van Galen KP, Visser HP, Van der Ploeg T, Smorenburg CH. Prognostic factors in patients with breast cancer and malignant pleural effusion. *Breast J*. 2010; 16(6):675-677.
9. Da Silva PA; Riul SS. Câncer de mama: fatores de risco e detecção precoce. *Rev. Bras. Enferm*. 2011; 64(6):1016-1021.
10. Nelson HD, Zakher B, Cantor A, R Fu, Griffin J, O'Meara ES, et al. Risk factors for breast cancer for women aged 40 to 49 years: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*. 2012; 156(9):635-648.
11. Barnett GC, Shah M, Redman K, Easton DF, Ponder BA, Pharoah PD. Risk Factors for the Incidence of Breast Cancer: Do They Affect Survival From the Disease? *J Clin Oncol*. 2008; 26(20):3310-3316.
12. Brito NMB, Sampaio PCM, Castro AAH, Oliveira MR. Características clínicas de mulheres com carcinoma mamário ductal invasivo submetidas à quimioterapia neoadjuvante. *Rev. Para. Med*. 2007; 21(4):37-41.
13. De Abreu FB, Schwartz GN, Wells WA, Tsongalis GJ. Personalized Therapy for Breast Cancer. *Clin Genet*. 2014.
14. Andrade CT, Magedanz AMPCB, Escobosa DM, Tomaz WM, Santinho CS, Lopes TO, et al. A importância de uma base de dados na gestão de serviços de saúde. *Einstein (São Paulo)*. 2012; 10(3):360-365.
15. Trufelli DC, Miranda VC, Santos MBB, Fraile NMP, Pecoroni PG, Gonzaga SFR, et al. Análise do atraso no diagnóstico e tratamento do câncer de mama em um hospital público. *Rev Assoc Med Bras* 2008; 54(1):72-76.
16. Silva, FG, Tavares-Neto, J. Avaliação dos prontuários médicos de hospitais de ensino do Brasil. *Rev. Bras. Educ. Med*. 2007; 31(2):113-126.
17. Rubin, BA, Stein, AT, Zelmanowicz, AM, Rosa, DD. Perfil Antropométrico e Conhecimento Nutricional de Mulheres Sobreviventes de Câncer de Mama do Sul do Brasil. *Rev. Bras. Canc*. 2010; 56(3):303-309.
18. Del Fabbro E, Parsons H, Warneke CL, Pulivarthi K, Litton JK, Dev R, et al. The Relationship Between Body Composition and Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Women with Operable Breast Cancer. *Oncologist*. 2012; 17(10):1240-1245
19. Cohen SS, Palmieri RT, Nyante SJ, Koralek DO, Kim S, Bradshaw P, et al. Obesity and screening for breast, cervical, and colorectal cancer in women: a review. *Cancer*. 2008; 112(9):1892-1904.
20. Soares, PBM et al. Características das mulheres com câncer de mama assistidas em serviços de referência do Norte de Minas Gerais. *Rev. bras. epidemiol*. 2012; 15(3):595-604.

21. Sweeney C, Baumgartner KB, Byers T, Giuliano AR, Herrick JS, Murtaugh MA, et al. Reproductive history in relation to breast cancer risk among Hispanic and non-Hispanic white women. *Cancer Causes Control*. 2008; 19(4):391-401.
22. McCredie M, Paul C, Skegg DC, Williams S. Reproductive factors and breast cancer in New Zealand. *Int J Cancer*. 1998; 76(2):182-188.
23. Pinho VF, Coutinho ES. Variáveis associadas ao câncer de mama em usuárias de unidades básicas de saúde. *Cad. Saúde Pública* 2007; 23(5):1061-1069.
24. Cintra JR; Teixeira MTB; Diniz RW; Junior HG; Florentino TM; De Freitas GF; et al. Perfil imuno-histoquímico e variáveis clinicopatológicas no câncer de mama. *Rev. Assoc. Med. Bras*. 2012; 58(2):178-187.
25. Salles, M. A; Cúrcio V. S; Perez A. A; Gomes D S; Gobbi H. Contribution of immunohistochemistry to the assessment of prognostic and predictive factors of breast cancer and to the diagnosis of mammary lesions. *J Bras Patol Med Lab*. 2009; 45(3):213-222.

