

FRANCINI DE MATTOS LIMA LIN

**Avaliação da expressão imunoistoquímica de PTEN, AKT fosforilada e receptor de androgênio em carcinomas de mama HER-2 positivos**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de: Ginecologia e Obstetrícia  
Orientadora: Profa. Dra. Filomena Marino Carvalho

**São Paulo  
2012**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Lin, Francini de Mattos Lima

Avaliação da expressão imunoistoquímica de PTEN, AKT fosforilada e receptor de androgênio em carcinomas de mama HER-2 positivos / Francini de Mattos Lima Lin. -- São Paulo, 2012.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.  
Programa de Ginecologia e Obstetria.

Orientadora: Filomena Marino Carvalho.

Descritores: 1.Neoplasias da mama 2.Receptor do fator de crescimento epidérmico 3.PTEN fosfohidrolase 4.Proteína oncogénica v-akt 5.Receptor androgénico 6.Carcinoma apócrino molecular 7.Imunoistoquímica

USP/FM/DBD-355/12

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus amados pais, José e Joana, a minha querida avó Alisdete, aos meus irmãos e eternos amigos Haroldo e Franklin, ao meu amor e companheiro de vida Chin Jia e à pequena Nicole, que em suas poucas semanas de vida intrauterina já nos traz tanta felicidade!

A vocês, que são as pessoas que mais amo em minha vida!

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Dra. Filomena Marino Carvalho que me deu a oportunidade de desenvolver esta tese sob sua orientação e apreciar muito de perto seu profundo conhecimento e sua paixão pela boa ciência. Meus sinceros agradecimentos pela sua dedicação a mim durante estes anos, pelos seus ensinamentos, pelas críticas e pela paciência. Ao seu lado aprendi muito!

Ao Professor Dr. Carlos E. Bacchi, que possibilitou a execução de grande parte deste estudo através da Consultoria em Patologia tanto em São Paulo quanto em Botucatu. Obrigada pelo acolhimento e pelo empenho de seus funcionários na execução de etapas específicas deste trabalho.

Ao meu esposo Chin Jia, meu grande amor e incentivador. Companheiro de todas as horas, exemplo de pesquisador zeloso e admirável cientista. Obrigada por compreender os momentos de minha ausência dedicados aos estudos.

Aos meus pais, José e Joana, alicerces de minha vida. Pais sempre presentes que desde a infância apóiam e incentivam minhas conquistas.

Às pacientes com câncer de mama. Mulheres fortes e vitoriosas que possibilitaram a realização desta tese e que são a razão maior deste estudo.

Por fim, “Àquele que é capaz de fazer infinitamente mais do que tudo o que pedimos ou pensamos, de acordo com seu poder que atua em nós (...)”

Carta aos Efésios, capítulo 3 versos 20 e 21

A Deus seja a glória por todas as gerações, para todo o sempre!

Obrigada, Senhor!

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: *Adaptado de International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Aneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos	
Lista de Figuras	
Lista de Tabelas	
Resumo	
Summary	
1. Introdução.....	1
2. Objetivos.....	7
3. Revisão da Literatura	
3.1. O câncer de mama.....	8
3.2. A família HER.....	14
3.3. HER-2.....	16
3.4. Vias de sinalização.....	22
3.5. Terapia alvo.....	24
3.6. Mecanismos de resistência ao trastuzumabe.....	28
3.7. Expressão do receptor de androgênio nos tumores de mama e seu significado prognóstico.....	33
4. Métodos	
4.1. Aprovação institucional.....	37
4.2. Seleção dos casos.....	37
4.3. Método anatomopatológico.....	40
4.4. Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA).....	42
4.5. Exame imunoistoquímico.....	47
4.6. Interpretação imunoistoquímica.....	49
4.7. Análise estatística.....	55
5. Resultados.....	57
6. Discussão.....	73
7. Conclusões.....	85
8. Anexos.....	87
9. Referências.....	89

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AKT	Oncogene descrito pela primeira vez em camundongos da linhagem Ak. A letra “t” refere-se à transformação.
ASCO	<i>American Society of Clinical Oncology</i>
BCL-2	Gene de efeito antiapoptótico descoberto em linfomas de células B (do inglês, <i>B cell lymphoma</i> )
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CAPpesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CISH	hibridização cromogênica in situ
DHEA	dehidroepiandrosterona
DNA	Ácido desoxirribonucleico
ErbB	Fator de crescimento epidermal humano
FISH	hibridização <i>in situ</i> com fluorescência
HER-2	<i>Human Epidermal Receptor</i>
IHQ	imunoistoquímica
MAPK	<i>mitogen-activated protein kinase</i>
mm	milímetros
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>
NK	natural killers
OMS	Organização Mundial da Saúde
PI3K	fosfatidil-inositol-3 quinase
PIP2	fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato
PIP3	fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato
PKB	proteína quinase B
PTEN	<i>phosphatase and tensin homolog</i>
RA	receptor de androgênio
RE	receptor de estrogênio
RP	receptor de progesterona
RTK	receptor tirosino-quinase
SDHEA	sulfato de dehidroepiandrosterona



SOE	sem outra especificação
SP	São Paulo
TMA	Microarranjo de tecido
UDLT	Unidade ducto lobular terminal
vs	<i>versus</i>
µm	micra

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Família dos receptores de fatores de crescimento epidermal humano (ErbB).....	16
Figura 2	Carcinoma mamário com amplificação do HER-2 através da técnica de hibridização “in situ” com fluorescência.....	19
Figura 3	Vias de sinalização MAPK e AKT.....	23
Figura 4	Carcinoma mamário com positividade forte e difusa da proteína HER2 em membrana citoplasmática, caracterizado como escore 3+ (anticorpo SP3 – aumento original 400X).....	38
Figura 5	Características morfológicas apócrinas determinadas pelo citoplasma amplo, fortemente eosinófilico e granuloso (hematoxilina-eosina – aumento original 400X).....	41
Figura 6	Êmbolo de células neoplásicas em linfático de eixo vascular peritumoral (hematoxilina-eosina – aumento original 400X).....	42
Figura 7	Etapas da construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA). A: seleção da área tumoral na lâmina superposta ao bloco de parafina. B: Retirada do cilindro de tecido tumoral medindo 2,0mm de diâmetro. C e D: Disposição dos cilindros de amostra tumoral em bloco de parafina receptor. Ordenação em linhas e colunas com distância de 2,0mm entre as amostras. E: Aspecto final dos blocos de microarranjos de tecido.....	44
Figura 8	Mapa de um dos blocos de microarranjos de tecido (TMA).	46
Figura 9	Receptor de estrogênio positivo na maioria das células neoplásicas com positividade nuclear (aumento microscópico original 400X).....	49

Figura 10	Receptor de progesterona com positividade nuclear forte e difusa em carcinoma ductal invasivo (A) e presente em 30% das células neoplásicas em um dos casos de carcinoma mucinoso (B) (aumento microscópico original 400X).....	50
Figura 11	Receptor de androgênio positivo difusamente com marcação nuclear (aumento microscópico original 400X).....	51
Figura 12	Ki-67 positivo em 20% das células neoplásicas (aumento microscópico original 400X).....	52
Figura 13	Ki-67 positivo em 70% das células neoplásicas (aumento microscópico original 400X).....	53
Figura 14	Carcinoma mamário com 100% das células com positividade nuclear para PTEN (aumento microscópico original 400X).....	54
Figura 15	Carcinoma ductal invasivo com positividade nuclear para AKT em 100% das células neoplásicas (aumento microscópico original 400X).....	55
Figura 16	Curvas de Kaplan-Meyer para eventos desfavoráveis (recorrência locoregional, recorrência à distância e óbito) segundo a expressão de AKT.....	67
Figura 17	Curvas de Kaplan-Meyer para eventos desfavoráveis (recorrência locoregional, recorrência à distância e óbito) segundo a perda de expressão do PTEN.....	68
Figura 18	Curvas de Kaplan-Meyer para eventos desfavoráveis (recorrência locoregional, recorrência à distância e óbito) segundo a expressão de RA.....	69
Figura 19	Curva de Kaplan-Meyer para eventos adversos segundo o perfil molecular apócrino (RE-/RA+).....	70

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Eventos desfavoráveis na evolução de 12 pacientes com carcinoma de mama HER2-positivo.....	39
Tabela 2	Especificações técnicas dos anticorpos primários e tipo de recuperação antigênica utilizados no exame imunoistoquímico.....	48
Tabela 3	Distribuição dos tipos histológicos tumorais.....	57
Tabela 4	Características clínico-patológicas clássicas nos 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivos.....	58
Tabela 5	Associações entre as características clínico patológicas e a perda da expressão de PTEN.....	59
Tabela 6	Associações entre as características clínicopatológicas e a expressão de AKT fosforilada em 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivo.....	61
Tabela 7	Associação entre expressão de AKT e PTEN em 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivo.....	62
Tabela 8	Associações entre as características clínicopatológicas e a expressão de receptor de androgênio em carcinomas mamários HER-2 positivos.....	63
Tabela 9	Associações entre o perfil molecular apócrino (RE-negativo/RA-positivo) e as características clínicopatológicas em 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivo.....	65
Tabela 10	Associações entre as características clínicopatológicas e características morfológicas apócrinas em carcinomas mamários HER-2 positivos.....	66
Tabela 11	Análise univariada para probabilidade de evento adverso na evolução de 55 carcinomas de mama HER-2 positivos.	71
Tabela 12	Características de apresentação dos casos que foram a óbito.....	72

## RESUMO

Lin FML. *Avaliação da expressão imunoistoquímica de PTEN, AKT fosforilada e receptor de androgênio em carcinomas de mama HER-2 positivos* [Tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, 2012.

INTRODUÇÃO: Os carcinomas HER-2 positivos representam cerca de 20-30% de todos os tumores da mama e se caracterizam por curso clínico mais agressivo, com alta proliferação celular e resistência a apoptose, determinados por cascatas de sinalizações intracelulares, tais como a via PI3K/AKT. O trastuzumabe, um anticorpo monoclonal humanizado que se liga à molécula de HER-2, é o tratamento padrão destas pacientes. A resposta a monoterapia com trastuzumabe varia de 12-30% e a persistência da ativação da via PI3K/AKT é um dos mecanismos de resistência. A ativação do AKT começa com a fosforilação do PIP2 a PIP3 pela PI3K. A desfosforilação do PIP3 é mediada pela PTEN e sua deficiência é um dos fatores possivelmente implicados na resistência ao trastuzumabe. Além da resistência à terapêutica, os tumores HER-2 positivos são heterogêneos quanto ao seu comportamento biológico. A busca de diferentes padrões morfológicos e moleculares neste grupo de carcinomas pretende identificar subgrupos prognósticos e preditivos, permitindo a individualização terapêutica. OBJETIVOS: Estudar a expressão imunoistoquímica de duas moléculas da via de sinalização PI3K/AKT (PTEN e AKT fosforilada) e explorar a via de sinalização androgênica através da expressão do receptor de androgênio e dos perfis

morfológico e molecular apócrinos. METODOLOGIA: O estudo foi retrospectivo com revisão dos preparados histológicos e construção de blocos de microarranjos com amostras dos tumores para estudo imunohistoquímico. Na revisão foram avaliados: tipo histológico, características morfológicas apócrinas, presença de componente “in situ”, grau histológico e nuclear, receptores de estrogênio e progesterona, e atividade proliferativa através da expressão imunohistoquímica do Ki-67. Os preparados histológicos foram submetidos à pesquisa de PTEN, AKT fosforilada e receptor de androgênio. Pacientes, familiares e médicos foram contatados para recuperação do seguimento e evolução. RESULTADOS: Foram estudadas 104 pacientes portadoras de carcinoma primário da mama. A expressão de PTEN esteve reduzida em 20/104 (19,2%) dos casos e foi mais freqüente nos tumores com AKT positivo ( $p=0,06$ ). O grupo de tumores sem perda de expressão de PTEN apresentou maior atividade proliferativa. A AKT foi positiva em 71/104 (68,3%) casos e se associou a maior grau de diferenciação e à expressão de receptor de androgênio. O receptor de androgênio foi positivo em 89/104 (85,6%) dos casos e esteve associado ao menor grau histológico ( $p=0,018$ ), receptor de estrogênio ( $p=0,008$ ) e menor atividade proliferativa ( $p=0,001$ ). A ausência da expressão do receptor de estrogênio (perfil molecular apócrino) foi identificada em 41/104 casos (39,4%) e se associou a tumores com grau histológico mais alto. O perfil morfológico apócrino foi identificado em 71 (68,3%) dos casos e se associou a alto grau histológico e nuclear. O seguimento foi possível em 55 casos e observamos tendência a menor sobrevida livre de doença nos tumores AKT-positivos e RA-negativos. CONCLUSÕES: Nossos resultados comprovam a

heterogeneidade dos carcinomas mamários HER-2 positivos e indicam diferenças em pelos menos duas vias de sinalização celulares como possíveis explicações para as mesmas: a via PI3K/AKT e a androgênica.

**Descritores:** 1. Neoplasias da mama 2. Receptor do fator de crescimento epidérmico 3. PTEN fosfohidrolase 4. Proteína oncogênica v-akt 5. Receptor androgênico 6. Carcinoma apócrino molecular 7. Imunoistoquímica

## **SUMMARY**

Lin FML. Immunohistochemical assesment of PTEN, phosphorilated AKT and androgen receptor expression in HER2-positive breast carcinomas [Thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo 2012.

**BACKGROUND:** HER-2 positive carcinomas represent about 20-30% of all breast tumors and are characterized by a more aggressive clinical course with high cell proliferation and apoptosis resistance, determined by cascades of intracellular signals, such as the PI3K/AKT pathway. Trastuzumab, a humanized monoclonal antibody that binds to HER-2 molecule, is the standard treatment for these patients. The response to monotherapy with trastuzumab ranges from 12-30% and the persistence of activation of the PI3K/AKT pathway is one of mechanisms of resistance. Activation of AKT begins with the phosphorylation of PIP2 to PIP3 by PI3K. The dephosphorylation of PIP3 is mediated by PTEN and its deficiency is one of the factors possibly involved in resistance to trastuzumab. In addition to resistance to therapy, HER-2 positive tumors are heterogeneous in their biologic behavior. The search for different morphological and molecular patterns of carcinomas in this group aims to identify prognostic and predictive subgroups, allowing for customized therapy. **OBJECTIVES:** To study the immunohistochemical expression of two molecules of the signaling pathway PI3K/AKT (phosphorylated AKT and PTEN) and to explore the androgen signaling pathway through the expression of androgen receptor and apocrine



morphological and molecular profiles. **METHODS:** This study retrospectively reviewed the histological preparations and built tissue microarray with tumor samples for immunohistochemical study. We assessed histologic type, apocrine morphology, presence of in situ component, histologic and nuclear grade, estrogen and progesterone receptors and proliferative activity through the immunohistochemical expression of Ki-67. The tissue preparations were examined for PTEN, phosphorylated AKT and androgen receptor. Patients, relatives and physicians were contacted for retrieval of follow-up data. **RESULTS:** We studied 104 primary breast cancer patients. The expression of PTEN was reduced in 20/104 (19.2%) cases and was more frequent in tumors with positive AKT ( $p = 0.06$ ). The group of tumors without loss of PTEN expression showed higher proliferative activity. AKT was positive in 71/104 (68.3%) cases and was associated with a higher degree of differentiation and with expression of androgen receptor. The androgen receptor was positive in 89/104 (85.6%) cases and was associated with lower histological grade ( $p = 0.018$ ), estrogen receptor ( $p = 0.008$ ) and lower proliferative activity ( $p = 0.001$ ). The absence of expression of estrogen receptor (apocrine molecular profile) was identified in 41/104 cases (39.4%) and was associated with tumors of higher histologic grade. The apocrine morphological profile was identified in 71 (68.3%) cases and was associated with high histological grade and nuclear. Follow-up was possible in 55 cases and a trend for shorter disease-free survival was observed in AKT-positive and AR-negative tumors. **CONCLUSIONS:** Our results confirmed that HER-2-positive breast cancers are heterogeneous and indicate that differences in at least two cellular

signaling pathways – PI3K/AKT and androgen pathway – might underly such a heterogeneity.

**Descriptors:** 1. Breast neoplasms 2. Receptor, epidermal growth factor 3. PTEN phosphohydrolase 4. Oncogene protein v-akt 5. Androgen receptor 6. Molecular aprocrine carcinoma 7. Immunohistochemistry

## 1. INTRODUÇÃO

O diagnóstico de câncer de mama gera inúmeras mudanças na vida de uma mulher. Alterações da imagem corporal, mudanças no âmbito profissional, interferência nos relacionamentos afetivo-conjugais e a insegurança sobre “o que virá” fazem desta uma das doenças mais temidas entre as mulheres.

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define o carcinoma da mama como neoplasia epitelial maligna que se caracteriza pela invasão dos tecidos adjacentes e pela tendência a enviar metástases a sítios distantes. A maioria destes tumores são adenocarcinomas derivados da unidade ducto lobular terminal (UDLT) da mama e estima-se que 90-95% dos carcinomas são esporádicos (não familiares) e 5-10%, hereditários<sup>[1]</sup>.

Os tumores da mama apresentam uma grande variedade de tipos histológicos, cada um apresentando características clínicas e de prognóstico particulares. O tipo histológico mais comumente identificado é o ductal invasor, representando cerca de 70% dos casos e o segundo tipo mais comum é o lobular invasor, que apresenta tendência a multicentricidade e bilateralidade. Além desses, há também os tipos histológicos medular, mucinoso, tubular, cribriforme, papilífero, micropapilar, apócrino, metaplásico, entre outros ainda menos frequentes<sup>[1]</sup>.

Assim como em outras partes do mundo, nos Estados Unidos o câncer é um dos principais problemas de saúde pública. Atualmente, uma em cada quatro mortes entre os americanos de ambos os sexos se deve ao câncer. Entre as mulheres, os três tipos de câncer mais comumente diagnosticados no ano de 2012 foram mama, pulmão e colorretal, em ordem decrescente de incidência (exceção deve ser feita aos tumores de pele do tipo não melanoma)<sup>[2]</sup>.

Encabeçando o primeiro lugar da lista das neoplasias malignas mais incidentes entre as mulheres norte americanas, o câncer de mama responde por 29% das estimativas de casos novos, o que representa, em números absolutos aproximadamente 227.000 casos, tendo sido considerado o segundo tumor mais fatal nesta população (estimativa de 39.510 mortes em 2012), perdendo apenas para o câncer de pulmão<sup>[2]</sup>.

No Brasil, a estimativa da incidência do câncer de mama, feita pelo Instituto Nacional do Câncer para o ano 2012 é de aproximadamente 53.000 casos novos. Na região Sudeste, o câncer de mama é a neoplasia maligna mais incidente da população feminina (68 casos novos por 100 mil). Quando excluídos os tumores de pele não melanoma, este tipo de câncer também é o mais freqüente das regiões Sul (64/100mil), Centro-Oeste (47/100mil) e Nordeste (31/100mil). Na região Norte, é o segundo tumor mais incidente (19/100mil)<sup>[3]</sup>.

Sem dúvidas, esta é uma doença disseminada ao redor do mundo e que tem afetado milhares de mulheres anualmente. Sua etiologia é

multifatorial e uma série de fatores aumenta o risco do seu surgimento. Por exemplo, o antecedente de um e principalmente dois parentes de primeiro grau com diagnóstico de câncer de mama confere risco elevado de desenvolvimento da doença <sup>[4]</sup>.

Além do fator genético, estão os fatores ligados ao estilo de vida e padrão sócio-econômico. O câncer de mama é mais incidente em países cujo estilo de vida é ocidentalizado<sup>[1, 5]</sup> e foi observado um incremento na sua incidência quando o nível de vida de um país começa a atingir padrões socioeconômicos de países industrializados<sup>[5]</sup>. Finalmente, o avanço na idade da primeira gravidez e a redução do número de gestações contribuem para o aumento do risco de desenvolvimento desta neoplasia.

Dentre os fatores prognósticos e preditivos clássicos que norteiam a evolução desta doença, assim como sua terapêutica, estão a idade da paciente, o estado menstrual, o estado linfonodal, o tamanho tumoral, grau histológico e nuclear, os receptores de estrogênio e progesterona, a atividade proliferativa, e a amplificação do oncogene *HER-2* e conseqüente superexpressão da sua proteína homônima<sup>[6]</sup>.

A amplificação do gene *HER-2* e a superexpressão da sua proteína ocorrem em 15-30%<sup>[7-9]</sup> dos tumores invasivos de mama humanos e o resultado está associado a um curso clínico mais agressivo, com piores índices de sobrevida livre de doença e sobrevida global, além de pior resposta a terapia hormonal e a certos tipos de quimioterápicos<sup>[8]</sup>.

A introdução das terapias alvo anti HER-2 especificamente o trastuzumabe, representou um enorme avanço na terapêutica do câncer de mama. Trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao HER-2 e provoca inibição na proliferação e no crescimento celular. Estudos multicêntricos e randomizados demonstraram que seu uso esteve fortemente associado a maior sobrevida global e tempo livre de doença<sup>[10-12]</sup> nas pacientes cujos tumores apresentaram altos níveis de expressão da proteína HER-2 ou amplificação do gene *HER-2*.

Porém, como muitas terapias contra o câncer, nem todas as mulheres cujos tumores superexpressam HER-2 responderão ao trastuzumabe. Os índices de resposta a monoterapia variam de 12-30%<sup>[13]</sup> e pacientes inicialmente respondedoras, podem desenvolver resistência após um ano de tratamento<sup>[14, 15]</sup>. Dessa forma, a precisa indicação da terapia anti HER-2 é de grande importância no contexto atual do tratamento do câncer de mama, não apenas pelo importante impacto no prognóstico da doença, mas também pelo custo elevado que este tratamento representa.

Os mecanismos de resistência ao trastuzumabe ainda não estão suficientemente compreendidos. Alguns fatores relacionados a isso são, por exemplo, o bloqueio da ligação do anticorpo ao HER-2, a persistência da ativação da via da AKT e a ativação de vias alternativas<sup>[14-16]</sup>.

A ativação da AKT começa com a fosforilação do PIP2 (fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato) a PIP3 (fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato) através da PI3K (fosfatidil-inositol-3-quinase). A reação oposta, isto é, a desfosforilação,

regula negativamente a via e está relacionada à ação do PTEN, importante produto de gene supressor e que está ativado nos casos de resposta ao trastuzumabe. Fujita et al<sup>[13]</sup>, observaram que a via de sinalização PI3K/AKT esteve altamente ativa nas células que apresentaram resistência à droga, e que, nestes casos, os níveis de PTEN avaliados por imunohistoquímica eram baixos.

Também na tentativa de uma melhor compreensão do comportamento biológico do câncer de mama e em especial das neoplasias que superexpressam HER-2, pesquisadores demonstraram, através do uso de técnicas de microarranjos de DNA, que há um subgrupo de tumores de mama que compartilha genes com o grupo genético HER-2 e que apresenta aumento da via de sinalização androgênica e freqüente morfologia apócrina<sup>[17-19]</sup>. Este subgrupo tumoral se caracteriza por apresentar forte expressão do receptor de androgênio (RA), ausência da expressão do receptor de estrogênio (RE) e aumento da expressão de HER-2 e são chamados “carcinomas apócrinos moleculares”. Foi observado que a morfologia apócrina é muito freqüente entre os tumores positivos para HER-2 e está associada a piores índices de sobrevida que pode ser explicado, em parte, pela perda da expressão do receptor de estrogênio em associação com a superexpressão de HER-2<sup>[17-19]</sup>.