**Tabela 1** – Major risk factors associated with breast carcinoma in patients with metastatic breast cancer.

	<b>Risk Factor</b>	<b>N = 99<sup>1</sup></b>
<b>Environmental variables</b>	<b>Smoking</b>	
	Smoker	19 (35,2%)
	Denies being a smoker	35 (64,8%)
	<i>Total</i>	54 (100%)
	<b>Use of alcohol</b>	
	use	2 (3,8%)
	Denies the use	51 (96,2%)
	<i>Total</i>	53 (100%)
	<b>Índice de Massa Corporal<sup>2</sup></b>	
	18,6 – 24,9	17 (35,4%)
25 – 29,9	18 (37,5%)	
≥ 30	13 (27,1%)	
<i>Total</i>	48 (100%)	
<b>Hereditary variables</b>	<b>Race</b>	
	White	34 (89,5%)
	Black	4 (10,5%)
	<i>Total</i>	38 (100%)
	<b>Family History of Breast Cancer</b>	
	Affirm	8 (21,1%)
	Denies	30 (78,9%)
	<i>Total</i>	38 (100%)
	<b>Family History of Cancer at another site</b>	
	Affirm	20 (52,6%)
Denies	18 (47,4%)	
<i>Total</i>	38 (100%)	
<b>History of Chronic Disease</b>		
Affirm	23 (34,8%)	
Denies	43 (65,2%)	
<i>Total</i>	66 (100%)	
<b>Hormonal variables</b>	<b>Age of menarche</b>	
	Before 12 years old	4 (14,3%)
	12 – 14 years old	16 (57,1%)
	15 years old or more	8 (28,6%)
	<i>Total</i>	28 (100%)
	<b>Children</b>	
	Affirm	37 (86,0%)
	Denies	6 (14,0%)
	<i>Total</i>	43 (100%)
	<b>1st Gestation Age</b>	
	Before 20 years old	2 (28,6%)
	20 – 30 years old	4 (57,1%)
	After 30 years old	1 (14,3%)
	<i>Total</i>	7 (100%)
	<b>Breast-feeding</b>	
Affirm	4 (80,0%)	
Denies	1 (20,0%)	
<i>Total</i>	5 (100%)	
<b>Use of Hormones</b>		
Affirm	18 (60,0%)	
Denies	12 (40%)	
<i>Total</i>	30 (100%)	
<b>Age of Menopause</b>		

	Before 40 years old	7 (19,4%)
	40 – 55 years old	24 (66,7%)
	After 55 years old	1 (2,8%)
	Denies (DUM) <sup>3</sup>	4 (11,1%)
	<i>Total</i>	<i>36 (100%)</i>

1 Due to lack information in the medical records, it was not possible to assess the study variables in all patients

2 Classification according to **World Health Organization** (WHO / WHO): BMI: 18.6 to 24.9: Healthy, 25 to 29.9: Excess Weight and  $\geq 30$ : Obesity.

3DUM (date of last menstrual period)

**Tabela 2** – Ratio between the risk factors associated with breast cancer and the outcome (death), in patients studied.

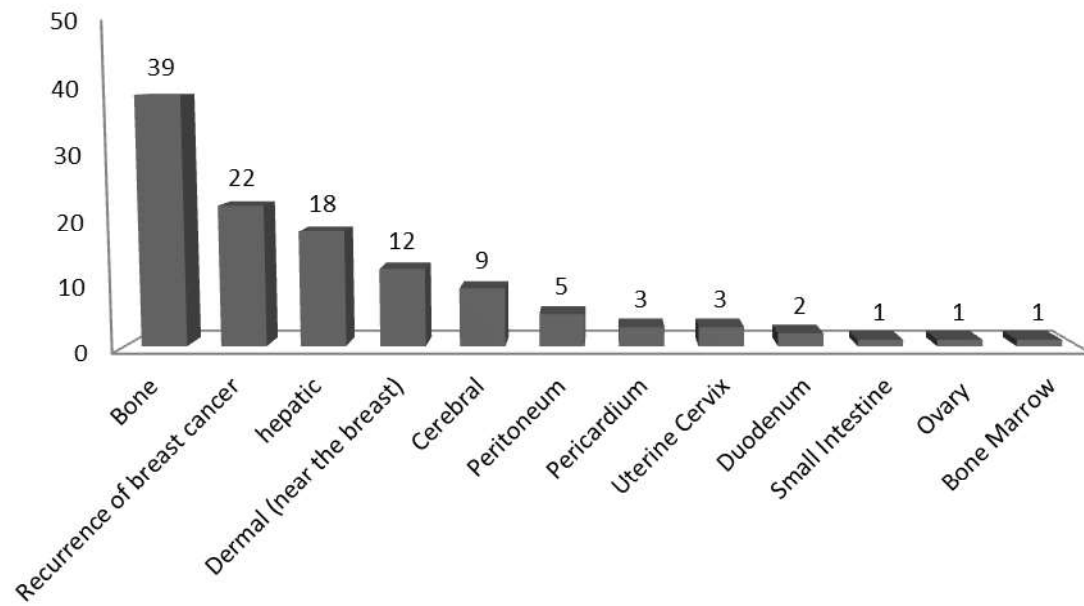
Risk Factors	Desfecho (Óbito)			Valor <i>p</i>
	Sim	Não	Total	
Smoker	14 (73,7%)	5 (26,3%)	19 (100%)	<b>0,014</b>
Denies	18 (51,4%)	17(48,6%)	35 (100%)	
Use alcohol	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (100%)	0,333
Denies	33 (64,7%)	18 (35,3%)	51 (100%)	
Body Mass Index:				
18,6 – 24,9	11 (64,7%)	6 (35,3%)	17 (100%)	0,225
25 – 29,9	10 (55,5%)	8 (44,5%)	18 (100%)	0,637
≥ 30	10 (76,9%)	3 (23,1%)	13 (100%)	<b>0,019</b>
Ethnicity: White	20 (58,8%)	14 (41,1%)	34 (100%)	0,317
Ethnicity: Black	3 (75,0%)	1 (25,0%)	4 (100%)	
Family History				
Breast Cancer	6 (75,0%)	2 (25,0%)	8 (100%)	<b>0,038</b>
Denies	18 (60,0%)	12 (40,0%)	30 (100%)	
Family History				
Cancer at another site	14 (70,0%)	6 (30,0%)	20 (100%)	<b>0,014</b>
Denies	10 (55,5%)	8 (44,5%)	18 (100%)	
History of Chronic Disease	20 (87,0%)	3 (13,0%)	23 (100%)	<b>0,004</b>
Denies	24 (56,0%)	19 (44,0%)	43 (100%)	
Menarche:				
Before 12 years old	2 (50,0%)	2 (50,0%)	4 (100%)	0,103
12 – 14 years old	14 (87,5%)	2 (12,5%)	16 (100%)	<b>0,006</b>
15 years old or more	2 (25,0%)	6 (75,0%)	8 (100%)	0,157
Children	23 (62,2%)	14 (37,8%)	37 (100%)	0,139
lacks	2 (33,3%)	4 (66,7%)	6 (100%)	
1st pregnancy:				
Before 20 years	1 (50,0%)	1 (50,0%)	2 (100%)	-
20-30 anos	3 (75,0%)	1 (25,0%)	4 (100%)	
After 30 years	1 (100%)	0 (0%)	1 (100%)	
Suckled	4 (100%)	0 (0%)	4 (100%)	-
Denies	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	
Use to use Hormones	10 (55,5%)	8 (44,5%)	18 (100%)	0,637
Denies	9 (75,0%)	3 (25,0%)	12 (100%)	
Menopause:				
Before age 40	4 (57,1%)	3 (42,9%)	7 (100%)	0,047
40 - 55 anos	17 (70,8%)	7 (29,2%)	24 (100%)	<b>0,012</b>
After 55 years	0 (0%)	1 (100%)	1 (100%)	-
Denies (Last menstruation Date)	1 (25,0%)	3 (75,0%)	4 (100%)	0,052

\* Due to (n) of the variables: age at first pregnancy, breastfeeding, and menopause after 55 years old, it was not possible to calculate the value of p.

**Table 3** - Sequence in which metastatic sites were found in the patients studied.

Metastatic sites Number of Patients (%)	Metastatic sites Number of Patients (%)
<i>1st Metastasis Diagnosed</i>	
<b>Pleural Effusion Neoplasm (Positive Pap)</b>	45 (45,5%)
<b>Bones</b>	19 (19,2%)
<b>Recurrent breast</b>	13 (13,1%)
<b>Other sites</b>	22 (22,2%)
<b>Tota</b>	99 (100%)
<i>2nd Metastasis Diagnosed</i>	
<b>Pleural Effusion Neoplasm (Positive Pap)</b>	32 (46,4%)
<b>Bones</b>	12 (17,4%)
<b>Recurrent breast</b>	7 (10,1%)
<b>Liver</b>	6 (8,7%)
<b>Other sites</b>	12 (17,4%)
<b>Total</b>	69 (100%)
<i>3rd Metastasis Diagnosed:</i>	
<b>Pleural Effusion Neoplasm (Positive cytopathological exam)</b>	10 (31,3%)
<b>Bones</b>	5 (15,6%)
<b>Liver</b>	5 (15,6%)
<b>Cerebral</b>	4 (12,5%)
<b>Recurrent breast</b>	2 (6,2%)
<b>Other sites</b>	6 (18,8%)
<b>Total</b>	32 (100%)

**Fig. 1** - Other metastatic sites developed for patients with secondary to primary breast tumor malignant pleural effusion.