Dessa forma, a positividade do receptor de androgênio em tumores com características morfológicas apócrinas poderia se constituir em potencial alvo terapêutico no controle do câncer de mama, em especial

aqueles que superexpressam HER-2. Apesar de os estudos estarem em fase bastante inicial e os mecanismos moleculares que envolvem a ação desses receptores sejam em grande parte ainda desconhecidos, os receptores de androgênio têm, até o momento, apresentado importante impacto quanto ao prognóstico do câncer de mama<sup>[20-22]</sup>.

O quadro acima descrito ilustra a heterogeneidade biológica dos carcinomas de mama superexpressores de HER-2 e a escassez de informações quanto a ativação e repressão das vias de sinalização implicadas com o prognóstico desfavorável deste grupo de tumores.

Neste estudo nos propomos investigar amostras de carcinomas de mama positivos para HER-2 com o objetivo de avaliar a frequência da expressão imunoistoquímica do receptor de androgênio, PTEN e AKT fosforilada e realizar associações destes marcadores com a idade das pacientes e determinados aspectos morfológicos tumorais, tais como características apócrinas, grau histológico e nuclear, receptores hormonais, atividade proliferativa, presença de componente "in situ", embolização vascular peritumoral, necrose tumoral, sobrevida livre de doença e sobrevida global.



## 2. OBJETIVOS

Estudar em carcinomas de mama positivos para HER-2:

1. A frequência da expressão imunohistoquímica de PTEN, AKT fosforilada e receptor de androgênio;

2. A associação destes marcadores com a idade das pacientes, características morfológicas apócrinas, presença de componente “in situ”, grau histológico e nuclear, receptores hormonais, atividade proliferativa, embolização vascular peritumoral, necrose tumoral, sobrevida livre de doença e sobrevida geral;

3. Frequência e associação do perfil morfológico apócrino com a idade das pacientes, presença de componente “in situ”, grau histológico e nuclear, receptores hormonais, atividade proliferativa, embolização vascular peritumoral, necrose tumoral, sobrevida livre de doença e sobrevida geral.

4. Determinar a combinação de fatores associados a maior atividade proliferativa neoplásica.

### 3. REVISAO DE LITERATURA

#### 3.1 O câncer de mama

Durante muitos anos, a mastectomia foi o tratamento padrão contra o câncer de mama e atualmente, apesar das melhorias do rastreamento pela mamografia que possibilitam o diagnóstico precoce com intervenções mais conservadoras, muitos diagnósticos ainda são feitos tardiamente. Conseqüentemente, muitas pacientes ainda sofrem a perda de uma ou ambas as mamas, passando a conviver com sensações de mutilação, alteração da imagem corporal, perda da feminilidade, desinteresse sexual, ansiedade, vergonha, etc<sup>[23]</sup>.

A alta prevalência da doença e as conseqüências na qualidade de vida e mortalidade incentivaram a busca pelo diagnóstico precoce, com particular desenvolvimento dos métodos de imagem e de técnicas minimamente invasivas para diagnóstico de alterações precoces na mama.

Com o diagnóstico de lesões iniciais abriu-se espaço para os métodos de tratamento cirúrgico conservador, iniciando com a quadrantectomia proposta por Veronesi, passando para a linfadenectomia seletiva com o linfonodo sentinela, até as ressecções segmentares seguidas da radioterapia intra-operatória<sup>[24]</sup>. Mais recentemente vem questionando-se o esvaziamento axilar complementar frente a linfonodo sentinela positivo<sup>[25]</sup>.

Grande interesse pela melhor compreensão desta doença se despertou na comunidade médico-científica ao observar que, apesar de os tumores apresentarem idêntico estadiamento clínico e características anatomopatológicas semelhantes, não poucas vezes apresentavam evoluções distintas<sup>[26]</sup>. Tais diferenças de comportamento clínico dão crédito à idéia de que o câncer de mama é uma doença heterogênea e, nas últimas décadas, através do avanço das técnicas de biologia molecular confirmou-se que a heterogeneidade clínica e biológica da doença se explica, pelo menos em parte, por diferenças intrínsecas na composição genética dos tumores primários<sup>[27]</sup>.

A partir do ano 2000, a avaliação da composição genética dos tumores com a técnica de microarranjos de DNA apresenta seus primeiros resultados<sup>[28, 29]</sup>. Esta técnica permite a avaliação simultânea da expressão de centenas ou milhares de genes num único experimento o que fornece a idéia do funcionamento do genoma do tumor estudado. Fazendo uso desta técnica, Perou et al.<sup>[29]</sup> e Sorlie et al.<sup>[28]</sup> pioneiramente classificaram os tumores de mama em cinco classes genéticas e prognósticas: luminal A, luminal B, basal-símile, mama normal e HER-2. Estes padrões genéticos puderam, logo a seguir, ser identificados através de marcadores imunoistoquímicos<sup>[30-33]</sup>.

O grupo de tumores luminais se caracteriza pela expressão de genes relacionados ao receptor de estrogênio e de outras moléculas envolvidas com a função do receptor e maior diferenciação celular.<sup>[34]</sup> Este grupo de

tumores é o mais freqüentemente encontrado, representando cerca de 67% de todos os carcinomas de mama e comporta pelo menos dois subgrupos: A e B<sup>[27, 35]</sup>. Os tumores luminais A, além de apresentarem alta expressão de receptor de estrogênio, expressam genes que são ativados pela ligação hormonal, tais como o gene *BCL-2*, que regula negativamente a apoptose, e o fator de transcrição *GATA-3*.<sup>[34]</sup> São tumores geralmente bem diferenciados, de baixo grau histológico e com boa resposta aos antiestrogênios<sup>[27]</sup>. Já os tumores luminais B, também denominados altamente proliferativos, apresentam menor conteúdo de receptores hormonais e expressam genes ligados à proliferação celular, além de poderem apresentar a superexpressão de *HER-2*. São tumores histologicamente menos diferenciados e com menor resposta aos antiestrogênios, quando comparados aos luminais A<sup>[27]</sup>.

O grupo de tumores classificados como basal-símile se caracteriza pela presença de células que expressam genes e marcadores das células tronco e células progenitoras bipotentes (precursoras das epiteliais e mioepiteliais) ou progenitoras mioepiteliais da mama normal<sup>[27, 36]</sup>. Caracteristicamente, não expressam receptores hormonais (estrogênio e progesterona) e não apresentam amplificação do oncogene *HER-2*. Por este motivo, são identificados ao exame imunoistoquímico como tumores “triplo-negativos”. Vale destacar que tumores triplo-negativos não são sinônimos dos carcinomas do tipo basal símile, mas correspondem a um grupo muito heterogêneo e que inclui neoplasia com padrões de célula tronco, atualmente classificados como grupo claudina-baixo, carcinomas com

diferenciação basal e/ou mioepitelial<sup>[37]</sup>. Embora não se observe consenso na categorização destes tumores, marcadores comumente utilizados são os marcadores de células basais/mioepiteliais tais como citoqueratinas 5,6,14 e 17, EGFR, P-caderina e p63<sup>[17, 38]</sup>.

Os tumores classificados como mama normal são os que mais carecem de definição precisa. Este grupo foi inicialmente caracterizado pela alta expressão de genes das células epiteliais basais e células adiposas e baixa expressão de genes das células epiteliais luminais. São freqüentemente triplo-negativos e atualmente seu valor prognóstico e até mesmo sua existência têm sido questionados..<sup>[29], [39], [40]</sup>. Uma das possibilidades para a caracterização deste subgrupo é sua origem a partir de células progenitoras bipotenciais, não correspondentes a células tronco, com expressão da queratina 6a (*K6a*), com capacidade de gerar linhagens basal e luminal<sup>[41]</sup>.

Finalmente, o grupo HER-2 é caracterizado pela superexpressão de genes do *locus* do ERBB2 no 17q11.2 – q12 incluindo *ERBB2* e *GRB7* <sup>[28]</sup>, e correspondem a grupo de alta agressividade<sup>[28]</sup>. A superexpressão do gene *HER-2* é observada tanto em um subgrupo dos carcinomas de tipo genético luminal, como no grupo dos carcinomas HER-2. Os carcinomas mamários com co-expressão de HER-2 e receptor de estrogênio são distintos do ponto de vista de composição gênica e também do ponto de vista biológico, daqueles tumores em que há amplificação do *HER-2* sem atividade do receptor de estrogênio<sup>[28, 29, 42, 43]</sup>.

Os carcinomas com amplificação de *HER-2* foram alvo de estudo para verificação de expressão gênica através da técnica de microarranjos de oligonucleotídeos em estudo desenvolvido por Staaf et al.<sup>[44]</sup> Neste estudo os autores avaliaram 58 casos de carcinomas mamários e puderam identificar três subgrupos de carcinomas *HER-2*-positivos, diferentes quanto ao comportamento biológico. Os autores puderam identificar 158 genes diferencialmente expressos e que foram utilizados para construção de um preditor prognóstico que divide estes carcinomas em dois subgrupos e que é independente da expressão de receptores esteróides<sup>[44]</sup>.

Ainda na mesma linha que mostra que o grupo genético *HER-2* não é homogêneo, Farmer et al., utilizando técnicas de microarranjos de DNA, identificaram um subgrupo de tumores de mama que compartilha genes com o grupo genético *HER-2* e que apresenta aumento da via de sinalização androgênica e frequente morfologia apócrina. Estes tumores apresentam forte expressão de receptores de androgênio (RA), ausência da expressão de receptor de estrogênio (RE) e aumento da expressão de *HER-2*. Este subgrupo foi denominado “carcinomas apócrinos moleculares<sup>[19]</sup>. De fato, a morfologia apócrina é muito frequente entre os carcinomas *HER-2* positivos<sup>[17]</sup>.

As glândulas apócrinas são glândulas sudoríparas dependentes de androgênio encontradas principalmente na região da axila e do períneo, e diferenciação apócrina pode ser encontrada em patologias benignas e

malignas da mama, tais como as hiperplasias apócrinas e o carcinoma apócrino.<sup>[19, 20]</sup>

O carcinoma apócrino da mama representa cerca de 0,5 – 3% de todos os tumores da mama e histologicamente se caracteriza por apresentar abundante citoplasma granular eosinofílico, vacuolização citoplasmática e núcleo vesicular arredondado com nucléolo freqüentemente eosinofílico.<sup>[1]</sup> Seu comportamento clínico se assemelha ao carcinoma ductal invasivo SOE e embora sendo um tipo histológico raro, células tumorais com características apócrinas são encontradas em mais de 63% dos tumores mamários e se relacionam com piores índices de sobrevida.<sup>[17]</sup> Tal fato poderia ser explicado pela perda de expressão do receptor de estrogênio associado a superexpressão de HER-2, já que estudos demonstraram que a presença e o grau de diferenciação apócrina foi inversamente proporcional à expressão de RE nas células tumorais<sup>[17]</sup>.

Esses dados sugerem que o perfil molecular apócrino não identifica apenas pacientes com carcinomas apócrinos clássicos, mas que, em menor ou maior grau essas características podem ser vistas em todos os tipos histológicos tumorais.<sup>[19]</sup>

### 3.2. A família HER

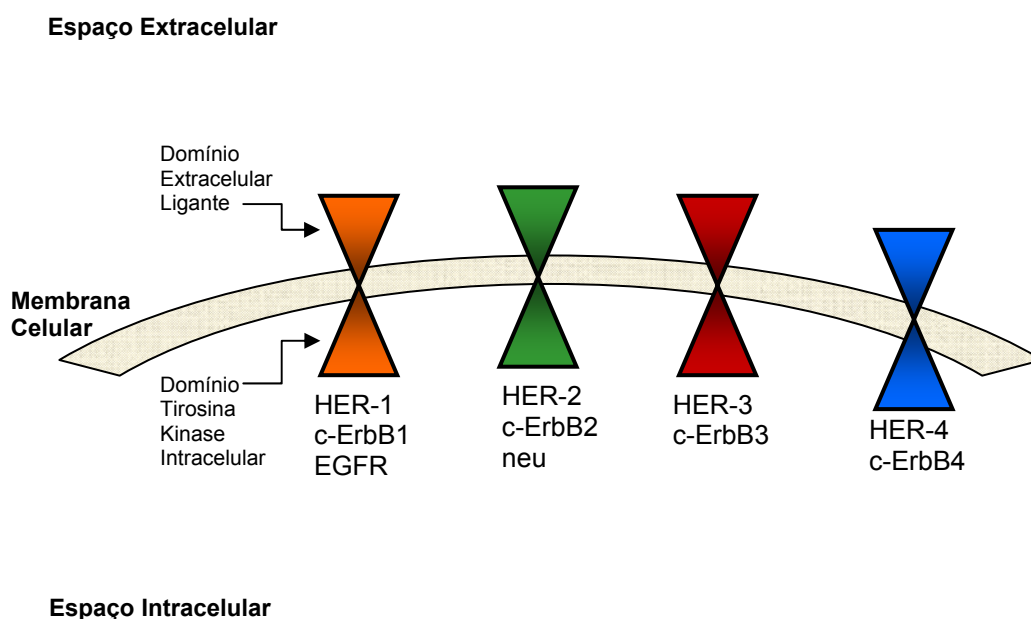
As células epiteliais da mama estão sob influência de uma gama de hormônios e fatores de crescimento. Os receptores de fatores de crescimento com atividade tirosino-quinase estão entre os mais estudados e têm sido subclassificados em diferentes famílias baseado na estrutura de seus domínios extracelular ligante e quinase intracelular e a natureza de seus ligantes ativos. Neste grupo está a família dos receptores de fatores de crescimento epidermal humano (ErbB), composta por quatro receptores envolvidos em vias de sinalização celular que regulam a atividade proliferativa: EGFR ou HER-1 (c-Erb-b1), HER-2/neu (c-Erb-b2), HER-3 (c-Erb-b3) e HER-4 (c-Erb-b4). Essas moléculas compreendem o tipo I de 20 famílias de receptores tirosino-quinases (RTKs).<sup>[16]</sup> Todo o grupo de 20 famílias de RTKs compartilha uma estrutura arquitetural semelhante que consiste basicamente de:

- 1) Porção extracelular: recebe os sinais extracelulares e possui um domínio ligante onde ocorre a união com o fator de crescimento. Uma vez feita a união do receptor com o fator de crescimento, alterações da estrutura molecular do receptor permitem a formação de dímeros com um receptor do mesmo tipo ou de outro da mesma família. HER-2 é o único membro desta família que não possui ligante conhecido, embora possa sofrer homodimerização independente do ligante em situações de superexpressão, como ocorre em alguns carcinomas de mama.



2) Porção transmembrana: une as porções extra e intracelulares e leva a informação recebida para dentro da célula;

3) Porção intracelular: compreende o domínio tirosino-quinase e uma cauda (porção C-terminal), que adiciona uma molécula fosfato à molécula tirosina, e tem a capacidade de iniciar uma cascata de eventos celulares através de fosforilações sucessivas (figura1).



**Figura 1** - Família dos receptores de fatores de crescimento epidérmico humano (ErbB)

### 3.3. HER-2

HER-2 é uma glicoproteína de 185kd, codificada pelo gene *Erb-b2* que se localiza no cromossomo 17q-21<sup>[45, 46]</sup>. Este gene está amplificado em aproximadamente 15-30% dos tumores invasivos de mama<sup>[7-9]</sup>. O aumento do número de cópias deste gene leva à expressão aumentada na membrana celular da proteína HER-2 e à liberação de oligopeptídeos na corrente sanguínea, decorrente da quebra da porção extracelular da molécula. Portanto, a amplificação do gene pode ser avaliada por testes de identificação e quantificação do gene, ou por quantificação dos transcritos, ou pela expressão da proteína na membrana e, eventualmente, pela presença de resíduos moleculares no sangue.

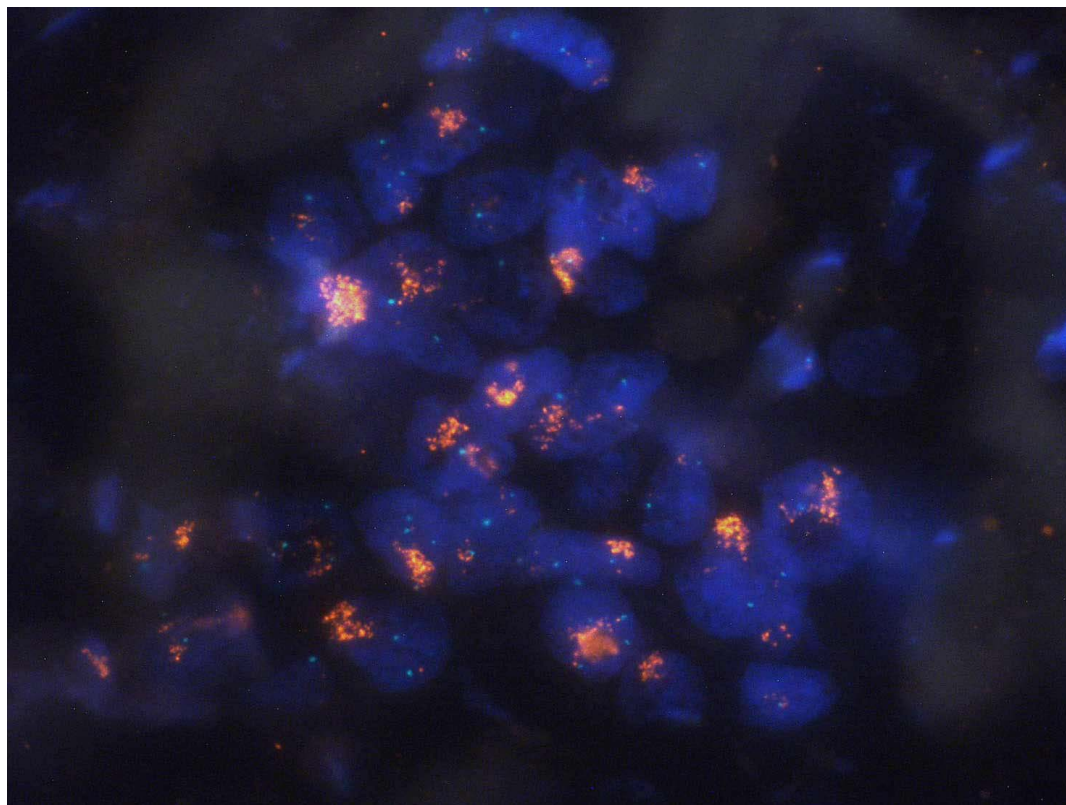
A célula neoplásica que apresenta maior expressão de HER-2 apresenta também maior taxa de proliferação celular e resistência a certos quimioterápicos (por ex.: ciclofosfamida, metrotexato e 5-fluoracil) e hormônios (tamoxifeno), porém com sensibilidade maior aos antracíclicos. Também foi observado que tecidos tumorais com expressão aumentada do HER-2 apresentam uma menor frequência de positividade para receptores hormonais (estrogênio e progesterona), ou os expressam em níveis significativamente menores<sup>[46, 47]</sup>. Além disso, os estudos direcionados para a avaliação do valor prognóstico do HER-2, correlacionaram a amplificação do gene a pior sobrevida livre de doença e sobrevida global, principalmente no subgrupo de pacientes com linfonodos axilares positivos<sup>[46, 47]</sup>.

Vários são os métodos disponíveis para detecção do *status* do HER-2, entre os quais recomenda-se a pesquisa de amplificação do gene e expressão imunoistoquímica da proteína.

A detecção da amplificação gênica é feita por técnicas de hibridização “in situ”, entre as quais, com marcação dos genes de interesse por fluorescência (FISH) ou com substância cromógena (CISH) ou pela prata (SISH)<sup>[46]</sup>. O objetivo da técnica de FISH é quantificar cópias do oncogene HER-2 para avaliar se há ou não amplificação. Uma das grandes vantagens do método é sua especificidade em detectar a amplificação, porém, apresenta limitações tais como o custo elevado, a necessidade de conhecimentos específicos do patologista que avalia o teste, a necessidade de microscópio de fluorescência específico, cuidadoso controle de qualidade

no laboratório e na interpretação do teste, e boas condições do tecido neoplásico.

FISH para HER-2 é determinado comparando-se o número de sinais fluorescentes provenientes do gene HER-2 ao número total de sinais provenientes de cópias do cromossomo 17, em cada célula. Após contar pelo menos 20 células em duas áreas diferentes do tumor, a razão do sinal de HER-2 para o sinal do cromossomo 17 é calculada. Tumores sem amplificação do gene apresentam razão até 1,88. Tumores com amplificação entre 1,88 e 2,2 são duvidosos quanto à amplificação e com razão acima de 2,2 são considerados positivos (figura 2)<sup>[48]</sup>.



**Figura 2** – Carcinoma mamário com amplificação do HER-2 através da técnica de hibridização “in situ” com fluorescência. Sinais em vermelho correspondem ao HER-2 e os sinais em verde ao centrômero do cromossomo 17

A avaliação da superexpressão da proteína de membrana pode ser feita através de técnicas de imunohistoquímica (IHQ), a qual faz uma avaliação baseada na intensidade de coloração da membrana. Tal método apresenta a vantagem do baixo custo, porém, apresenta algumas limitações, relacionadas principalmente à falta de consenso na interpretação dos resultados e à discrepância de resultados de acordo com o uso de diferentes métodos imunohistoquímicos e diferentes reagentes.

Há uma variedade de anticorpos disponíveis comercialmente que são capazes de se unir à porção intra ou extracelular da molécula de HER-2 e

assim determinar a expressão ou não desta proteína<sup>[45]</sup>. Entre eles, podemos citar o anticorpo policlonal de coelho utilizado no Herceptest e o anticorpo monoclonal CB11 (Novocastra Laboratories Ltd, Newcastle upon Tyne, UK), os quais são capazes de reconhecer o domínio intracelular da proteína HER-2. Além desses, há o anticorpo monoclonal de coelho SP3 (Labvision Corporation-NeoMarkers, Fremont, Califórnia, USA), que reconhece a porção extracelular da proteína.

A despeito das vantagens da IHQ, resultados extremamente variáveis são encontrados na literatura<sup>[45]</sup>. Em estudo realizado por Wludarski et al., sobre a concordância nos resultados de testes de HER-2 determinados por IHQ em 500 carcinomas invasivos de mama entre um laboratório de referência e laboratórios locais de todas as regiões geográficas do Brasil, os resultados mostraram baixa concordância geral (171/500 casos, 34,2%) em relação aos resultados dos testes de HER-2 entre laboratórios locais e o laboratório de referência, o que poderia estar relacionado, entre outras coisas, a questões técnicas relacionadas a IHQ nos laboratórios locais<sup>[49]</sup>.

Recentemente, a Sociedade Americana de Oncologistas Clínicos (ASCO) e o Colégio de Patologistas Americanos (CAP) normatizaram critérios de qualidade e interpretação para o teste<sup>[48]</sup>.

O resultado é apresentado em escores 0,1+, 2+ e 3+, onde o resultado 3+ corresponde ao teste positivo e é caracterizado por imunocoloração intensa em toda a circunferência da membrana em mais de 30% das células neoplásicas. Os casos duvidosos (2+) correspondem

àqueles com menos de 30% de células com coloração intensa e completa na membrana e os casos com mais de 10% de células com coloração fraca a moderada, para os quais se recomenda o estudo da amplificação do gene por FISH. Casos negativos incluem escores 0 e 1+, com colorações ausente ou presente em menos de 10% das células (0), e casos com coloração fraca e incompleta em mais de 10% (1+)<sup>[48, 50]</sup>.

A determinação correta da positividade do HER-2 é de grande importância no contexto atual do tratamento do câncer de mama, pois tal característica tem implicações prognósticas (já citadas anteriormente) e também preditivas para o tratamento desta patologia, já que as pacientes cujos tumores superexpressam HER-2, são fortes candidatas ao tratamento com o anticorpo monoclonal trastuzumabe.

Este anticorpo é considerado por alguns autores como medicação de alto custo<sup>[51]</sup>, porém, este conceito tem sido questionado. Estudos de farmacoeconomia têm demonstrado que o custo atual desta droga pode ser comparado ao de quimioterápicos habitualmente utilizados para o tratamento do câncer de mama, além de ter sido demonstrado uma adequada relação custo-efetividade com a adição do trastuzumabe ao tratamento das pacientes portadoras de câncer de mama positivos para HER-2<sup>[52],[53]</sup>. Ainda assim, a precisa indicação desta droga deve ser considerada, visto que seu uso está associado a alguns efeitos adversos, entre os quais, a cardiotoxicidade, que pode inclusive chegar a ser fator limitante para a continuidade do tratamento<sup>[54], [55]</sup>.

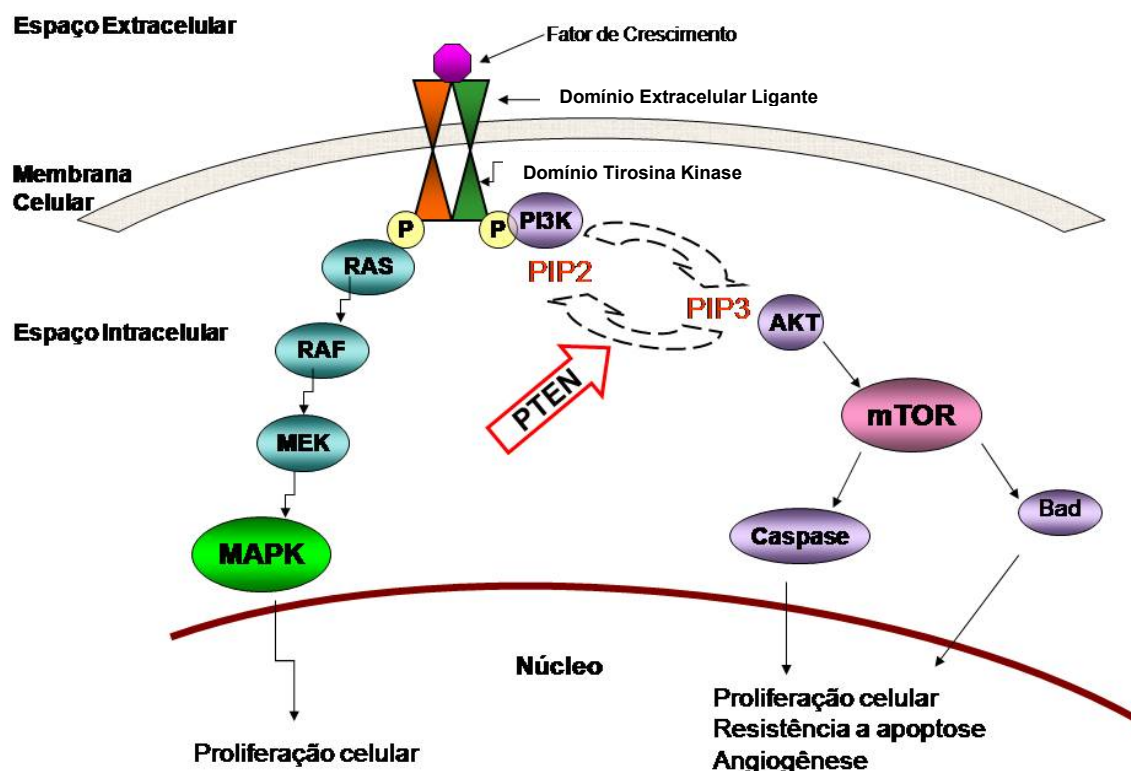
### 3.4. Vias de sinalização

Os receptores da família HER exercem sua função através de ligação com fator de crescimento e formação de dímeros com um receptor do mesmo tipo (homodímero) ou de outro da mesma família (heterodímero). Os ligantes ou fatores de crescimento são conhecidos para HER-1, HER-3 e HER-4<sup>[16]</sup>. Homodímeros de HER-3 não tem atividade tirosina quinase, embora o HER-3 exerça esta atividade na forma de heterodímero. O HER-2 não tem ligante conhecido, porém, pode sofrer homodimerização independente do ligante em situações de superexpressão, como a que ocorre em alguns carcinomas de mama<sup>[14, 16, 56]</sup>.

O resultado da dimerização é a fosforilação dos resíduos de tirosina das tirosina-quinases das subunidades do receptor dimerizado e depois das proteínas sinalizadoras intracelulares ativadas por estes receptores. Dessa maneira, desencadeiam-se os múltiplos processos celulares relacionados principalmente ao controle da proliferação, estímulo da angiogênese e regulação da apoptose. Sua ação envolve pelo menos duas importantes vias de sinalização intracelular: a via da MAPK (*mitogen-activated protein kinase* ou proteína quinase ativada por mitógenos) que envolve a cascata de fosforilação do produto de proto-oncogene RAS seguido do RAF e ativação da quinase MEK, culminando com a proliferação celular, e a via de AKT/PKB (proteína quinase B) que através da proteína mTOR (*mammalian target of*



*rapamycin*), está implicada na inibição da apoptose, aumento da proliferação celular e estímulo da angiogênese (figura 3) <sup>[14]</sup>.



**Figura 3** - Vias de sinalização MAPK e AKT

A ativação da via PI3K pode ocorrer em resposta a uma variedade de sinais extracelulares, seja através do receptor de fator de crescimento ou do receptor de integrina. Essa ativação do receptor ocorre através da subunidade p85 da PI3K, via seu domínio SH2 para resíduos de fosfotirosina localizados dentro do receptor. Uma vez recrutada para a membrana celular, a subunidade catalítica p110 da PI3K fosforila fosfatidil-inositol 4,5 bifosfato

(PIP2) gerando fosfatidil-inositol 3,4,5 trifosfato (PIP3)<sup>[57]</sup>. Uma vez feita a fosforilação de PIP2 para PIP3, AKT é recrutada e medeia várias funções celulares implicadas na sobrevivência celular, tendo como substratos a mTOR, molécula importante no crescimento celular, algumas proteínas envolvidas com a inibição da proliferação, como p21 e p27, e várias moléculas envolvidas com a inibição da apoptose, como as caspases e Bad<sup>[57]</sup> (figura 3).

A atividade do PI3K sofre oposição do PTEN (phosphatase and tensin homolog), importante produto de gene supressor, que remove uma molécula de fosfato do PIP3, regenerando PIP2 e atenuando os efeitos da cascata de sinalização do PI3K ativado<sup>[57]</sup>. Dessa forma, a regulação negativa da via do PI3K pelo PTEN é essencial para a manutenção do delicado balanço que controla o crescimento celular e a perda da função deste supressor tumoral proporciona um ambiente favorável a tumorigênese<sup>[13, 58, 59]</sup>.

### **3.5. Terapia alvo**

Os primeiros relatos do uso de terapia alvo para o tratamento do câncer de mama datam de 1896, quando o cirurgião George T. Beatson lançou mão da ooforectomia como parte do tratamento de uma paciente acometida pela doença na pré-menopausa e observou melhora da resposta em relação aos tratamentos já estabelecidos na época.<sup>[60]</sup>

Entende-se por terapia alvo o conjunto de drogas capazes de interferir no crescimento de células tumorais através do bloqueio de moléculas implicadas com a carcinogênese e o crescimento tumoral. O conhecimento das vias de sinalização nas neoplasias mamárias que superexpressam HER-2 permitiu o desenvolvimento de diferentes classes de drogas, entre as quais os anticorpos monoclonais, os inibidores da tirosina quinase e os antagonistas da mTOR.

O trastuzumabe é um anticorpo monoclonal humanizado que se liga ao domínio extracelular do HER-2 inibindo a transdução de sinal, o que provoca uma inibição na proliferação e no crescimento celular e um aumento da apoptose. O efeito básico do trastuzumabe é a inibição da fosforilação da AKT pelo PI3K, mas outros mecanismos concorrem para sua ação inibitória. Um dos mecanismos é a citotoxicidade celular dependente da presença do anticorpo na célula neoplásica. Esta se torna alvo de células NK (*natural killers*)<sup>[15]</sup>. Além deste, o trastuzumabe inibe a formação de um fragmento molecular ligado à membrana e decorrente da clivagem da porção extracelular do HER-2, a p95, molécula que tem atividade tirosina quinase “in vitro”<sup>[15]</sup>. O trastuzumabe foi o primeiro agente anti - HER-2 a ser aprovado para uso na prática clínica<sup>[61]</sup> e foi avaliado inicialmente em pacientes com câncer de mama metastático com qualquer nível de expressão do HER-2<sup>[62]</sup>. Mais tarde foi demonstrada uma grande correlação entre o grau de expressão do HER e a resposta clínica observada.<sup>[63]</sup> Apenas os tumores com alta expressão apresentam resposta clínica significativa. Portanto, deve apenas ser usado em pacientes com

superexpressão do HER-2, detectada por imunohistoquímica (escore 3+), ou com amplificação gênica do HER-2 detectada por hibridização “in situ” por fluorescência (FISH)<sup>[48]</sup>, embora se admite que possa ser utilizado em casos com escore 2+<sup>[64]</sup>. O trastuzumabe revolucionou o tratamento do câncer de mama, no entanto, como muitas terapias contra o câncer, nem todas as mulheres cujos tumores superexpressam HER-2 responderão ao uso desta droga. Os índices de resposta a monoterapia com este anticorpo monoclonal variam de 12 a 30%<sup>[13]</sup>. Além disto, mesmo pacientes que respondem podem desenvolver resistência após um ano<sup>[14]</sup>. Assim, novas estratégias terapêuticas se apresentaram, tais como os anticorpos monoclonais de nova geração e os inibidores da atividade de tirosina quinase.

Pertencente à categoria de anticorpos monoclonais de nova geração, o pertuzumabe age no domínio extracelular de HER-2 impedindo a formação de dímeros entre os membros da família HER<sup>[65]</sup>. Como a região da molécula do HER-2 que se liga ao pertuzumabe é diferente daquela que se liga ao trastuzumabe, é possível que a droga possa agir nos casos de resistência a este<sup>[66]</sup>. Em estudo fase II envolvendo 66 pacientes com câncer de mama metastático resistente ao trastuzumabe, 5 (7,6%) pacientes tiveram resposta completa, 11 (16,7%) pacientes tiveram resposta parcial e 17 (25,8%) pacientes tiveram doença estável por mais de 6 meses. O benefício clínico neste estudo foi de 50%.<sup>[67]</sup> Estudo randomizado, duplo cego, placebo controlado fase III (CLEOPATRA) está em andamento para avaliar a eficácia e segurança da associação de pertuzumabe, trastuzumabe e docetaxel vs.

placebo associado a trastuzumabe e docetaxel em pacientes com câncer de mama metastático HER-2 positivo<sup>[68]</sup>.

O lapatinibe é um inibidor da tirosina quinase com capacidade para inibir a atividade dos domínios intracelulares dos receptores EGFR (ou HER-1) e HER-2 e que, em alguns casos, tem sido eficaz no tratamento de pacientes refratárias ao uso de trastuzumabe. A superexpressão de HER-2 é fator preditivo de resposta à droga<sup>[69]</sup>. Um dos estudos importantes para ilustrar a utilidade do lapatinibe foi o de Blackwell et al., onde 296 pacientes com carcinoma mamário metastático HER2-positivo, que sofreram progressão de doença com uso de trastuzumabe, foram randomizadas para uso de lapatinibe isolado ou combinado com trastuzumabe. Neste estudo o tratamento combinado se associou a maior sobrevida livre de doença e maior resposta patológica<sup>[70]</sup>.

Outro potencial alvo terapêutico é o *mammalian Target of Rapamycin* (mTOR). mTOR é uma serina-treonina quinase, pertencente à via de sinalização do PI3K/AKT e que regula a progressão do ciclo celular. A rapamicina é um antagonista específico do mTOR, estabilizando o ciclo celular em G1, induzindo a apoptose e inibindo a angiogênese<sup>[71-73]</sup>. Os principais derivados da rapamicina atualmente estudados são o everolimus (RAD001) e o temsirolimus (CCI-779). Em estudo fase II envolvendo 270 pacientes na pós-menopausa cujos tumores de mama eram positivos para receptores hormonais, o grupo que recebeu everolimus (RAD001) em associação com letrozol como terapia neoadjuvante, apresentou redução do

tamanho tumoral significativamente melhor do que no grupo que recebeu everolimus em associação com placebo (68% versus 59%,  $p = 0.0616$ )<sup>[74]</sup>. O temsirolimus (CCI-779) foi avaliado em estudo fase II, com 109 pacientes refratárias a múltiplos tratamentos quimioterápicos, tendo sido observada uma taxa de resposta parcial de 9,2% e doença estável por mais de 24 semanas em 4,6%, conferindo um benefício clínico de 13,8%<sup>[75]</sup>. Estudos de fase III já estão em andamento com estas drogas. Entre eles, o BOLERO-1<sup>1</sup>, que avalia o everolimus em combinação com trastuzumabe e paclitaxel no tratamento de câncer de mama localmente avançado ou metastático. Além deste, o BOLERO-2 avaliou a eficácia e segurança da combinação de everolimus e exemestano em pacientes com câncer de mama positivo para receptores hormonais refratários ao uso de inibidores da aromatase não esteroidais <sup>[76]</sup>.

### **3.6. Mecanismos de resistência ao trastuzumabe**

Os fatores de resistência ao trastuzumabe podem ser agrupados em três categorias: bloqueio da ligação do anticorpo ao HER2, estímulo à via de sinalização da AKT, e ativação de vias alternativas.

O primeiro deles envolve o bloqueio da ligação entre o anticorpo e o receptor através do MUC4, uma mucina de superfície celular, superexpressa

---

<sup>1</sup> <http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00876395?term=mTOR&cntry1=SA%3ABR&rank=4>. Acesso em 27/09/2012.

em carcinomas de mama e relacionada a potencialização da fosforilação da molécula de HER2<sup>[77]</sup>. O bloqueio da ligação entre o anticorpo e a molécula de HER-2 pode também ser decorrente de mutações nesta<sup>[78]</sup>.

A via PI3K/AKT tem sido a mais explorada e considerada a mais importante, talvez por ser a envolvida com o maior número de eventos relacionados à agressividade da célula neoplásica mamária: estímulo da atividade proliferativa, inibição da apoptose, diferenciação celular e angiogênese<sup>[79]</sup>.

Uma perturbação da sinalização normal do AKT freqüentemente ocorre em vários tipos de tumores humanos e esta enzima cumpre um papel importante na progressão do câncer e sobrevivência celular.

A família AKT é o mediador primário da cascata de efeitos de PI3K e regula uma variedade de processos celulares através da fosforilação de um amplo espectro de substratos da cascata. De fato, a quebra do equilíbrio da via de sinalização PI3K/AKT pode levar a uma alteração de todos os aspectos da fisiologia celular que compreende a característica do câncer<sup>[80]</sup>.

A ativação do AKT mostrou estar positivamente associada com a superexpressão do HER-2 no carcinoma de mama obtido de materiais humanos. A ativação da AKT começa com a fosforilação do PIP2 (fosfatidil inositol 3,4 bifosfato) a PIP3 (fosfatidil inositol 3,4,5 trifosfato) através da PI3K. A reação oposta, isto é, a desfosforilação, regula negativamente a via e está relacionada à ação do PTEN, importante produto de gene supressor e que está ativado nos casos de resposta ao trastuzumabe<sup>[14, 57]</sup>.

A perda da função do gene *PTEN*, localizado no cromossomo 10, foi inicialmente identificado através de sua mutação em uma variedade de tipos tumorais. A perda da função do *PTEN* por mutação, perda da heterozigose ou silenciamento epigenético foi relatada em aproximadamente 50% de todos os cânceres de mama e também em muitos outros tipos de cânceres<sup>[59]</sup>. A perda da função do *PTEN* nos casos de uso do trastuzumabe leva à persistência da ativação da função do PI3K/AKT. Fujita et al<sup>[13]</sup> observaram que a via de sinalização PI3K/AKT esteve altamente ativa nas células que apresentaram resistência à droga, e que, nestes casos, os níveis de PTEN eram baixos.

A mutação do gene *PTEN* é rara nos carcinomas de mama, no entanto, a perda da heterozigose no cromossomo 10q23 (*locus* do *PTEN*) é observada em aproximadamente 30-40% dos tumores de mama esporádicos. Considerando a expressão do *PTEN*, a redução ou ausência da expressão da proteína PTEN tem sido reconhecida em 8-50% dos casos de câncer de mama. Uma expressão reduzida da proteína PTEN mostrou estar associada à persistência da ativação do AKT<sup>[59]</sup>.

Mutações no gene que codifica o PI3K, o *PIK3CA*, foram detectadas em carcinomas de mama, independentes do estágio<sup>[81]</sup>. Embora não existam estudos que investiguem a relação entre estas mutações e resposta ao trastuzumabe, não se exclui a possibilidade de que esta quinase alterada possa explicar a resistência.



A fosforilação da AKT tem sido implicada na regulação do ciclo celular seja através de inibidores do ciclo celular, tais como p21 e p27, seja através do aumento da translação e estabilização dos níveis da proteína ciclina D1<sup>[82-84]</sup>. A sobrevivência celular é influenciada pelo AKT através de estímulo ao inibidor de apoptose Bcl2 e inibição de fatores de transcrição que normalmente ativam genes relacionados a apoptose<sup>[85-87]</sup>. Finalmente, AKT estimula o ciclo celular através da via de mTOR, uma quinase implicada na passagem de G1 para fase S do ciclo celular<sup>[88]</sup>. A ativação da via PI3K/AKT cumpre um papel crucial na iniciação e progressão do câncer de mama humano. A ativação desta via pode ocorrer em resposta a uma variedade de sinais extracelulares, abrindo outra possibilidade de resistência ao trastuzumabe que seria a de ativação de vias alternativas de fatores de crescimento com heterodimerização do HER-2 com o receptor do fator de crescimento insulínóide tipo 1 (IGF-1R).

Pelo exposto percebemos que carcinomas de mama HER-2 positivos têm parte de sua agressividade biológica dependente da ativação de várias vias de sinalização celulares relacionadas ao controle do ciclo celular, entre elas a via PI3K/AKT. Por outro lado, a julgar pelas diferenças na capacidade de resposta ao anticorpo monoclonal trastuzumabe, estes tumores devem ser heterogêneos, como de fato se apresentam do ponto de vista de sua assinatura genética e prognóstico<sup>[44]</sup>. Alterações na via PI3K são comuns no câncer e aberrações em componentes dessa via têm sido demonstradas em uma variedade de diferentes cânceres humanos<sup>[89]</sup>. O próprio PI3K é um alvo de mutações ativadas<sup>[90-92]</sup> e de fato a alteração genética mais comum

no câncer de mama é a mutação somática do gene *PIK3CA*, codificando a subunidade catalítica p110 $\alpha$ . Em um amplo estudo de amostras de câncer de mama humano realizado para avaliar mutações em *PIK3CA*, 77 de 292 (26%) tumores primários de mama e 14 de 50 (28%) linhagens celulares de câncer de mama, apresentaram mutação no gene *PIK3CA*<sup>[93]</sup>. Tais resultados foram concordantes com um estudo prévio no qual o índice de mutações foi de 22% em um grupo de 41 tumores de mama<sup>[90]</sup>. Em ambos estudos, as mutações foram encontradas agrupadas em duas regiões nos exons 9 e 20 correspondentes ao domínio helico e catalítico do p110 $\alpha$ , respectivamente.

Além da ativação da subunidade catalítica do PI3K, existe uma evidência convincente implicando a inativação mutacional da fosfatase PTEN no câncer de mama humano. De fato, a inativação do *PTEN* foi primeiramente descrita em uma doença inerente do câncer de mama conhecida como Síndrome de Cowden<sup>[94-98]</sup>. Além dessa alteração do *PTEN* no câncer de mama hereditário, existem mutações do *PTEN* descritas no câncer de mama esporádico<sup>[99-101]</sup>. Análises imunoistoquímicas do status do PTEN no câncer de mama têm revelado uma associação altamente significativa com mutação no *PIK3CA*, pelo qual mutações no *PIK3CA* foram encontradas na maior parte dos tecidos com mutação em *PTEN*.

Ao que tudo indica PTEN e PI3K são importantes para a caracterização da agressividade dos carcinomas de mama HER2-positivos e estão, de alguma maneira, implicados no mecanismo de resistência ao

trastuzumabe. Entretanto, não está claro na literatura se existem diferenças intrínsecas quanto a expressão destas moléculas no tumor ou se as alterações surgem induzidas pelo tratamento ou interação com outras substâncias ou outras vias. Poucos são os estudos que tentaram caracterizar o padrão de heterogeneidade destas neoplasias quanto a expressão imunohistoquímica de PTEN e PI3K, método inclusive questionável em alguns estudos<sup>[102]</sup>.

### **3.7. Expressão do Receptor de Androgênio (RA) nos tumores de mama e seu significado prognóstico**

A maioria dos tumores de mama é hormônio dependente. Por esta razão, as terapias antiestrogênicas como o tamoxifeno e os inibidores da aromatase se estabeleceram como importantes ferramentas terapêuticas no tratamento desses tumores<sup>[20]</sup>. Recentemente, maior atenção tem sido dada ao papel dos androgênios na biologia do câncer de mama, principalmente pelo fato de que vários estudos têm demonstrado que os androgênios poderiam exercer efeitos antiproliferativos em oposição aos efeitos proliferativos induzidos pelos estrogênios nessas células tumorais<sup>(18)</sup>.

Os receptores de estrogênio (RE), progesterona (RP) e androgênio (RA), pertencem à família dos receptores de esteróides sexuais nucleares e apresentam grande semelhança funcional e arquitetural entre si<sup>[22]</sup>. RA está

expresso em mais de 70% de todos os tumores de mama e seus índices de positividade nestes tumores são comparáveis aos valores encontrados para RE e RP<sup>[20-22]</sup>. Além disso, quase 50% dos tumores de mama RE negativos expressam RA e este chega a ser o único receptor hormonal presente em até 25% dos tumores de mama metastáticos.<sup>[21]</sup> Para Agrawal et al., uma melhor compreensão do funcionamento destes receptores poderia abrir a possibilidade de novas terapias para os tumores de mama RE negativos<sup>[21]</sup>.