5.6. *Certificado de Apresentação Oral no XVII Congresso Gaúcho de Educação Médica*



## XVII CONGRESSO GAÚCHO DE EDUCAÇÃO MÉDICA

'TRANSFORMANDO O ENSINO MÉDICO'  
PELOTAS/UCPEL

### CERTIFICADO

Jaqueline Lessa Pinheiro

Participou do XVII Congresso Gaúcho de Educação Médica, promovido pelo Curso de Medicina da Universidade Católica de Pelotas e pela Associação Brasileira de Educação Médica, realizado no período de 15 a 17 de maio de 2014, na cidade de Pelotas, na qualidade de Apresentador de trabalho na categoria oral com autoria de Pinheiro, J.L.; Fardin, G.S.; Santos, G.T.; Flores, J.M.; Machado, Y.T.; Scheide, T.V.; Dworzecki, M.; Bica, C.G., Intitulado Qualidade dos prontuários Oncológicos em Hospital Escola da UFSCPA.

Luiza Novaes  
Coordenadora do curso de  
Medicina UCPEL

Sandro Schreiber Oliveira  
Diretor Regional Sul I  
Associação Brasileira de Educação Médica

Eduardo Arquimino Postal  
Presidente Discente  
XVII CGEM

Realização:





### 5.7. Certificados de Destaque na III Semana Acadêmica da UFCSPA em 2014.



22 a 25 de setembro de 2014



um evento da  
SEMANA NACIONAL DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA 2014



UFCSPA  
Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre



**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho intitulado " MARCADORES DE APOPTOSE NO CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO", apresentado por CÁSSIA FERREIRA BRAZ CAURIO e de autoria de CÁSSIA FERREIRA BRAZ CAURIO ,CLAUDIA GIULIANO BICA ,JOÃO CARLOS PROLLA,JAQUELINE LESSA PINHEIRO,GRAZIELLE SILVEIRA FARDIN,GIOVANA TAVARES DOS SANTOS,ROSICLER BRACKMANN MENDES,TERESINHA STEIN,ROSALVA THEREZA MEURER,KELI CRISTINE REITER,PATRÍCIA DE ARAÚJO MANFROI ,MELISSA PERIN ,ANA PAULA THIESEN, foi trabalho DESTAQUE, na categoria Trabalhos Relacionados à Pesquisa na III Semana Acadêmica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, ocorrida de 22 a 25 de setembro de 2014 na cidade de Porto Alegre - RS.



Deisi Cristina Gollo Marques Vidor  
Pró-Reitora de Extensão da UFCSPA



Maria Terezinha Antunes  
Pró-Reitora de Graduação da UFCSPA



Rodrigo Dell'Água Pientz  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da UFCSPA



22 a 25 de setembro de 2014



um evento da  
SEMANA NACIONAL DE  
CIÊNCIA E TECNOLOGIA 2014



UFCSPA  
Universidade Federal de Ciências da Saúde  
de Porto Alegre



**CERTIFICADO**

Certificamos que o trabalho intitulado " CÂNCER DE MAMA METASTÁTICO: ASPECTOS CLÍNICOS E FATORES DE RISCO", apresentado por CÁSSIA FERREIRA BRAZ CAURIO e de autoria de CÁSSIA FERREIRA BRAZ CAURIO ,CLAUDIA GIULIANO BICA ,JOÃO CARLOS PROLLA,JAQUELINE LESSA PINHEIRO,GRAZIELLE SILVEIRA FARDIN,STEPHANIE DAMASCENO ROCHA,GIOVANA TAVARES DOS SANTOS,ROSICLER BRACKMANN MENDES,PATRÍCIA DE ARAÚJO MANFROI ,MELISSA PERIN ,ANA PAULA THIESEN, foi trabalho DESTAQUE, na categoria Trabalhos Relacionados à Pesquisa na III Semana Acadêmica da Universidade Federal de Ciências da Saúde de Porto Alegre, ocorrida de 22 a 25 de setembro de 2014 na cidade de Porto Alegre - RS.



Deisi Cristina Gollo Marques Vidor  
Pró-Reitora de Extensão da UFCSPA



Maria Terezinha Antunes  
Pró-Reitora de Graduação da UFCSPA



Rodrigo Dell'Água Pientz  
Pró-Reitor de Pesquisa e Pós-Graduação da UFCSPA