O papel do RA na etiologia e progressão do câncer de mama tem sido ainda pouco compreendido e permanece como uma questão ainda não respondida. Ao mesmo tempo em que estudos demonstram que a sinalização de androgênios desempenha um papel crucial na homeostase do tecido mamário, negativamente os efeitos proliferativos da sinalização de estrogênio, há a hipótese de que os androgênios possam aumentar o risco de câncer de mama através de vários mecanismos, entre eles, sua conversão em estrona<sup>[20, 21]</sup>.

Em estudo retrospectivo realizado por Yu et al. envolvendo 327 mulheres chinesas diagnosticadas com carcinoma ductal invasivo da mama, com um tempo de seguimento de 66 meses, no qual se verificou a expressão de RA por método imunoistoquímico, 72.5% de todos os casos mostraram positividade para RA. Entre os tumores RE e RP negativos, o RA esteve presente em 53.2% dos casos. Neste estudo, a expressão do RA esteve fortemente associada com a expressão de RE e RP, mas não mostrou relação com outros importantes fatores prognósticos, tais como

idade, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal, grau histológico e *status* do HER-2. Finalmente, houve forte associação entre a expressão de RA e o tempo livre de doença, com um valor de  $p < 0.001$ <sup>[21]</sup>.

Ainda no mesmo estudo, avaliação quanto aos subtipos moleculares do câncer de mama foi realizada e Yu et al. encontraram que a expressão de RA foi mais comum nos subtipos luminal A e B (83.8% e 75.6%, respectivamente), seguidos pelos subtipos mama normal e HER-2 (72% e 55.8%, respectivamente). Para o subgrupo de tumores do tipo basal símile, foi encontrada ausência da expressão de RA em 61% dos casos enquanto apenas 39% mostrou positividade para RA, o que poderia explicar pelo menos em parte o comportamento agressivo desses tumores. Ainda neste subgrupo, as pacientes cujos tumores expressaram RA tiveram risco de recidiva significativamente menor do que os tumores que não expressaram este receptor (12.5% *versus* 44%)<sup>[21]</sup>.

Curiosamente, no grupo de tumores do tipo HER-2 molecular, o tempo livre de doença nos tumores RA negativos foi ligeiramente maior quando comparado aos tumores RA positivos<sup>[21]</sup>.

Recentemente identificados por Farmer et al.<sup>[18-20]</sup> os tumores de mama do tipo apócrino molecular, se caracterizam por expressar RA, serem negativos para RE e RP e apresentarem como principal alteração genética a amplificação de HER-2<sup>[17, 18]</sup>. Em estudo conduzido por Bhargava et al. cujo principal objetivo foi avaliar as características morfológicas e imunoistoquímicas de 205 carcinomas invasivos de mama, pertencentes à

categoria molecular HER-2, um dos principais achados foi a marcante presença de diferenciação apócrina nos tumores positivos para HER-2 e a observação de que o grau de diferenciação apócrina foi inversamente proporcional à expressão de RE no tecido tumoral<sup>[17]</sup>.

É possível que tumores de mama HER-2 positivos que expressam RA e RE apresentem um melhor prognóstico. A perda de expressão do RE resulta em fenótipo molecular apócrino e pode estar associada a características apócrinas morfológicas e maior grau de agressividade<sup>[17]</sup>. Micello et al., em estudo retrospectivo onde se realizou avaliação imunohistoquímica de 232 carcinomas ductais invasivos de mama, observaram que o RA pode estar fortemente expresso nos tumores negativos para RE e RP, caracterizando tumores de alto grau histológico, com superexpressão de HER-2<sup>[103]</sup>. Para esses autores, a observação da frequente associação da expressão de RA e HER-2 nos tumores de mama negativos para receptores de estrogênio e progesterona abre a possibilidade de investigação da via de sinalização androgênica como possível alvo no tratamento dos tumores de mama com tais características imunohistoquímicas.

## **4. MÉTODOS**

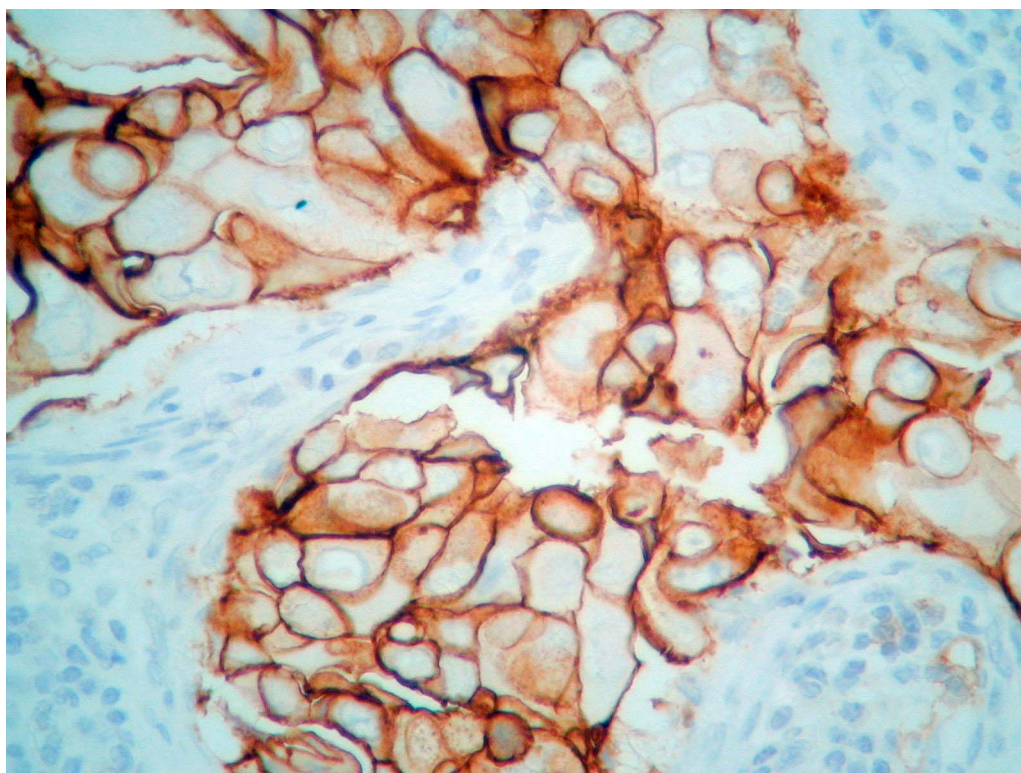
### **4.1. Aprovação institucional**

O projeto foi submetido aos Comitês de Pesquisa dos Departamentos de Patologia e de Obstetrícia e Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e, em seguida, à Comissão de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (CAPPesq) (anexo 1) .

### **4.2. Seleção dos casos**

O estudo foi retrospectivo com levantamento dos resultados anatomopatológicos realizados na Consultoria em Patologia, Botucatu (SP) no período de março de 2007 a dezembro de 2008.

Foram incluídos os casos de diagnóstico de carcinoma primário da mama classificados como positivos para HER-2 segundo critérios da ASCO/CAP<sup>[48]</sup> e que dispunham de blocos de parafina arquivados no Laboratório para o estudo (figura 4).



**Figura 4** – Carcinoma mamário com positividade forte e difusa da proteína HER2 em membrana citoplasmática, caracterizado como escore 3+ (anticorpo SP3 – aumento microscópico original 400X)

Foram excluídos os casos cujas pacientes foram submetidas a qualquer forma de tratamento medicamentoso primário (hormônio ou quimioterapia).

Com os critérios acima, foram selecionados 104 casos para o estudo. Somente 30 (28,9%) pacientes souberam informar sobre o uso de trastuzumabe. Destas, 15 referiram que usaram a droga e 15 negaram seu uso.

O seguimento foi possível em 55 (52,9%) destas pacientes e variou de 3 meses a 50 meses ( $33,1 \pm 11,04$  meses). Em 12/55 (21,8%) pacientes



houve um evento desfavorável na evolução. A lista de pacientes com eventos desfavoráveis é apresentada na tabela 1.

**Tabela 1** – Eventos desfavoráveis na evolução de 12 pacientes com carcinoma de mama HER2-positivo

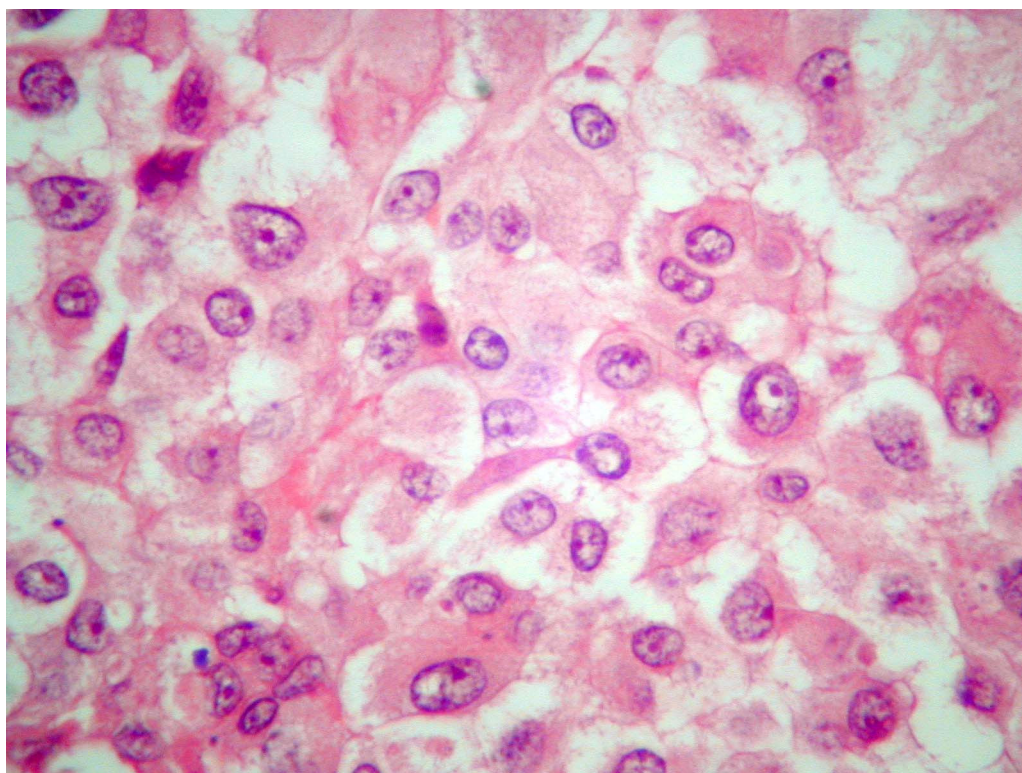
<b>Paciente</b>	<b>Tempo em meses até o primeiro evento</b>	<b>Primeiro evento</b>	<b>Tempo total de seguimento</b>	<b>Desfecho</b>
<b>1</b>	12	Recorrência em sítio desconhecido	24	Óbito
<b>2</b>	23	Metástase óssea	41	Viva com doença
<b>3</b>	12	Metástase óssea	36	Óbito
<b>4</b>	21	Metástase pulmonar	39	Viva com doença
<b>5</b>	4	Metástase óssea	30	Óbito
<b>6</b>	3	Óbito	3	Óbito
<b>7</b>	3	Óbito	3	Óbito
<b>8</b>	Não informado	Óbito	Não informado	Óbito
<b>9</b>	24	Óbito	24	Óbito
<b>10</b>	3	Óbito	3	Óbito
<b>11</b>	3	Recidiva locoregional	42	Viva sem doença
<b>12</b>	3	Recidiva locoregional	12	Óbito

### 4.3. Método anatomopatológico

Os preparados histológicos originais foram revistos para confirmação do estado do HER-2, avaliação das características anatomopatológicas dos tumores e seleção de áreas para construção de blocos de microarranjos de tecido (TMA). Todos os preparados histológicos foram revistos em conjunto com o mesmo patologista em microscópio para múltiplos observadores.

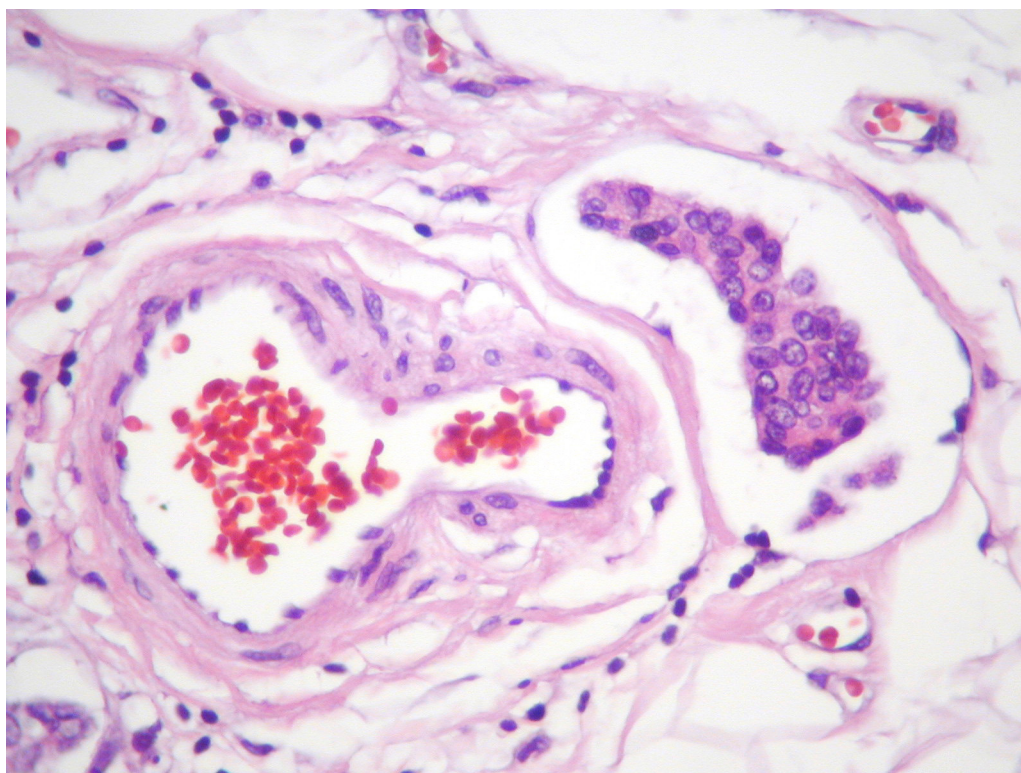
As seguintes características histológicas foram avaliadas nos cortes inteiros originais: tipo e grau histológico, características morfológicas apócrinas, componente “in situ”, embolização vascular peritumoral e necrose tumoral.

A classificação do tipo histológico seguiu os critérios da Organização Mundial da Saúde<sup>[1]</sup>. Para a graduação histológica foram aplicados os critérios de Elston e Ellis<sup>[104]</sup>. Características apócrinas foram definidas pela presença de células neoplásicas grandes, com citoplasma volumoso, intensamente eosinofílico e granuloso (figura 5).



**Figura 5** – Características morfológicas apócrinas determinadas pelo citoplasma amplo, fortemente eosinofílico e granuloso (hematoxilina-eosina – aumento microscópico original 400X)

A presença de componente “in situ” associado foi avaliada como ausente, presente em menos de 25% do volume da neoplasia, e presente em mais de 25% do volume total do tumor. A presença de embolização vascular foi avaliada no tecido mamário circunjacente ao tumor e considerada positiva quando células neoplásicas eram identificadas em espaços revestidos por células endoteliais ou em espaços duvidosos caso os mesmos se localizassem a mais de um campo microscópico de grande aumento (400X) distante da borda do tumor e associados a feixes vâsculo-neurais (figura 6).



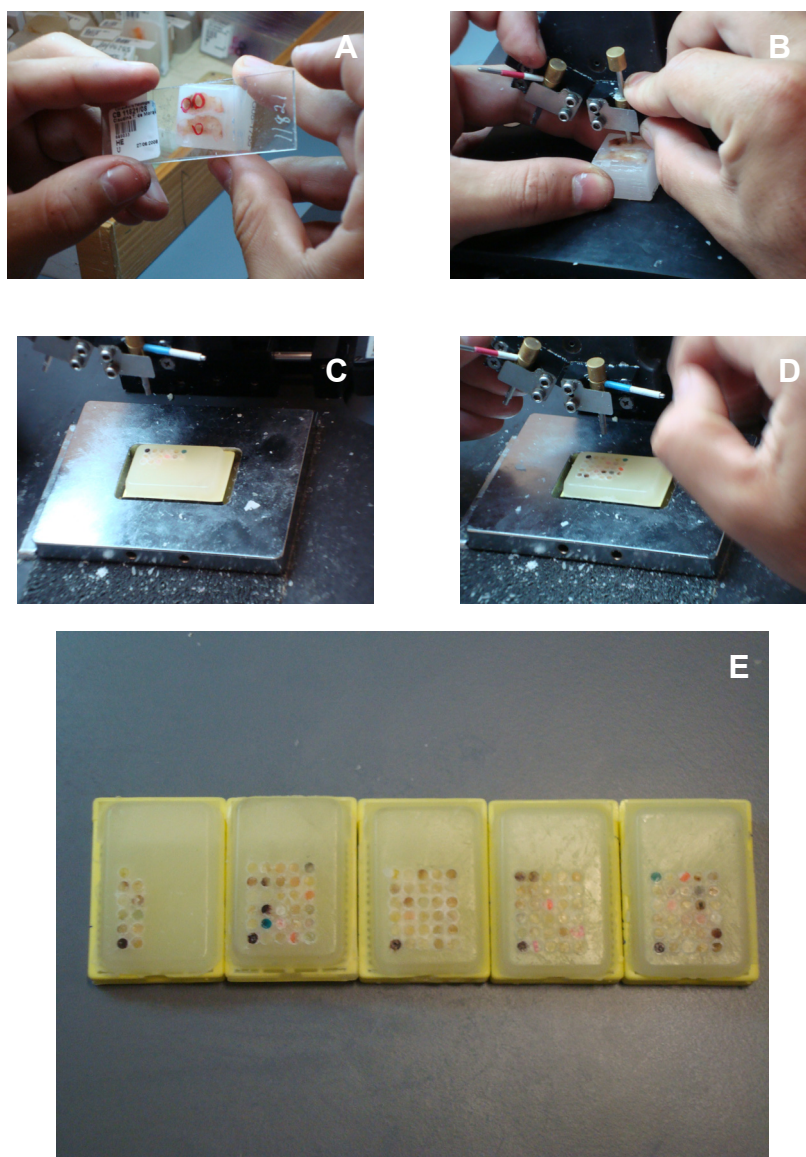
**Figura 6** – Êmbolo de células neoplásicas em linfático de eixo vascular peritumoral (hematoxilina-eosina – aumento microscópico original 400X)

Em cada tumor foi selecionada uma área representativa, com sinais de boa preservação do tecido caracterizados por boa coloração e ausência de artefatos técnicos. Esta foi a área marcada para construção de bloco pela técnica de arranjo em matriz de amostras teciduais, também denominada de microarranjos de tecido (TMA), e estudo imunoistoquímico.

#### **4.4. Construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA)**

A construção dos blocos de TMA foi realizada na Consultoria em Patologia. As áreas tumorais selecionadas nas lâminas foram marcadas nos blocos de parafina de cada caso selecionado. No local marcado foi retirado

um cilindro de material (2,0 mm de diâmetro) de cada caso, o qual foi disposto em blocos de parafina receptores em linhas e colunas ordenados, com intervalos de 2,0 mm entre as amostras. O instrumento utilizado neste processo foi o *arrayer* de tecido biológico produzido pela Beecher instruments, Silver Spring, MD, EUA (figura 7).



**Figura 7** - Etapas da construção dos blocos de microarranjos de tecido (TMA). A: seleção da área tumoral na lâmina superposta ao bloco de parafina. B: Retirada do cilindro de tecido tumoral medindo 2,0mm de diâmetro. C e D: Disposição dos cilindros de amostra tumoral em bloco de parafina receptor. Ordenação em linhas e colunas com distância de 2,0mm entre as amostras. E: Aspecto final dos blocos de microarranjos de tecido

Foram criados quatro blocos com 30 amostras cada um, um bloco com 28 amostras e um bloco com 11. O número de amostras foi maior do que os utilizados no estudo porque estes blocos incluíam casos de carcinoma ductal “in situ” que não foram avaliados.



Criamos um mapa no qual a identificação de cada cilindro de tecido tinha uma coordenada x e y para orientação (figura 8). Os blocos foram selados a 60°C por 10 minutos e submetidos a cortes histológicos com 3 µm de espessura que foram dispostos em lâminas de vidro previamente tratadas com o adesivo poli-D-lisina (Sigma, St. Louis, EUA) e mantidos em estufa por 4 horas. As primeiras secções histológicas foram coradas pela técnica da hematoxilina-eosina para confirmar se as áreas corretas haviam sido incluídas nos blocos.





#### **4.5. Exame imunoistoquímico**

O exame imunoistoquímico foi realizado na Consultoria em Patologia, Botucatu (SP). Repetimos a determinação de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP), proteína HER-2 e Ki-67 e realizamos a pesquisa do receptor de androgênio (RA), PTEN e AKT fosforilado.

Cortes histológicos dos blocos de TMA com espessura de 3µm foram mantidos em estufa a 60°C por 4 horas e a seguir submetidos a desparafinação com banhos sucessivos de xilol, passagem em álcool etílico e lavagem em solução salina tamponada (PBS) com bloqueio da peroxidase endógena com solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 3%. Após a recuperação antigênica, os preparados histológicos foram incubados com os anticorpos primários e após nova lavagem em PBS, com os respectivos anticorpos secundários. Na tabela 2 estão listadas as características técnicas dos anticorpos primários utilizados e o sistema de recuperação antigênica utilizados.

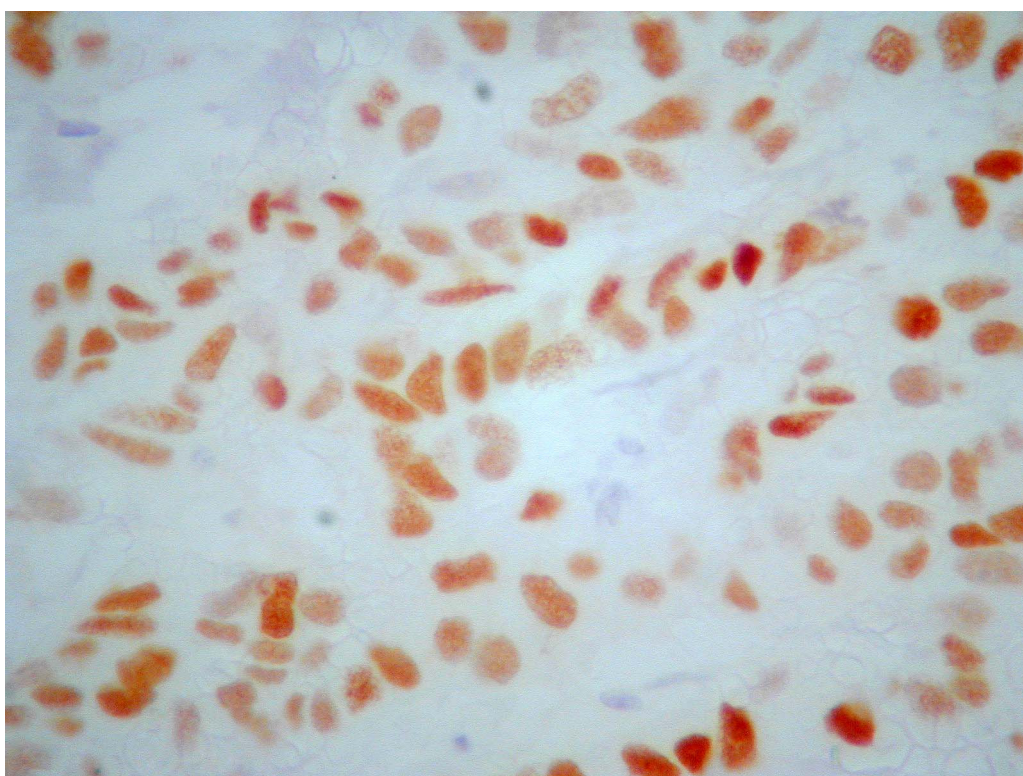
**Tabela 2** – Especificações técnicas dos anticorpos primários e tipo de recuperação antigênica utilizados no exame imunoistoquímico

<b>Antígeno</b>	<b>Anticorpo</b>	<b>Fabricante</b>	<b>Diluição</b>	<b>Recuperação antigênica</b>
<b>RE</b>	Monoclonal, Coelho, clone SP1	Neomarkers, Fremont, CA, EUA	1:1000	Panela de pressão
<b>RP</b>	Camundongo, clone PgR 636 monoclonal	Dako, Carpinteria, EUA	1:600	Panela de pressão
<b>RA</b>	Camundongo, Clone F39.4.1	Biogenex, San Ramon, CA, EUA)	1:640	Panela de pressão
<b>HER2</b>	Coelho, Clone SP3	Neomarkers, Fremont, CA, EUA	1:300	Panela de pressão
<b>Ki-67</b>	Camundongo, Clone MIB-1	Dako, Carpinteria, EUA	1:4800	Panela de pressão
<b>NCL-L-AKT-PHOS</b>	Camundongo, Clone LP18	Novocastra Laboratories, Newcastle, Reino Unido,	1:200	Panela de pressão
<b>PTEN</b>	Camundongo, clone 28H6	Novocastra, Laboratories, Newcastle, Reino Unido	1:800	Forno de microondas

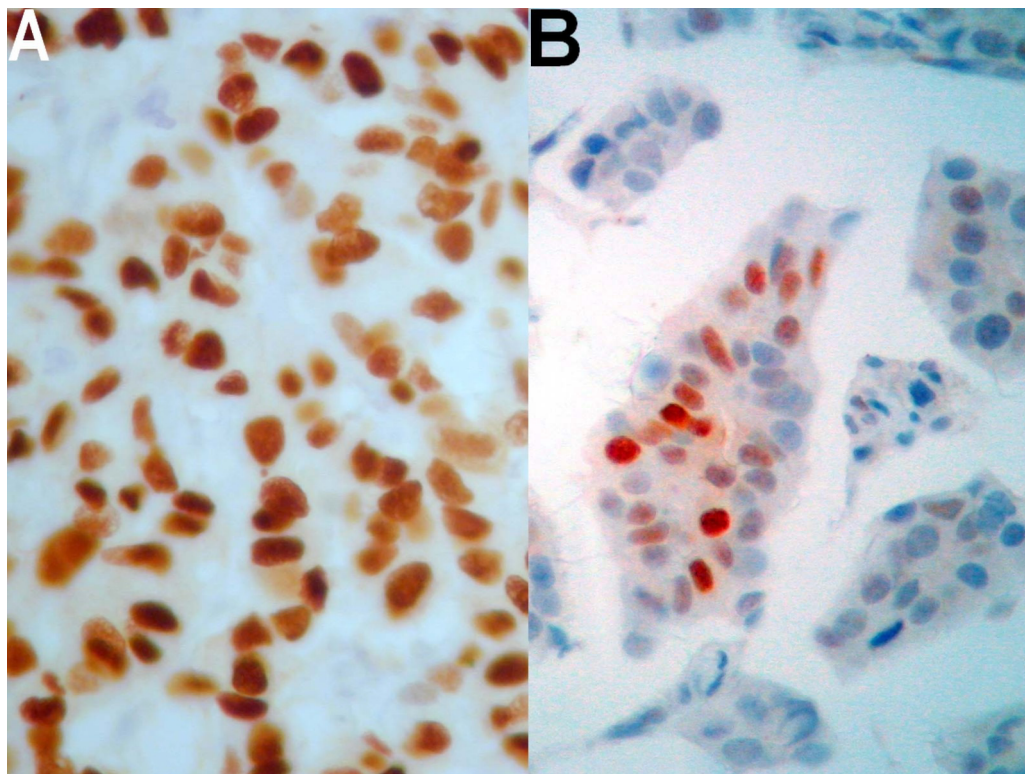
A seguir foi utilizado o sistema de detecção Novolink Polímero (Novocastra Laboratories, Newcastle, Reino Unido) conforme instruções do fabricante. A finalização das reações foi feita com tratamento por solução de 3,3 Diaminobenzidina (dab, Sigma, St. Louis, EUA) acrescida de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 0,2%, contracoloração com hematoxilina de Mayer e montagem com resina histológica Permount (Fischer Scientific, Pittsburgh, EUA).

#### 4.6. Interpretação imunoistoquímica

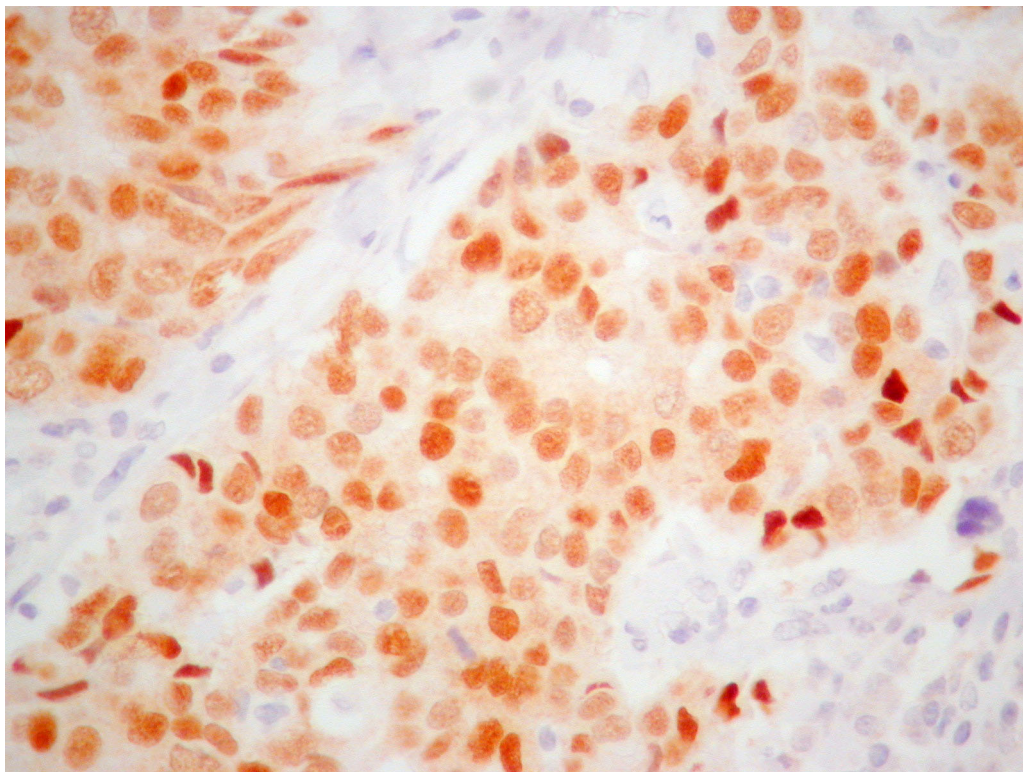
Tumores com pelo menos 10% das células neoplásicas com positividade nuclear para RE, RP e RA foram considerados positivos para estes marcadores, segundo critérios de Park et al.<sup>[22]</sup> (figuras 9, 10 e 11).



**Figura 9** - Receptor de estrogênio positivo na maioria das células neoplásicas com positividade nuclear (aumento microscópico original 400X)



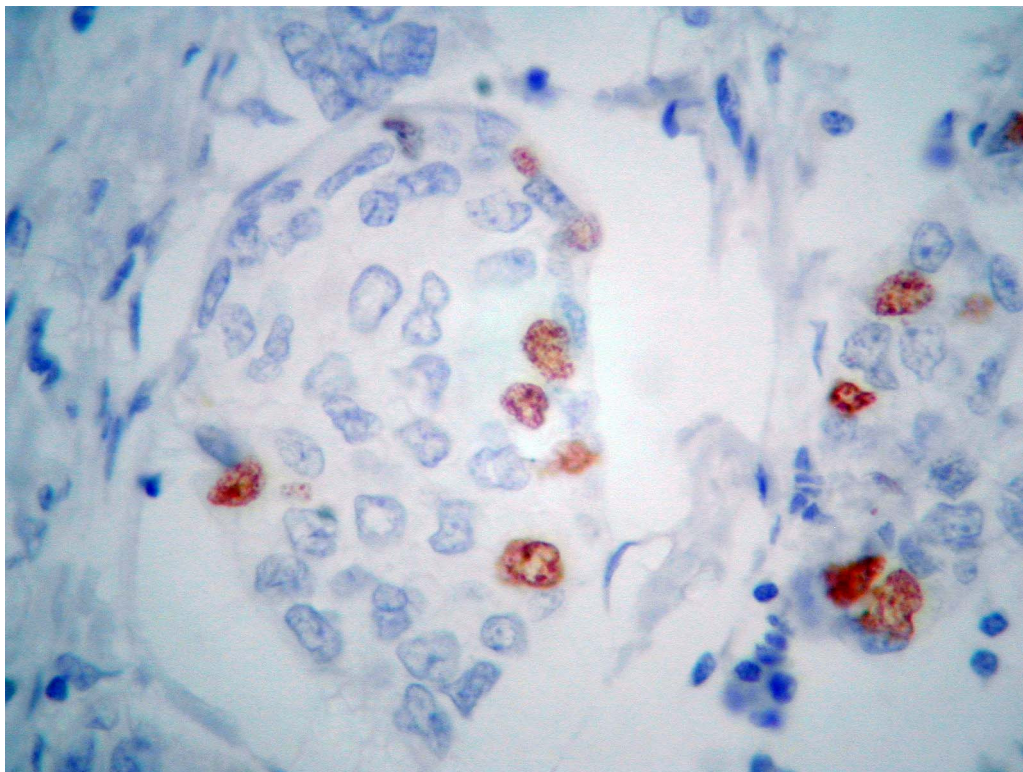
**Figura 10** - Receptor de progesterona com positividade nuclear forte e difusa em carcinoma ductal invasivo (A) e presente em 30% das células neoplásicas em um dos casos de carcinoma mucinoso (B) (aumento microscópico original 400X)



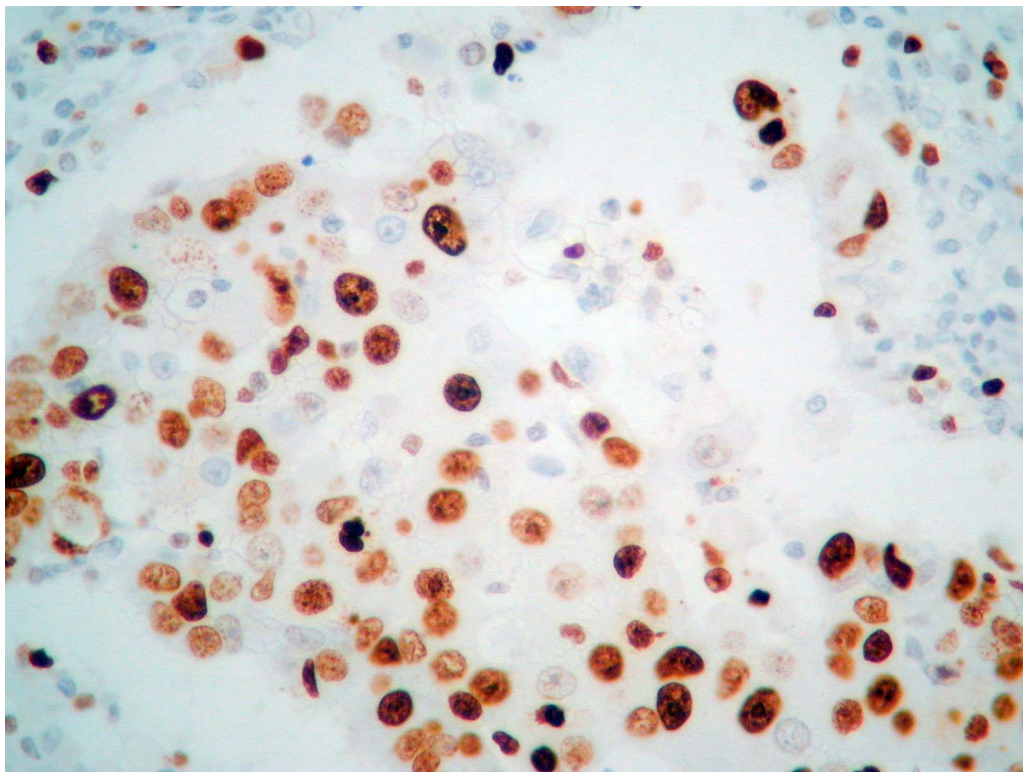
**Figura 11** - Receptor de androgênio positivo difusamente com marcação nuclear (aumento microscópico original 400X)

A avaliação da expressão do Ki-67 foi feita através da contagem de células com positividade nuclear em áreas com pelo menos 500 células e expressa em porcentagem de células positivas (figuras 12 e 13). A área de estudo foi a área de maior densidade de células positivas, selecionada pela observação subjetiva ao exame microscópico de menor aumento (40X).





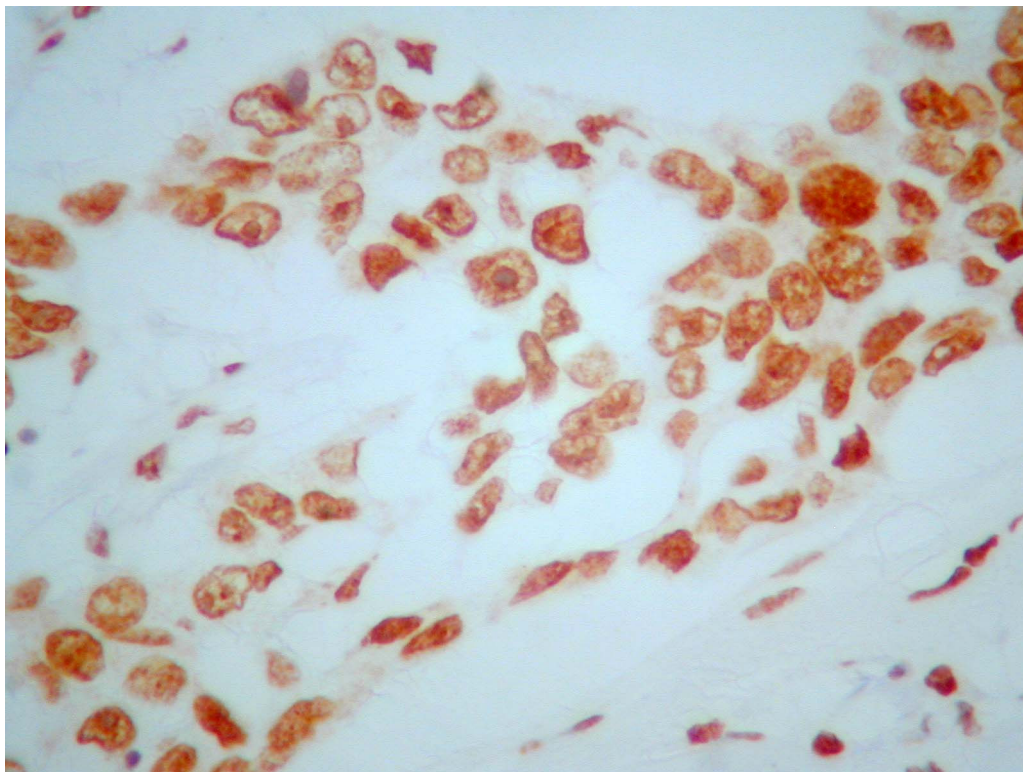
**Figura 12.** – Ki-67 positivo em 20% das células neoplásicas (aumento microscópico original 400X)



**Figura 13** - Ki-67 positivo em 70% das células neoplásicas (aumento microscópico original 400X)

Os tumores foram classificados quanto a expressão de PTEN em dois grupos:

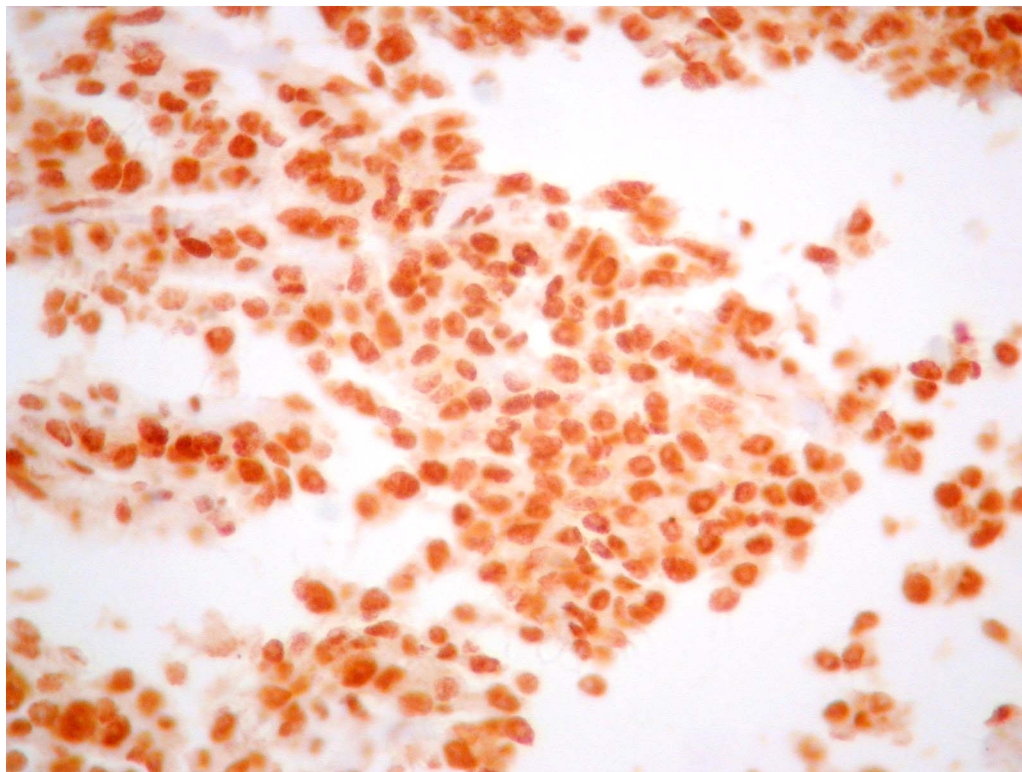
- 1) Presente: sem perda da expressão de PTEN: neoplasias com positividade difusa e forte, nuclear, em 100% das células neoplásicas (figura 14).
- 2) Reduzido: com perda da expressão de PTEN: tumores com menos de 100% de células neoplásicas com positividade nuclear.



**Figura 14** - Carcinoma mamário com 100% das células com positividade nuclear para PTEN (aumento microscópico original 400X)

A expressão de AKT foi avaliada pela porcentagem de células na amostra com positividade nuclear e/ou citoplasmática (figura 15). Os tumores com 10% ou mais de células coradas foram classificados como positivos, segundo critérios de Gori et al.<sup>[56]</sup>





**Figura 15** - Carcinoma ductal invasivo com positividade nuclear para AKT em 100% das células neoplásicas (aumento microscópico original 400X)

#### 4.7 Análise estatística

Estatísticas descritivas foram utilizadas para apresentação das frequências, médias, desvios-padrões e mediana das variáveis utilizadas.

As associações entre as variáveis categóricas foram feitas pela estatística do chi-quadrado de Pearson. As comparações entre dois grupos de uma variável numérica (idade, Ki-67) foram feitas pelo teste de Mann-Whitney. Foi criado modelo de regressão logística para análise das variáveis estudadas (PTEN, AKT, RE, RA e fenótipo apócrino) na previsão da

atividade proliferativa. A mediana da porcentagem de células positivas para o Ki-67 foi o nível de corte para baixa e alta atividade proliferativa.

Curvas de sobrevida geral e de eventos adversos foram construídas pelo método de Kaplan-Meier e comparadas quanto a expressão de AKT, PTEN, RA e perfil molecular apócrino através da estatística do *logrank* de Cox-Mantel.

O valor de  $p < 0,05$  foi considerado significativo.

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o MedCalc para Windows, versão 11.5.0.0 (MedCalc Software, Mariakerke, Bélgica).

## 5. RESULTADOS

A distribuição dos tipos histológicos dos tumores incluídos no estudo encontra-se na tabela 3.

**Tabela 3** – Distribuição dos tipos histológicos tumorais

Tipo histológico	n (%)
Carcinoma ductal invasivo	96 (92,3)
Carcinoma mucinoso	3 (2,9)
Carcinoma micropapilar invasivo	2 (1,9)
Carcinoma de células em “anel de sinete”	2 (1,9)
Carcinoma lobular pleomórfico invasivo	1 (0,9)
Total	104 (100)

Com relação às características clinicopatológicas da amostra deste estudo, a idade das pacientes variou de 30 – 91 anos, com média de  $54,02 \pm 12,40$  anos. As características clínico-patológicas da amostra estão sumarizadas na tabela 4.

**Tabela 4** – Características clinicopatológicas clássicas nos 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivos

<b>Características</b>	<b>Categorização</b>	<b>Resultado</b>
<b>Idade das pacientes, anos</b>	Intervalo	30-91
	Média±DP:	54,02±12,40
	Mediana:	53
<b>Características morfológicas apócrinas</b>	Presentes	71 (68,2%)
	Ausentes	33 (31,7%)
<b>Grau histológico</b>	1/2	46 (44,6%)
	3	57 (55,3%)
<b>Grau nuclear</b>	1/2	24 (23,3%)
	3	79 (76,6%)
<b>Componente “in situ”</b>	Ausente	35 (35,5%)
	Presente, <25%	45 (45,4%)
	Presente, >25%	19 (19,1%)
<b>Embolização vascular peritumoral</b>	Sim	32 (34,7%)
	Não	60 (65,2%)
<b>Necrose tumoral</b>	Presente	35 (35%)
	Ausente	65 (65%)
<b>Receptor de estrogênio</b>	Positivo	50 (48%)
	Negativo	54 (51,9%)
<b>Receptor de progesterona</b>	Positivo	34 (32,9%)
	Negativo	70 (67,3%)
<b>Ki-67</b>	Intervalo	0-95
	Média±DP:	44,3±22,41
	Mediana:	40

A expressão de PTEN esteve reduzida ou ausente em 20/104 (19,2%) dos casos. As associações entre a expressão de PTEN e as características clinicopatológicas estudadas encontram-se na tabela 5.

**Tabela 5** – Associações entre as características clinicopatológicas e a perda da expressão de PTEN

Variáveis		PTEN reduzido	PTEN presente	$p$
Número de casos	n	20	84	
Idade da paciente	média±DP	49 ± 10,0	53 ± 13,1	0,263*
Características morfológicas apócrinas	Sim	13 (65%)	58 (69%)	0,934**
	Não	7 (35%)	25 (29%)	
Grau histológico	1/2	9 (45%)	37 (44%)	0,994**
	3	10 (50%)	47 (55%)	
Grau nuclear	1/2	4 (20%)	20 (23%)	0,965**
	3	15 (75%)	64 (76%)	
Componente “in situ”	Ausente	4 (20%)	31 (36%)	0,379**
	Presente, <25%	8 (40%)	37 (44%)	
	Presente, >25%	5 (25%)	14 (16%)	
Embolização vascular peritumoral	Sim	6 (30%)	26 (30%)	0,843**
	Não	11 (55%)	49 (58%)	
Necrose tumoral	Presente	5 (25%)	30 (35,7%)	0,538**
	Ausente	14 (70%)	51 (60,7%)	
Receptor de estrogênio	Positivo	8 (40%)	42 (50%)	0,578**
	Negativo	12 (60%)	42 (50%)	
Receptor de progesterona	Positivo	6 (30%)	28 (84%)	0,984**
	Negativo	14 (70%)	56 (66%)	
Receptor de androgênio	Positivo	20 (100%)	69 (82%)	0,091**
	Negativo	0	17 (17%)	
Ki-67	Intervalo	15-90	0-90	0,034*
	Média±DP:	35,5 ± 19,7	46 ± 22,7	
	Mediana:	37,5	40	
Evento desfavorável	Sim	3 (15%)	8 (9,5%)	0,816**
	Não	11 (20%)	33 (39%)	
Óbito	Sim	2 (10%)	7 (8,3%)	0,941**
	Não	13 (65%)	34 (40,4%)	

\*teste de Mann-Whitney

\*\* teste do chi-quadrado de Pearson

Não houve associação estatisticamente significativa entre a perda de expressão do PTEN e idade das pacientes, tipo e grau histológicos, grau nuclear, presença de características apócrinas, presença de componente “in situ”, presença de embolização vascular, presença de necrose tumoral, expressão de receptores hormonais, e evolução com recorrência ou óbito. Os tumores com preservação da atividade do PTEN mostraram maior índice de Ki-67 do que aqueles com redução ou ausência de atividade deste marcador ( $46,0 \pm 22,7$  vs.  $35,5 \pm 19,7$ ) e essa associação foi estatisticamente significativa ( $p = 0,03$ ). Houve uma tendência de associação entre perda de expressão de PTEN e o receptor de androgênio. Todos os tumores com perda de expressão do PTEN eram RA positivos.

A expressão de AKT foi positiva em 71/104 (68,3%) dos casos. As associações entre as expressões de AKT e as características clinicopatológicas estudadas encontram-se na tabela 6.

**Tabela 6** – Associações entre as características clinicopatológicas e a expressão de AKT fosforilada em 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivo

Variáveis		AKT positivo	AKT negativo	<i>p</i>
Número de casos	N	71	33	
Idade da paciente	média±DP	53,2 ± 13,2	54,9 ± 11,9	0,624
Características morfológicas apócrinas	Sim	45 (63,3%)	26 (78,7%)	0,178
	Não	26 (36,6%)	7 (21,2%)	
Grau histológico	1/2	37 (52,8%)	9 (27,2%)	0,026
	3	33 (47,1%)	24 (72,7%)	
	Não avaliável	1	0	
Grau nuclear	1/2	18 (25,7%)	6 (18,1%)	0,552
	3	52 (74,2%)	27 (81,8%)	
	Não avaliável	1	0	
Componente “in situ”	Ausente	27 (39,1%)	8 (26,6%)	0,467
	Presente, <25%	29 (42%)	16 (53,3%)	
	Presente, >25%	13 (18,8%)	6 (20%)	
	Não avaliável	2	3	
Embolização vascular peritumoral	Sim	20 (31,7%)	12 (41,3%)	0,505
	Não	43 (68,2%)	17 (58,6%)	
	Não avaliável	8	4	
Necrose tumoral	Presente	20 (28,5%)	15 (50%)	0,067
	Ausente	50 (71,4%)	15 (50%)	
	Não avaliável	1	3	
Receptor de estrogênio	Positivo	39 (54,9%)	11 (33,3%)	0,065
	Negativo	32 (45%)	22 (66,6%)	
Receptor de progesterona	Positivo	27 (38%)	7 (21,2%)	0,139
	Negativo	44 (61,9%)	26 (78,7%)	
Receptor de androgênio	Positivo	66 (92,9%)	23 (69,6%)	0,004
	Negativo	5 (7,04%)	10 (30,3%)	
Ki-67	Intervalo	0-95	15-80	0,2180
	Média±DP	45,6 ± 22,1	40,4 ± 21,5	
	Mediana	40	30	
Evento desfavorável	Sim	8 (21,6%)	3 (16,6%)	0,9427
	Não	29 (78,3%)	15 (83,3%)	
	Não avaliável	34	15	
Óbito	Sim	7 (18,4%)	2 (11,1%)	0,7596
	Não	31 (81,5%)	16 (88,8%)	
	Não avaliável	33	15	

A expressão de AKT fosforilada se associou a grau histológico mais diferenciado ( $p=0,026$ ) e a expressão de RA (0,004). Houve uma tendência a associação entre a expressão de AKT e menor taxa de necrose tumoral (0,067) e expressão de RE ( $p=0,065$ ). As demais características clinicopatológicas estudadas não apresentaram associação com a expressão de AKT.

A média de Ki-67 foi maior no grupo com expressão de AKT do que no grupo que não expressou este marcador ( $45,62\pm 22,1$  versus  $40,4\pm 21,5$ ), mas a diferença não atingiu o nível de significância estatística.

A expressão do PTEN mostrou tendência de correlação com a expressão de AKT (tabela 7).

**Tabela 7** – Associação entre expressão de AKT e PTEN em 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivo

	AKT positivo	AKT negativo	Total
PTEN presente	59 (56,7%)	25 (24%)	84
PTEN reduzido	12 (11,5%)	8 (7,69%)	20
Total	71	33	104

Chi-quadrado=0,380;  $p=0,060$

O receptor de androgênio foi positivo em 89/104 (85,6%) dos casos. As associações entre a expressão de RA e as características clinicopatológicas estudadas encontram-se na tabela 8.



**Tabela 8** – Associações entre as características clinicopatológicas e a expressão de receptor de androgênio em carcinomas mamários HER-2 positivos

Variáveis		RA positivo	RA negativo	<i>p</i>
Número de casos	n	89	15	
Idade da paciente	média±DP	54,1 ± 12,6	50,3 ± 11,2	0,887
Características morfológicas apócrinas	Sim	62 (69,6%)	9 (60%)	0,657
	Não	27 (30,3%)	6 (40%)	
Grau histológico	1/2	44 (49,4%)	2 (13,3%)	0,018
	3	44 (49,4%)	13 (86,6%)	
	Não avaliável	1	0	
Grau nuclear	1/2	23 (26,1%)	1 (6,66%)	0,183
	3	65 (73,8%)	14 (93,3%)	
	Não avaliável	1	0	
Componente “in situ”	Ausente	29 (34,1%)	6 (42,8%)	0,783
	Presente, <25%	39 (45,8%)	6 (42,8%)	
	Presente, >25%	17 (20%)	2 (14,2%)	
	Não avaliável	4	1	
Embolização vascular peritumoral	Sim	26 (32,5%)	6 (50%)	0,389
	Não	54 (67,5%)	6 (50%)	
	Não avaliável	9	3	
Necrose tumoral	Presente	29 (33,7%)	6 (42,8%)	0,717
	Ausente	57 (66,2%)	8 (57,1%)	
	Não avaliável	3	1	
Receptor de estrogênio	Positivo	48 (53,9%)	2 (13,3%)	0,008
	Negativo	41 (46%)	13 (86,6%)	
Receptor de progesterona	Positivo	33 (37%)	1 (6,6%)	0,042
	Negativo	56 (62,9%)	14 (93,3%)	
Ki-67	Intervalo	0 - 95	20-90	0,001
	Média±DP:	40,9 ± 20,7	60 ± 21,6	
	Mediana:	40	70	
Evento desfavorável	Sim	11 (22,4%)	0	0,449
	Não	38 (77,5%)	6 (100%)	
	Não avaliável	40	9	
Óbito	Sim	9 (18%)	0	0,585
	Não	41 (82%)	6 (100%)	
	Não avaliável	39	9	

Observamos que tumores RA negativos se associam a maior fração de alto grau histológico do que os tumores RA positivos (86,6% vs. 49,4%;  $p=0,018$ ). A fração de carcinomas de alto grau nuclear foi maior no grupo

RA-negativo do que RA-positivo (93,3% vs. 73,8%) mas a diferença não atingiu o nível de significância estatística ( $p=0,183$ ).

A expressão de RA está associada a expressão de RE ( $p=0,008$ ). Somente 2/50 (4%) dos casos RE-positivos foram negativos para RA. Já o perfil apócrino molecular caracterizado por RE-negativo e RA-positivo foi identificado em 41/104 casos (39,4%). Da mesma maneira, somente 1/34 (2,9%) dos casos RP-positivos foi negativo para RA ( $p=0,042$ ). No grupo de tumores negativos para RA, os tumores classificados como RE e RP negativos representaram a maioria dos casos (86,6% e 93,3%, respectivamente).

O índice de ki-67 foi alto em ambos os grupos, mas maior no grupo RA negativo (média 60 vs. 40,9) ( $p = 0,001$ ).

Não houve diferenças estatisticamente significantes entre a expressão de RA e as demais variáveis (tabela 8).

As associações entre o perfil molecular apócrino (RE-negativo e RA-positivo) podem ser visualizadas na tabela 9.

**Tabela 9** – Associações entre o perfil molecular apócrino (RE-negativo/RA-positivo) e as características clinicopatológicas em 104 casos de carcinoma mamário HER-2 positivo

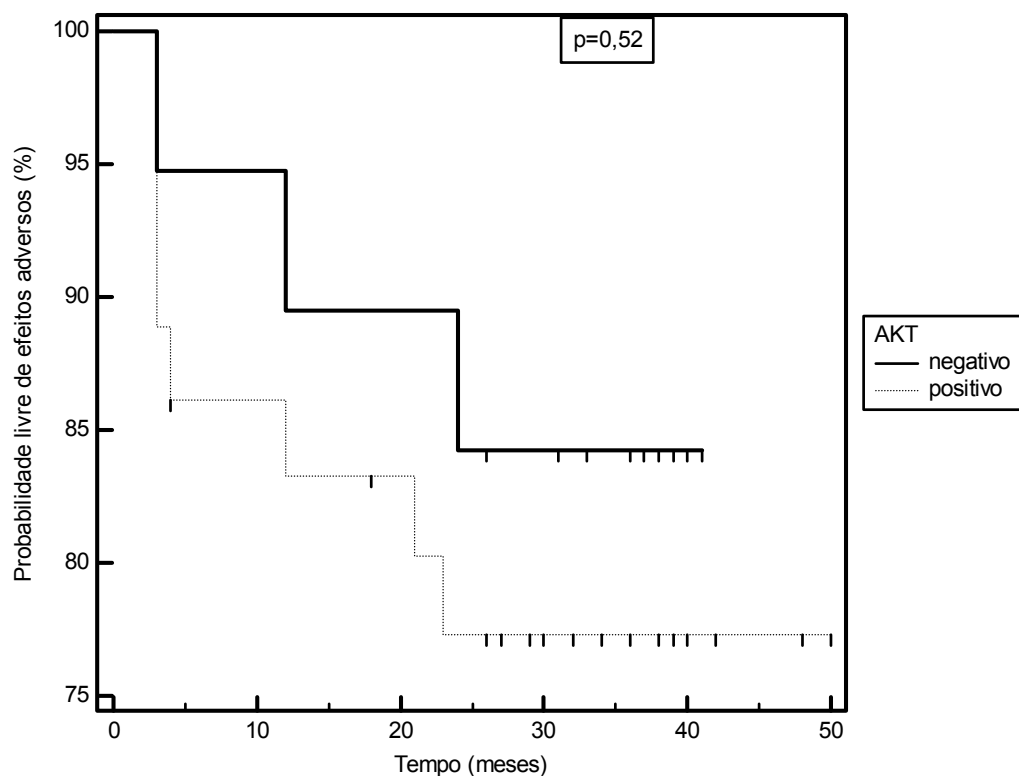
Variáveis		Perfil molecular apócrino (RE-/RA+)		p
		Sim	Não	
Número de casos	n	41	63	
Idade da paciente	média±DP	54,8±12,94	53,1±12,40	0,602
Características morfológicas apócrinas	Sim	33 (80,4%)	38 (60,3%)	0,173
	Não	8 (19,5%)	25 (39,6%)	
Grau histológico	1/2	17(41,5%)	29 (46,8%)	0,032
	3	24 (58,5%)	33 (53,2%)	
	Não avaliável	0	1	
Grau nuclear	1/2	6 (14,6%)	18 (29%)	0,142
	3	35 (85,3%)	44 (70,9%)	
	Não avaliável	0	1	
Componente “in situ”	Ausente	13 (31,7%)	22 (34,9%)	0,053
	Presente, <25%	14 (34,1%)	31(49,2%)	
	Presente, >25%	12 (29,3%)	7 (11,1%)	
	Não avaliável	2	3	
Embolização vascular peritumoral	Sim	14 (35,8%)	11 (23,9%)	0,332
	Não	25 (64,1%)	35 (76%)	
	Não avaliável	2	17	
Necrose tumoral	Presente	18 (43,9%)	18 (30%)	0,222
	Ausente	23 (56%)	42 (70%)	
	Não avaliável	0	3	
Ki-67	Média±DP	44,7±23,71	44,0±21,72	0,870
Evento desfavorável	Sim	8 (32%)	4 (12,9%)	0,118
	Não	17 (68%)	27 (87%)	
	Ignorado	16	32	
Óbito	Sim	7 (28%)	2 (6,45%)	0,274
	Não	18 (72%)	29 (93,5%)	
	Ignorado	16	32	

Características morfológicas apócrinas foram identificadas em 71/104 (68,2%) dos casos. As associações deste padrão morfológico com as demais características clinicopatológicas estão sumarizadas na tabela 10.

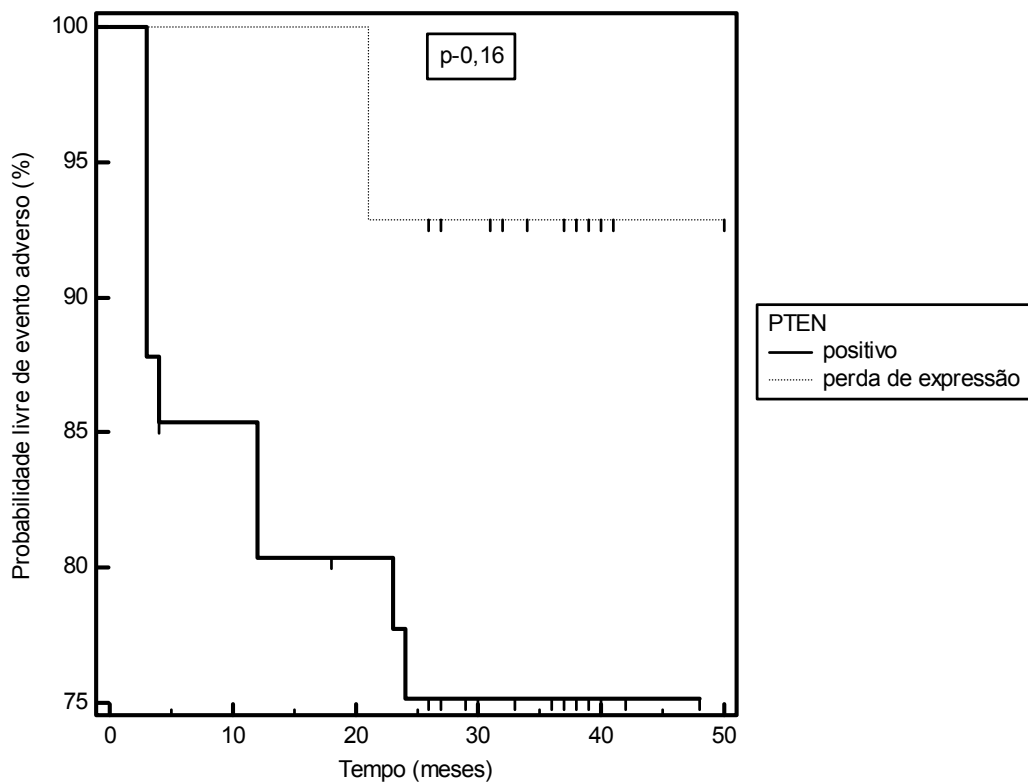
**Tabela 10** – Associações entre as características clinicopatológicas e características morfológicas apócrinas em carcinomas mamários HER-2 positivos

Variáveis		Morfologia apócrina		p
		sim	Não	
Número de casos	n	71	33	
Idade da paciente	média±DP	55,7±12,00	49,4±12,91	0,020
Grau histológico	1/2	24 (34,2%)	22 (66,6%)	0,004
	3	46 (65,7%)	11 (33,3%)	
	Não avaliável	1	0	
Grau nuclear	1/2	6 (8,57%)	18 (54,5%)	<0,0001
	3	64 (91,4%)	15 (45,4%)	
	Não avaliável	1	0	
Componente “in situ”	Ausente	17 (25,3%)	18 (56,2%)	0,005
	Presente, <25%	33 (49,2%)	12 (37,5%)	
	Presente, >25%	17 (25,3%)	2 (6,2%)	
	Não avaliável	4	1	
Embolização vascular peritumoral	Sim	24 (38%)	8 (27,5%)	0,45
	Não	39 (61,9%)	21 (72,4%)	
	Não avaliável	8	4	
Necrose tumoral	Presente	27 (39,7%)	8 (25%)	0,225
	Ausente	41 (60,2%)	24 (75%)	
	Não avaliável	3	1	
Receptor de estrogênio	Positivo	30 (42,2%)	20 (60,6%)	0,125
	Negativo	41 (57,7%)	13 (39,3%)	
Receptor de progesterona	Positivo	21 (29,5%)	13 (39,3%)	0,442
	Negativo	50 (70,4%)	20 (60,6%)	
Receptor de androgênio	Positivo	62 (87,3%)	27 (81,8%)	0,657
	Negativo	9 (12,6%)	6 (18,1%)	
Ki-67	Média±DP	45,3±21,58	42,2±24,33	0,472
Evento desfavorável	Sim	8 (19,5%)	4 (26,6%)	0,834
	Não	33 (80,4%)	11 (73,3%)	
	Ignorado	30	18	
Óbito	Sim	6 (14,6%)	3 (20%)	0,941
	Não	35 (85,3%)	12 (80%)	
	Ignorado	30	18	

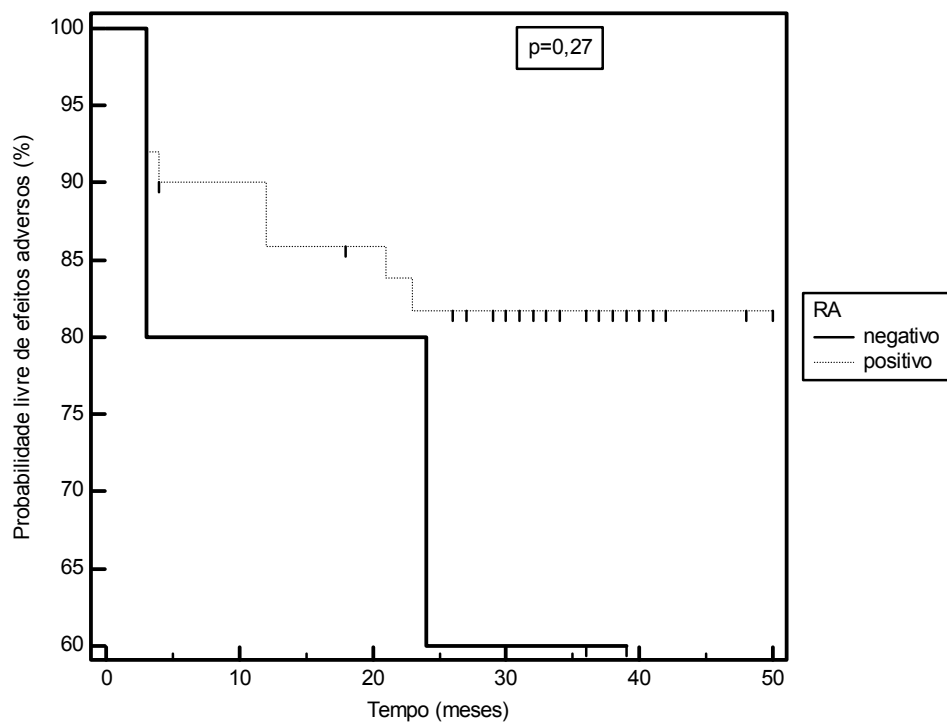
As curvas de probabilidade de eventos adversos segundo a expressão de AKT-fosforilada, perda da expressão do PTEN, expressão de RA e presença de perfil molecular apócrino estão representadas nas figuras 16 a 19.



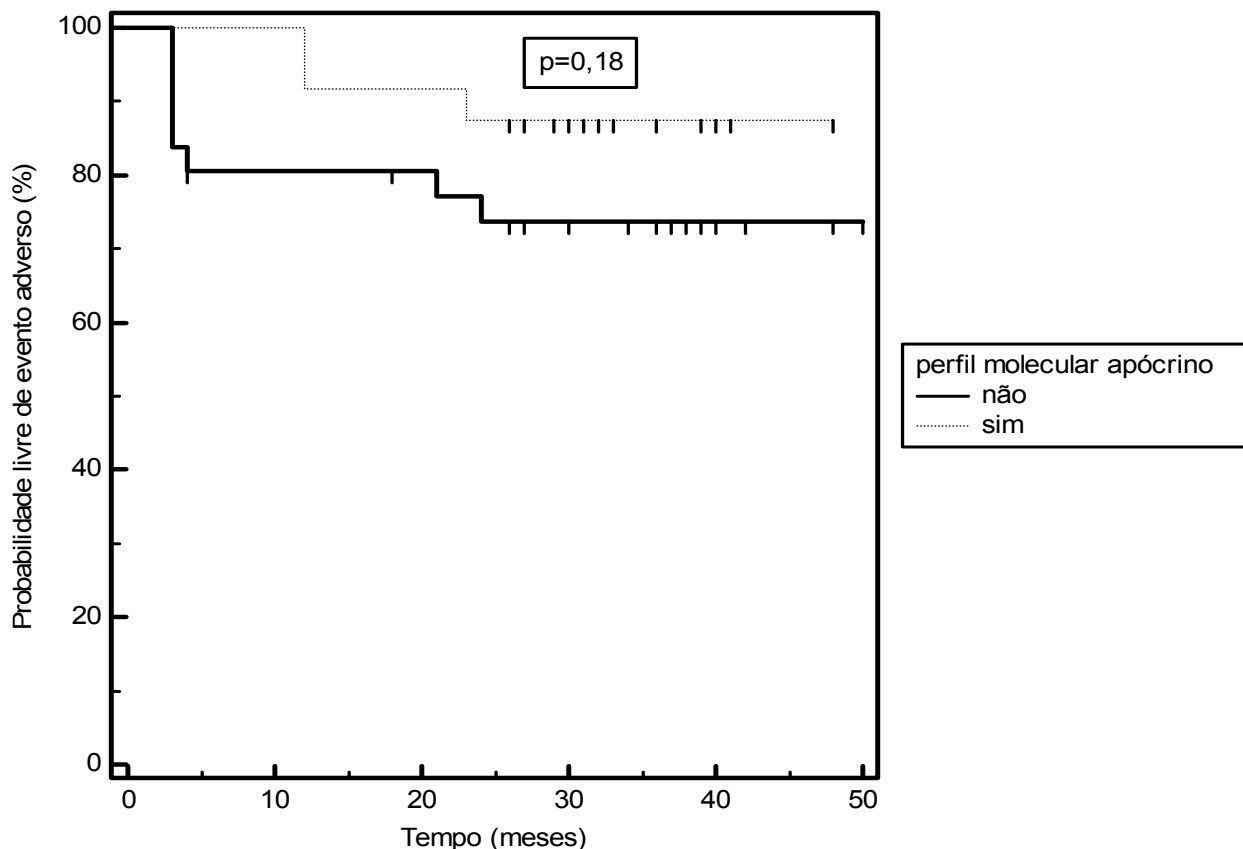
**Figura 16** – Curvas de Kaplan-Meier para eventos desfavoráveis (recorrência locoregional, recorrência à distância e óbito) segundo a expressão de AKT



**Figura 17** – Curvas de Kaplan-Meyer para eventos desfavoráveis (recorrência locoregional, recorrência à distância e óbito) segundo a perda de expressão do PTEN



**Figura 18** – Curvas de Kaplan-Meier para eventos desfavoráveis (recorrência locoregional, recorrência à distância e óbito) segundo a expressão de RA



**Figura 19** – Curvas de Kaplan-Meier para eventos desfavoráveis (recorrência locoregional, recorrência à distância e óbito) segundo o perfil molecular apócrino (RE-/RA+)

A análise univariada para probabilidade de evento adverso nos 55 casos de câncer de mama HER-2 positivo nos quais foi possível realizar seguimento, mostrou que a presença de AKT fosforilada e PTEN aumentam o risco da ocorrência de evento adverso, enquanto que a presença de RA e perfil molecular apócrino diminuem. Não houve, entretanto, significância estatística para nenhum desses fatores (tabela 11).



**Tabela 11** – Análise univariada para probabilidade de evento adverso na evolução de 55 carcinomas de mama HER-2 positivos

			Teste de logrank	
Fator	HR	IC95%	Chi-quadrado	<i>p</i>
AKT fosforilada	1,52	0,45 - 5,20	0,41	0,52
Perda de PTEN	0,26	0,07 - 0,98	1,97	0,16
Receptor de androgênio	0,44	0,05 - 3,50	1,23	0,27
Perfil molecular apócrino	0,43	0,13-1,40	1,74	0,18

HR=hazard-ratio

Sobre os 9 casos que evoluíram com óbito, a idade das pacientes variou de 40 a 81 anos e o tempo de seguimento variou de 3 a 36 meses. Entre os 6 casos que apresentaram morfologia apócrina, todas tinham perfil molecular apócrino, ou seja, eram RE-negativo/RA-positivo. A expressão do receptor de androgênio foi positiva na totalidade dos casos desta amostra e 7/9 casos mostraram positividade para AKT fosforilada. A perda da expressão do PTEN ocorreu em apenas dois destes casos (tabela 12).

**Tabela 12** – Características de apresentação dos casos que foram a óbito

Caso (n)	Idade (anos)	TS (meses)	RE (+)	RA (+)	Ki-67 (%)	Perda PTEN	AKT (+)	Morfologia Apócrina
1	46	3	-	+	40	Não	Sim	Não
2	40	24	-	+	40	Não	Sim	Sim
3	54	12	-	+	25	Não	Não	Sim
4	58	24	-	+	20	Sim	Não	Sim
5	57	30	-	+	60	Não	Sim	Sim
6	58	Ign	-	+	20	Sim	Sim	Sim
7	81	3	-	+	40	Não	Sim	Sim
8	56	36	+	+	10	Não	Sim	Não
9	45	3	+	+	60	Não	Sim	Não

TS: Tempo de seguimento; RE: Receptor de estrogênio, RA: Receptor de androgênio; Ign: Ignorado

Na análise conjunta das variáveis AKT, RA, PTEN e RE através de regressão logística pelo método *stepwise* permaneceram como significativamente associados a previsão de atividade proliferativa somente AKT negativo ( $p=0,005$ ; OR 0,16 (IC95% 0,04-0,58) e RA negativo ( $p=0,0004$ ; OR 28,6 (IC95% 4,4-186,6). O modelo foi capaz de prever corretamente 96,5% dos casos com baixa atividade proliferativa ( $\leq 40\%$ ), entretanto, somente 26,7% dos casos com alta atividade proliferativa ( $>40\%$ ).

## 6. DISCUSSÃO

A amplificação do gene *HER-2* e a conseqüente superexpressão de sua proteína homônima ocorrem em 15-30%<sup>[7-9]</sup> dos tumores invasivos da mama e conferem à célula neoplásica mamária características de maior agressividade, que se dão pela ativação de vias de sinalização celulares tais como a via PI3K/AKT. Esta via está relacionada ao controle da proliferação celular, regulação da apoptose e da angiogênese<sup>[105],[57]</sup>. Assim, tumores cujas células apresentam positividade para HER-2 apresentam também maiores taxas de proliferação celular, resistência a apoptose além de menor freqüência de positividade para os receptores hormonais (estrogênio e progesterona). Tais características se traduzem no cenário clínico como piores índices de sobrevida livre de doença e sobrevida global<sup>[46],[47]</sup>.

O anticorpo monoclonal trastuzumabe, ao se ligar ao domínio externo do HER-2, inibe a transdução de sinal provocando inibição da proliferação e do crescimento celular além de proporcionar aumento da apoptose. Entre os seus conhecidos mecanismos de ação, está a inibição da via PI3K/AKT que está ativada nos casos de superexpressão de HER-2<sup>[14],[15]</sup>. AKT ativada/fosforilada é negativamente regulada pelo PTEN e o efeito básico do trastuzumabe é a ativação de PTEN levando à inibição da fosforilação da AKT pelo PI3K<sup>[15],[105]</sup>. A perda da função do PTEN nos casos de uso do trastuzumabe leva à persistência da ativação da via PI3K/AKT, sendo este um dos reconhecidos mecanismos de resistência a esta droga<sup>[13]</sup>.

A despeito dos avanços no que diz respeito ao desenvolvimento de terapias dirigidas contra o HER-2, muito há que se compreender, visto que as falhas de resposta ao tratamento específico podem estar associadas tanto à heterogeneidade deste grupo tumoral (conforme demonstrado desde o ponto de vista de sua assinatura genética) quanto a alterações em vias de sinalizações diretamente relacionadas ao controle do ciclo celular, tais como a via PI3K/AKT.

Levando em conta este contexto e considerando a busca de novos alvos terapêuticos, a via de sinalização androgênica surge como uma nova alternativa, visto que os tumores de mama do tipo apócrino molecular, caracterizados por expressar RA e serem negativos para RE e RP apresentam como principal alteração genética a amplificação de HER-2<sup>[17].[18]</sup>.

Neste estudo, investigamos 104 amostras de carcinomas primários da mama com positividade para HER-2, com o objetivo de avaliar a frequência da expressão imunohistoquímica de PTEN, AKT fosforilada e receptor de androgênio, e realizar associações destes marcadores com determinadas características clínicas das pacientes como a idade, sobrevida livre de doença e sobrevida global e também realizar associações com aspectos morfológicos tumorais anteriormente definidos tais como características apócrinas, grau histológico e nuclear, receptores hormonais, atividade proliferativa, presença de componente “in situ”, embolização vascular peritumoral e necrose tumoral.

Com relação à frequência da expressão de PTEN, no presente estudo observou-se redução da expressão desta proteína em 20/104 (19,2%) dos

tumores avaliados e não houve relação entre a redução da expressão do PTEN com as características clínicas e morfológicas estudadas, exceto Ki-67. Este achado é consistente com outros estudos<sup>[106-108]</sup>, porém, alguns autores encontraram resultados diferentes. Por exemplo, Lee et al.<sup>[109]</sup> relataram que a perda da expressão do PTEN se relacionou com *status* linfonodal, grau tumoral e estágio clínico segundo classificação TNM embora não tenha tido diferença estatisticamente significativa entre a expressão do PTEN e a idade das pacientes ou presença de embolização vascular peritumoral. Bose et al.<sup>[110]</sup> encontraram correlação entre a redução da expressão de PTEN e o alto grau histológico tumoral.

*PTEN* exerce sua função supressora tumoral através de seus domínios fosfatase (catalítico) e lipídico (domínio C2)<sup>[111]</sup> que promovem desfosforilação de substratos do PI3K promovendo controle do ciclo celular com parada em G1 e morte celular<sup>[112]</sup>. Mutações no gene *PTEN* que levam à perda da expressão de sua proteína têm sido identificadas em uma ampla variedade de tumores esporádicos tais como próstata, endométrio, rins, sistema nervoso central, entre outros. A mutação germinativa deste gene está relacionada a uma condição de herança autossômica dominante conhecida como Síndrome de Cowden, desordem associada a maior predisposição para o desenvolvimento de múltiplos hamatomas cutâneos bem como tumores de tireóide e de mama em idade precoce<sup>[110, 113]</sup>. No que diz respeito ao câncer de mama, a perda de expressão do PTEN nos tumores esporádicos é atribuída principalmente à perda de heterozigose ou hipermetilação do gene<sup>[106, 111]</sup> e ocorre em aproximadamente 30-40% dos casos<sup>[110, 112, 114, 115]</sup>.

A utilização de diferentes anticorpos, diferentes métodos de fixação de tecidos e diferenças no protocolo de recuperação de antígeno ou no tempo de incubação podem explicar a menor frequência da expressão do PTEN em nosso estudo em comparação com a literatura. Além disso, a ausência imunistoquimicamente detectável de PTEN pode representar a subestimação da proporção de tumores invasivos de mama que carregam uma inativação deste gene. Em um estudo retrospectivo, Bose et al.<sup>[110]</sup> avaliaram a perda da expressão imunistoquímica de PTEN em 34 tumores esporádicos invasivos de mama nos quais identificou-se perda da heterozigose no cromossomo 10q23 (lócus do *PTEN*) em 13 deles. Destes, apenas 6 tumores apresentaram redução da expressão imunistoquímica de PTEN, sugerindo que a perda da heterozigose não afeta a expressão de PTEN a um nível detectável por métodos imunistoquímicos.

Surpreendentemente os índices de proliferação celular foram maiores nos tumores que apresentaram expressão de PTEN quando comparados àqueles com expressão reduzida ou ausente (46 *versus* 35,5;  $p=0,034$ ).

Em estudo que avaliou a expressão de PTEN por imunistoquímica em amostras de tecido endometrial normal durante as diferentes fases do ciclo menstrual, Mutter et al.<sup>[116]</sup> observaram que durante a fase proliferativa do ciclo menstrual os níveis de expressão de PTEN foram maiores do que durante a fase secretora e para eles, isso pode ser explicado pelo fato de que a atividade supressora tumoral mediada pelo PTEN pode ser necessária em um ambiente estrogênico altamente mitótico e proliferativo, em contrapartida, em um ambiente onde há predomínio de atividade progesteronal e, portanto, menor proliferação e divisão celular, o

recrutamento de PTEN e de sua atividade supressora tumoral não se faz necessário. Embora sejam diferentes tecidos, é possível que um mecanismo similar ao que ocorre no endométrio aconteça também nos tecidos tumorais mamários, ou seja, a presença de PTEN nos tumores de mama que exibem maior atividade proliferativa pode estar relacionada a um mecanismo de compensação que tem por objetivo o controle da proliferação celular e, portanto a manutenção do delicado equilíbrio do ambiente intracelular. O impacto da influência do PTEN na atividade proliferativa desaparece na análise multivariada, quando incluídos os receptores hormonais e AKT. Seguramente, o controle da expressão do PTEN depende de vários fatores. Mais estudos são necessários para elucidar todas os fatores relacionados a este controle e como eles estão implicados na resistência ao trastuzumabe.

Com relação ao AKT, a avaliação imunoistoquímica de nossas amostras tumorais identificou positividade em 71/104 (68,3%) dos casos, semelhantemente ao descrito por outros autores<sup>[56, 117]</sup>. Em estudo realizado por Bose et al.<sup>[118]</sup> demonstrou-se, pela primeira vez, que AKT já está ativa em boa parte dos tumores *in situ* da mama, o que leva à compreensão de que sua atividade oncogênica se inicia precocemente nos estágios evolutivos da carcinogênese mamária. Isso poderia explicar a alta prevalência de positividade de AKT neste e em outros estudos.

AKT é uma serina treonina quinase que exerce a importante função de regular diversos processos celulares tais como apoptose, proliferação, diferenciação e metabolismo. A ativação de AKT se inicia primariamente através da união exógena de fatores de crescimento a seus receptores, que possuem atividade tirosino-quinase intrínseca (por exemplo, HER-2). Uma

vez feita a união, ocorre a fosforilação (ativação) do domínio tirosino-quinase intracelular contido no interior do receptor e se desencadeiam os múltiplos processos celulares que culminam com o controle do crescimento celular e progressão tumoral<sup>[59, 117]</sup>.

Encontramos uma significativa relação inversa entre a positividade de AKT e o grau histológico tumoral ( $p=0,02$ ) e uma tendência a relações inversas também com outras variáveis que se relacionam com o prognóstico do ponto de vista anatomopatológico tais como embolização vascular peritumoral e necrose tumoral. Esses achados são semelhantes aos de alguns estudos<sup>[108, 117]</sup> e ocorrem a despeito das evidências de que AKT abriga propriedades anti-apoptóticas e promove o crescimento e progressão tumoral. Por outro lado, outros estudos demonstraram uma relação direta entre AKT fosforilada e o grau histológico tumoral<sup>[119, 120]</sup>.

A relação entre a positividade de RE e a expressão de AKT foi um dos achados muito interessantes do presente estudo, apesar de estar no limite da significância estatística ( $p=0,06$ ). Em estudo *in vitro* realizado em células da linhagem MCF-7, Stoica et al.<sup>[121]</sup> demonstraram que em células de câncer de mama positivas para RE, o estradiol mimetiza os efeitos dos ligantes dos receptores de fatores de crescimento, levando à ativação da via PI3K/AKT. Mais interessante ainda, este efeito só ocorreu nas células com positividade para HER-2. Dessa maneira, os achados de Stoica et al. explicam a correlação positiva entre a expressão de RE e AKT não só em nosso estudo, mas também em outros relatados na literatura<sup>[108, 117]</sup>.

Quanto à expressão de RP, a ativação da via PI3K/AKT é considerada um dos fatores que inibem a expressão de RP. AKT ativado



reprime a transcrição de RP dependente de RE, levando à perda da expressão de RP<sup>[59]</sup>. Em nosso estudo, a positividade de RP foi menor nos casos com positividade de AKT, embora não tenha alcançado significância estatística.

Diferentemente do esperado, a expressão de PTEN mostrou tendência a correlação com a expressão de AKT. Este achado fala a favor da existência de outros mecanismos de ativação de AKT que vão além do estímulo desencadeado pela união do fator de crescimento ao receptor com atividade tirosino-quinase. Ou seja, não é possível afirmar que exista apenas um modelo linear simples de ativação desta via que passa necessariamente pela redução da expressão de PTEN com conseqüente aumento da expressão de AKT, mas que outros fatores podem estar envolvidos nesta ativação, como por exemplo, o RE conforme demonstrado acima. Além disto, o aumento da atividade proliferativa, determinado não só pela via AKT, mas também da MAPK, seria capaz de ativar mecanismos de retroalimentação para redução da proliferação celular, fazendo com que aumentasse a expressão de PTEN, como discutimos acima. Provavelmente tal aumento somente não ocorreria caso houvesse mutação ou inativação do gene.

Encontramos uma forte correlação entre a expressão de RA e a positividade de AKT ( $p=0,004$ ) e estes dados são coincidentes com outros da literatura<sup>[117]</sup>. Lin et al.<sup>[122]</sup> demonstraram que a fosforilação do RA através de AKT fosforilada inativa a apoptose induzida pelo RA resultando em um aumento da sobrevivência celular.

RA pertence à família dos receptores de esteróides sexuais nucleares<sup>[22]</sup> e está expresso em mais de 70% de todos os tumores de mama, com índices de positividade iguais ou maiores aos valores de RE e RP<sup>[20-22]</sup>. Além disso, quase 50% dos tumores de mama RE negativos expressam RA e este chega a ser o único receptor hormonal presente em até 25% dos tumores de mama metastáticos<sup>[21]</sup>. RA representa importante alvo terapêutico no tratamento de tumores de próstata, porém, no que diz respeito aos tumores de mama, sua utilidade tem sido bastante limitada não somente pela ampla e eficaz utilização de terapias anti-estrogênicas, mas também pelo pequeno número de estudos relacionados ao seu funcionamento e potencial utilidade na terapêutica dos carcinomas mamários.

Coincidentemente com a literatura<sup>[21, 103, 123, 124]</sup>, 85,6% dos tumores avaliados em nosso estudo expressaram positividade para RA e sua expressão esteve relacionada à expressão de RE e RP. Ou seja, 48/50 e 33/34 dos tumores com positividade para RE e RP respectivamente, apresentaram expressão de RA ( $p=0,008$  e  $0,042$ ).

Características clinicopatológicas mais favoráveis tais como menor grau histológico e menores índices de Ki-67 foram observados nas amostras tumorais com expressão de RA avaliadas neste estudo. Niemeier et al. <sup>[123]</sup>, observaram que os tumores com positividade para RA apresentaram menor tamanho tumoral, melhor diferenciação histológica e menor probabilidade de comprometimento linfonodal e estes achados ocorreram tanto nos tumores RE positivos quanto nos tumores RE negativos.

A presença da expressão de RA em tumores RE negativos tem significativa importância prognóstica. Farmer et al.<sup>[19]</sup> recentemente identificaram um grupo de tumores de mama que se caracterizou por expressar RA, serem negativos para RE e RP e que apresentaram como principal alteração genética a amplificação de HER-2<sup>[17, 18]</sup>. A este grupo de tumores denominou “carcinomas apócrinos moleculares”. Em estudo conduzido por Bhargava et al.<sup>[17]</sup> um dos principais achados foi a marcante presença de diferenciação apócrina nos tumores positivos para HER-2 e a observação de que o grau de diferenciação apócrina foi inversamente proporcional à expressão de RE no tecido tumoral. Em outro estudo, Sapp et al.<sup>[125]</sup> relataram que a diferenciação apócrina está relacionada com a expressão de RA e que o grau de diferenciação do carcinoma apócrino se relaciona diretamente com a perda de expressão de RE e RP. Esses resultados sugerem que a agressividade do fenótipo apócrino se relaciona com a perda de expressão de RE. Nossos resultados concordam com os estudos citados acima, pois os tumores de nossa amostra apresentaram, em sua maioria, morfologia apócrina (71/104; 68,3%) e esta característica esteve fortemente relacionada com alto grau histológico e nuclear ( $p=0,004$  e  $<0,0001$ ; respectivamente). A expressão do RA foi o fator mais importante na determinação da atividade proliferativa, como já pudemos demonstrar previamente<sup>[126]</sup>. No modelo que testamos com o conjunto das variáveis estudadas (RA, PTEN, AKT, RE e o fenótipo morfológico apócrino), a alta atividade proliferativa esteve relacionada somente ao RA. Nesta análise, a negatividade da AKT indicou menor atividade proliferativa e contribuiu para o modelo preditivo.

Embora o número de casos avaliados neste estudo seja pequeno, nossos resultados preliminares sugerem que a expressão de RA confere características clínicas e anátomopatológicas mais favoráveis aos tumores de mama HER-2 positivos e, para que isso ocorra, é necessário a co-expressão de RE. Por outro lado, se há perda da expressão de RE, resultando em perfil molecular apócrino (RA positivo /RE negativo) a presença de características morfológicas apócrinas bem como maior grau de agressividade tumoral é evidente. Neste contexto, estudos pré-clínicos têm demonstrado efeito inibitório de crescimento exercido por androgênios como dehidroepiandrosterona (DHEA) e seu sulfato (SDHEA) em linhas celulares de câncer de mama humano do tipo RE-/RP-/RA+ e que poderiam ser aplicados para os tumores RE-/RA+. No entanto, DHEA estimula o crescimento de linhas celulares RE+<sup>[127]</sup>. Assim, os efeitos destes androgênios diferem de acordo com o *status* hormonal dessas neoplasias e abre nova possibilidade terapêutica hormonal para os tumores RE-/RP- que expressam RA<sup>[123, 127, 128]</sup>.

Desse modo, uma das importantes implicações deste estudo é que a avaliação da expressão de RA, um marcador atualmente pouco utilizado nos tumores de mama, em associação com a avaliação dos marcadores já classicamente utilizados (RE, RP e HER-2), pode ser de grande utilidade clínica, pois abre a possibilidade de terapia hormonal para este grupo de tumores antes excluídos desta abordagem terapêutica.

Uma dificuldade que encontramos neste estudo foi a realização do seguimento das pacientes. O estudo foi retrospectivo, com levantamento dos resultados anatomopatológicos realizados na Consultoria em Patologia,

Botucatu (SP) no período de março de 2007 a dezembro de 2008. Consultoria em Patologia é um laboratório de referência no Brasil que recebe aproximadamente 6000 espécimes de mama por ano, provenientes das diversas regiões do país. Os contatos de cada paciente foram adquiridos à partir de buscas no banco de dados do laboratório de patologia do hospital ou instituição de origem da amostra em questão. Sendo assim, cadastros desatualizados, falta de registro da paciente em banco de dados informatizado e números de telefones inexistentes, foram algumas das dificuldades que encontramos para o seguimento dessas pacientes. Isso explica os modestos 55 casos seguidos e muito provavelmente essa seja a razão de as curvas de sobrevida não terem alcançado significância estatística para nenhuma das variáveis estudadas. Apesar disso, uma tendência a maior ocorrência de eventos desfavoráveis foi observada para os casos com AKT positivo e RA negativo nos primeiros cinco meses de seguimento quando comparados com os casos AKT negativos e RA positivos, respectivamente. Esses dados são coincidentes com a literatura<sup>[21, 56, 103, 108, 117, 124]</sup>.

Em conclusão, a ativação da via PI3K/AKT pode se dar por mecanismos que vão além do estímulo desencadeado pela união do fator de crescimento ao receptor com atividade tirosino-quinase. A expressão de PTEN nos tumores de mama que exibem maior atividade proliferativa pode estar relacionada a um mecanismo de compensação que tem por objetivo o controle da proliferação celular, e a avaliação da expressão de RA nos tumores de mama pode ser de grande utilidade clínica, pois abre a

possibilidade de terapia hormonal para o grupo de tumores negativos para RE e RP, atualmente excluídos desta possibilidade terapêutica.

## 7. CONCLUSÕES


1. A perda da expressão imunohistoquímica do PTEN foi observada em aproximadamente 20% dos casos, enquanto que AKT-fosforilada mostrou expressão em 68,3% dos casos avaliados. Já o receptor de androgênio apresentou expressão imunohistoquímica em pouco menos de 90% da amostra estudada.
2. Os tumores que apresentaram expressão de PTEN em 100% das células mostraram significativa associação com maiores índices de proliferação celular, além de apresentarem tendência a correlação com a expressão de AKT. A expressão de AKT-fosforilada se associou a grau histológico mais diferenciado e expressão de receptor de androgênio, além de uma tendência a associação com a expressão do RE ( $p=0,065$ ). Quanto ao receptor de androgênio, houve associação com a expressão dos receptores de estrogênio e progesterona. Não houve associação estatisticamente significativa com a expressão destes marcadores e as demais características clinicopatológicas estudadas.
3. Características morfológicas apócrinas foram identificadas em 71/104 (68,3%) dos casos e se associaram a alto grau histológico e nuclear. Não houve associação significativa com as demais características clinicopatológicas.

4. Na análise multivariada, a atividade proliferativa dos tumores esteve associada a expressão de AKT e negatividade do receptor de androgênio.



## 8. ANEXOS

### Anexo 1

 Hospital das Clínicas da FMUSP  
Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa  
**CAPPesq**

**Nº Protocolo:** 0756/08

**Título:** "Avaliação Da Expressão Imunoistoquímica Coordenada De Pten, Pi3k E Akt Em Carcinomas De Mama Her-2 Positivos"

**Pesquisador Responsável:** Filomena Marino Carvalho

**Pesquisador Executante:** Francini de Mattos Lima Santos

**Finalidade Acadêmica:** Mestrado

**Departamento:** Obstetrícia E Ginecologia

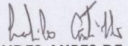
A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, **APROVOU / TOMOU CIÊNCIA** na sessão datada de 27/07/2011, do(s) documento(s) abaixo mencionado(s):

• **Carta datada de 25/04/11 - Modificações no projeto (inclusão de análise da expressão de receptor de androgênio por imunoistoquímica e aumento de casos na casuística original); Relatório parcial.**

A CAPPesq em obediência à Resolução CNS 196/96, solicita ao pesquisador (a) s elaboração de relatório parcial e final.

No caso de relatório parcial é necessário informar o tempo previsto para a conclusão do protocolo e breve resumo dos resultados obtidos.

CAPPesq, 28 de Julho de 2011

  
**PROF. DR. EUCLIDES AYRES DE CASTILHO**  
Coordenador  
Comissão de Ética para Análise de  
Projetos de Pesquisa - CAPPesq

Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 - Prédio da Administração - 5º andar - CEP 05403-010 - São Paulo - SP.  
Fone: 55 11 3069-6442 ramais 16, 17, 18 e 20 - e-mail: [cappesq@hcnet.usp.br](mailto:cappesq@hcnet.usp.br)



## REFERÊNCIAS<sup>2</sup>

1. Ellis, I.O., et al., *Tumours of the Breast*, in *Pathology & Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs*, F.A. Tavassoli and P. Devilee, Editors. 2003, IARC Press: Lyon. p. 9 - 112.
2. Siegel, R., D. Naishadham, and A. Jemal, *Cancer statistics, 2012*. CA Cancer J Clin, 2012. **62**(1): p. 10-29.
3. *Estimativa da Incidência da Mortalidade por Câncer de Mama no Brasil 2012*. 2012.
4. *Familial breast cancer: collaborative reanalysis of individual data from 52 epidemiological studies including 58,209 women with breast cancer and 101,986 women without the disease*. Lancet, 2001. **358**(9291): p. 1389-99.
5. Veronesi, U., et al., *Breast cancer*. Lancet, 2005. **365**(9472): p. 1727-41.
6. Carter, C.L., C. Allen, and D.E. Henson, *Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases*. Cancer, 1989. **63**(1): p. 181-7.
7. Ravdin, P.M. and G.C. Chamness, *The c-erbB-2 proto-oncogene as a prognostic and predictive marker in breast cancer: a paradigm for the development of other macromolecular markers--a review*. Gene, 1995. **159**(1): p. 19-27.
8. Slamon, D.J., et al., *Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene*. Science, 1987. **235**(4785): p. 177-82.
9. Slamon, D.J., et al., *Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer*. Science, 1989. **244**(4905): p. 707-12.

---

<sup>2</sup> De acordo com:

Adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).  
 Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias da FMUSP*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia A.L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de S. Aragão, Suely C. Cardoso, Valéria Vilhena. 2a ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.  
 Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

10. Joensuu, H., et al., *Adjuvant docetaxel or vinorelbine with or without trastuzumab for breast cancer*. N Engl J Med, 2006. **354**(8): p. 809-20.
11. Piccart-Gebhart, M.J., et al., *Trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1659-72.
12. Romond, E.H., et al., *Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer*. N Engl J Med, 2005. **353**(16): p. 1673-84.
13. Fujita, T., et al., *PTEN activity could be a predictive marker of trastuzumab efficacy in the treatment of ErbB2-overexpressing breast cancer*. Br J Cancer, 2006. **94**(2): p. 247-52.
14. Calabrich, A., S. Fernandes Gdos, and A. Katz, *Trastuzumab: mechanisms of resistance and therapeutic opportunities*. Oncology (Williston Park), 2008. **22**(11): p. 1250-8; discussion 1259, 1263.
15. Jones, K.L. and A.U. Buzdar, *Evolving novel anti-HER2 strategies*. Lancet Oncol, 2009. **10**(12): p. 1179-87.
16. Barros, F.F., et al., *Understanding the HER family in breast cancer: interaction with ligands, dimerization and treatments*. Histopathology, 2010. **56**(5): p. 560-72.
17. Bhargava, R., et al., *Breast cancer molecular class ERBB2: preponderance of tumors with apocrine differentiation and expression of basal phenotype markers CK5, CK5/6, and EGFR*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2010. **18**(2): p. 113-8.
18. Banneau, G., et al., *Molecular apocrine differentiation is a common feature of breast cancer in patients with germline PTEN mutations*. Breast Cancer Res, 2010. **12**(4): p. R63.
19. Farmer, P., et al., *Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis*. Oncogene, 2005. **24**(29): p. 4660-71.
20. Suzuki, T., et al., *Androgens in human breast carcinoma*. Med Mol Morphol, 2010. **43**(2): p. 75-81.
21. Yu, Q., et al., *Expression of androgen receptor in breast cancer and its significance as a prognostic factor*. Ann Oncol, 2010.

22. Park, S., et al., *Expression of androgen receptors in primary breast cancer*. Ann Oncol, 2010. **21**(3): p. 488-92.
23. Rowland, J.H. and M.J. Massie, *Questões Psicossociais e Intervenções.*, in *Doenças da Mama.*, J.R. Harris, et al., Editors. 2002, MEDSI Editora Médica e Científica Ltda: Rio de Janeiro. p. 1207 - 1235.
24. Veronesi, U. and S. Zurrada, *Breast conservation: current results and future perspectives at the European Institute of Oncology*. Int J Cancer, 2007. **120**(7): p. 1381-6.
25. Giuliano, A.E., et al., *Axillary dissection vs no axillary dissection in women with invasive breast cancer and sentinel node metastasis: a randomized clinical trial*. Jama, 2011. **305**(6): p. 569-75.
26. van 't Veer, L.J., et al., *Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer*. Nature, 2002. **415**(6871): p. 530-6.
27. Brenton, J.D., et al., *Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application?* J Clin Oncol, 2005. **23**(29): p. 7350-60.
28. Sorlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(19): p. 10869-74.
29. Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours*. Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.
30. van de Rijn, M., et al., *Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome*. Am J Pathol, 2002. **161**(6): p. 1991-6.
31. Nielsen, T.O., et al., *Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(16): p. 5367-74.
32. Hugh, J., et al., *Breast cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use of an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial*. J Clin Oncol, 2009. **27**(8): p. 1168-76.
33. Cheang, M.C., et al., *Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer*. J Natl Cancer Inst, 2009. **101**(10): p. 736-50.

34. Kouros-Mehr, H., et al., *GATA-3 and the regulation of the mammary luminal cell fate*. *Curr Opin Cell Biol*, 2008. **20**(2): p. 164-70.
35. van't Veer, L.J., S. Paik, and D.F. Hayes, *Gene expression profiling of breast cancer: a new tumor marker*. *J Clin Oncol*, 2005. **23**(8): p. 1631-5.
36. Livasy, C.A., et al., *Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma*. *Mod Pathol*, 2006. **19**(2): p. 264-71.
37. Perou, C.M., *Molecular stratification of triple-negative breast cancers*. *Oncologist*, 2011. **16 Suppl 1**: p. 61-70.
38. Kreike, B., et al., *Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas*. *Breast Cancer Res*, 2007. **9**(5): p. R65.
39. Mackay, A., et al., *Microarray-based class discovery for molecular classification of breast cancer: analysis of interobserver agreement*. *J Natl Cancer Inst*, 2011. **103**(8): p. 662-73.
40. Parker, J.S., et al., *Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes*. *J Clin Oncol*, 2009. **27**(8): p. 1160-7.
41. Bu, W., et al., *Keratin 6a marks mammary bipotential progenitor cells that can give rise to a unique tumor model resembling human normal-like breast cancer*. *Oncogene*, 2011. **30**(43): p. 4399-409.
42. Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study*. *Jama*, 2006. **295**(21): p. 2492-502.
43. Bhargava, R., et al., *Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy: a single institutional experience with 359 cases*. *Cancer*, 2010. **116**(6): p. 1431-9.
44. Staaf, J., et al., *Identification of subtypes in human epidermal growth factor receptor 2--positive breast cancer reveals a gene signature prognostic of outcome*. *J Clin Oncol*, 2010. **28**(11): p. 1813-20.
45. Ricardo, S.A., et al., *HER2 evaluation using the novel rabbit monoclonal antibody SP3 and CISH in tissue microarrays of invasive breast carcinomas*. *J Clin Pathol*, 2007. **60**(9): p. 1001-5.

46. Shah, S. and B. Chen, *Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution*. Patholog Res Int, 2011. **2011**: p. 903202.
47. Dowsett, M., et al., *Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how?* Eur J Cancer, 2000. **36**(2): p. 170-6.
48. Wolff, A.C., et al., *American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(1): p. 118-45.
49. Wludarski, S.C.L., *Comparação dos resultados de marcadores prognósticos e preditivos (HER2 e receptores de estrógenos e progesterona) para carcinoma de mama entre laboratórios locais e de referência no Brasil [tese]*. Local (São Paulo): Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2010.
50. Hanna, W., et al., *Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer*. Curr Oncol, 2007. **14**(4): p. 149-53.
51. Cox, M.C., W.D. Figg, and P.W. Thurman, *No rational theory for drug pricing*. J Clin Oncol, 2004. **22**(5): p. 962-3.
52. Liberato, N.L., M. Marchetti, and G. Barosi, *Cost effectiveness of adjuvant trastuzumab in human epidermal growth factor receptor 2-positive breast cancer*. J Clin Oncol, 2007. **25**(6): p. 625-33.
53. Matter-Walstra, K.W., et al., *Trastuzumab beyond progression: a cost-utility analysis*. Ann Oncol, 2010. **21**(11): p. 2161-8.
54. Tan-Chiu, E., et al., *Assessment of cardiac dysfunction in a randomized trial comparing doxorubicin and cyclophosphamide followed by paclitaxel, with or without trastuzumab as adjuvant therapy in node-positive, human epidermal growth factor receptor 2-overexpressing breast cancer: NSABP B-31*. J Clin Oncol, 2005. **23**(31): p. 7811-9.
55. Martin, M., et al., *Minimizing cardiotoxicity while optimizing treatment efficacy with trastuzumab: review and expert recommendations*. Oncologist, 2009. **14**(1): p. 1-11.

56. Gori, S., et al., *EGFR, pMAPK, pAkt and PTEN status by immunohistochemistry: correlation with clinical outcome in HER2-positive metastatic breast cancer patients treated with trastuzumab*. *Ann Oncol*, 2009. **20**(4): p. 648-54.
57. Dillon, R.L., D.E. White, and W.J. Muller, *The phosphatidyl inositol 3-kinase signaling network: implications for human breast cancer*. *Oncogene*, 2007. **26**(9): p. 1338-45.
58. Saal, L.H., et al., *Poor prognosis in carcinoma is associated with a gene expression signature of aberrant PTEN tumor suppressor pathway activity*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2007. **104**(18): p. 7564-9.
59. Tokunaga, E., et al., *Coexistence of the loss of heterozygosity at the PTEN locus and HER2 overexpression enhances the Akt activity thus leading to a negative progesterone receptor expression in breast carcinoma*. *Breast Cancer Res Treat*, 2007. **101**(3): p. 249-57.
60. Beatson, G., *On the treatment of inoperable cases of carcinoma of the mamma: suggestions for a new method of treatment, with illustrative cases*. *The Lancet*, 1896. **148**: p. 104-07.
61. Giuliani, R., et al., *Phosphorylated HER-2 tyrosine kinase and Her-2/neu gene amplification as predictive factors of response to trastuzumab in patients with HER-2 overexpressing metastatic breast cancer (MBC)*. *Eur J Cancer*, 2007. **43**(4): p. 725-35.
62. Slamon, D.J., et al., *Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2*. *N Engl J Med*, 2001. **344**(11): p. 783-92.
63. Vogel, C.L., et al., *Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2002. **20**(3): p. 719-26.
64. Hammond, M.E., D.F. Hayes, and A.C. Wolff, *Clinical Notice for American Society of Clinical Oncology-College of American Pathologists guideline recommendations on ER/PgR and HER2 testing in breast cancer*. *J Clin Oncol*, 2011. **29**(15): p. e458.



65. Capelan, M., et al., *Pertuzumab: new hope for patients with HER2-positive breast cancer*. Ann Oncol, 2012.
66. Cho, H.S., et al., *Structure of the extracellular region of HER2 alone and in complex with the Herceptin Fab*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 756-60.
67. Kristjansdottir, K. and D. Dizon, *HER-dimerization inhibitors: evaluating pertuzumab in women's cancers*. Expert Opin Biol Ther, 2010. **10**(2): p. 243-50.
68. Baselga, J., et al., *Pertuzumab plus trastuzumab plus docetaxel for metastatic breast cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(2): p. 109-19.
69. Vogel, C., et al., *Management of ErbB2-positive Breast Cancer: Insights from Preclinical and Clinical Studies with Lapatinib*. Jpn J Clin Oncol, 2010.
70. Blackwell, K.L., et al., *Randomized study of Lapatinib alone or in combination with trastuzumab in women with ErbB2-positive, trastuzumab-refractory metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2010. **28**(7): p. 1124-30.
71. deGraffenried, L.A., et al., *Inhibition of mTOR activity restores tamoxifen response in breast cancer cells with aberrant Akt Activity*. Clin Cancer Res, 2004. **10**(23): p. 8059-67.
72. Mita, M.M., A. Mita, and E.K. Rowinsky, *Mammalian target of rapamycin: a new molecular target for breast cancer*. Clin Breast Cancer, 2003. **4**(2): p. 126-37.
73. Di Cosimo, S., *Controversies in breast cancer: the mammalian target of rapamycin as a target for breast cancer therapy*. Breast Cancer Res, 2009. **11 Suppl 3**: p. S25.
74. Baselga, J., et al., *Phase II randomized study of neoadjuvant everolimus plus letrozole compared with placebo plus letrozole in patients with estrogen receptor-positive breast cancer*. J Clin Oncol, 2009. **27**(16): p. 2630-7.
75. Chan, S., et al., *Phase II study of temsirolimus (CCI-779), a novel inhibitor of mTOR, in heavily pretreated patients with locally advanced or metastatic breast cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(23): p. 5314-22.
76. Baselga, J., et al., *Everolimus in postmenopausal hormone-receptor-positive advanced breast cancer*. N Engl J Med, 2012. **366**(6): p. 520-9.

77. Carraway, K.L., et al., *Muc4/sialomucin complex in the mammary gland and breast cancer*. J Mammary Gland Biol Neoplasia, 2001. **6**(3): p. 323-37.
78. Hynes, N.E. and J.H. Dey, *PI3K inhibition overcomes trastuzumab resistance: blockade of ErbB2/ErbB3 is not always enough*. Cancer Cell, 2009. **15**(5): p. 353-5.
79. Berns, K., et al., *A functional genetic approach identifies the PI3K pathway as a major determinant of trastuzumab resistance in breast cancer*. Cancer Cell, 2007. **12**(4): p. 395-402.
80. Hanahan, D. and R.A. Weinberg, *The hallmarks of cancer*. Cell, 2000. **100**(1): p. 57-70.
81. Lee, J.W., et al., *PIK3CA gene is frequently mutated in breast carcinomas and hepatocellular carcinomas*. Oncogene, 2005. **24**(8): p. 1477-80.
82. Diehl, J.A., et al., *Glycogen synthase kinase-3beta regulates cyclin D1 proteolysis and subcellular localization*. Genes Dev, 1998. **12**(22): p. 3499-511.
83. Zhou, B.P., et al., *Cytoplasmic localization of p21Cip1/WAF1 by Akt-induced phosphorylation in HER-2/neu-overexpressing cells*. Nat Cell Biol, 2001. **3**(3): p. 245-52.
84. Viglietto, G., et al., *Cytoplasmic relocation and inhibition of the cyclin-dependent kinase inhibitor p27(Kip1) by PKB/Akt-mediated phosphorylation in breast cancer*. Nat Med, 2002. **8**(10): p. 1136-44.
85. Datta, S.R., et al., *Akt phosphorylation of BAD couples survival signals to the cell-intrinsic death machinery*. Cell, 1997. **91**(2): p. 231-41.
86. del Peso, L., et al., *Interleukin-3-induced phosphorylation of BAD through the protein kinase Akt*. Science, 1997. **278**(5338): p. 687-9.
87. Brunet, A., et al., *Akt promotes cell survival by phosphorylating and inhibiting a Forkhead transcription factor*. Cell, 1999. **96**(6): p. 857-68.
88. Li, W. and B.E. Sumpio, *Strain-induced vascular endothelial cell proliferation requires PI3K-dependent mTOR-4E-BP1 signal pathway*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2005. **288**(4): p. H1591-7.
89. Hennessy, B.T., et al., *Exploiting the PI3K/AKT pathway for cancer drug discovery*. Nat Rev Drug Discov, 2005. **4**(12): p. 988-1004.

90. Bachman, K.E., et al., *The PIK3CA gene is mutated with high frequency in human breast cancers*. *Cancer Biol Ther*, 2004. **3**(8): p. 772-5.
91. Samuels, Y. and V.E. Velculescu, *Oncogenic mutations of PIK3CA in human cancers*. *Cell Cycle*, 2004. **3**(10): p. 1221-4.
92. Kang, S., A.G. Bader, and P.K. Vogt, *Phosphatidylinositol 3-kinase mutations identified in human cancer are oncogenic*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2005. **102**(3): p. 802-7.
93. Saal, L.H., et al., *PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma*. *Cancer Res*, 2005. **65**(7): p. 2554-9.
94. Dahia, P.L., et al., *Somatic deletions and mutations in the Cowden disease gene, PTEN, in sporadic thyroid tumors*. *Cancer Res*, 1997. **57**(21): p. 4710-3.
95. Liaw, D., et al., *Germline mutations of the PTEN gene in Cowden disease, an inherited breast and thyroid cancer syndrome*. *Nat Genet*, 1997. **16**(1): p. 64-7.
96. Nelen, M.R., et al., *Germline mutations in the PTEN/MMAC1 gene in patients with Cowden disease*. *Hum Mol Genet*, 1997. **6**(8): p. 1383-7.
97. Rhei, E., et al., *Mutation analysis of the putative tumor suppressor gene PTEN/MMAC1 in primary breast carcinomas*. *Cancer Res*, 1997. **57**(17): p. 3657-9.
98. Steck, P.A., et al., *Identification of a candidate tumour suppressor gene, MMAC1, at chromosome 10q23.3 that is mutated in multiple advanced cancers*. *Nat Genet*, 1997. **15**(4): p. 356-62.
99. Teng, D.H., et al., *MMAC1/PTEN mutations in primary tumor specimens and tumor cell lines*. *Cancer Res*, 1997. **57**(23): p. 5221-5.
100. Garcia, J.M., et al., *Allelic loss of the PTEN region (10q23) in breast carcinomas of poor pathophenotype*. *Breast Cancer Res Treat*, 1999. **57**(3): p. 237-43.
101. Minobe, K., et al., *Somatic mutation of the PTEN/MMAC1 gene in breast cancers with microsatellite instability*. *Cancer Lett*, 1999. **144**(1): p. 9-16.
102. Sakr, R.A., et al., *Protocol for PTEN expression by immunohistochemistry in formalin-fixed paraffin-embedded human breast carcinoma*. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2010. **18**(4): p. 371-4.

103. Micello, D., et al., *Androgen receptor is frequently expressed in HER2-positive, ER/PR-negative breast cancers*. Virchows Arch, 2010. **457**(4): p. 467-76.
104. Elston, C.W. and I.O. Ellis, *Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up*. Histopathology, 1991. **19**(5): p. 403-10.
105. Nagata, Y., et al., *PTEN activation contributes to tumor inhibition by trastuzumab, and loss of PTEN predicts trastuzumab resistance in patients*. Cancer Cell, 2004. **6**(2): p. 117-27.
106. Bakarakos, P., et al., *Immunohistochemical study of PTEN and phosphorylated mTOR proteins in familial and sporadic invasive breast carcinomas*. Histopathology, 2010. **56**(7): p. 876-82.
107. Capodanno, A., et al., *Dysregulated PI3K/Akt/PTEN pathway is a marker of a short disease-free survival in node-negative breast carcinoma*. Hum Pathol, 2009. **40**(10): p. 1408-17.
108. Panigrahi, A.R., et al., *The role of PTEN and its signalling pathways, including AKT, in breast cancer; an assessment of relationships with other prognostic factors and with outcome*. J Pathol, 2004. **204**(1): p. 93-100.
109. Lee, J.S., et al., *Reduced PTEN expression is associated with poor outcome and angiogenesis in invasive ductal carcinoma of the breast*. Appl Immunohistochem Mol Morphol, 2004. **12**(3): p. 205-10.
110. Bose, S., et al., *Reduced expression of PTEN correlates with breast cancer progression*. Hum Pathol, 2002. **33**(4): p. 405-9.
111. Hollander, M.C., G.M. Blumenthal, and P.A. Dennis, *PTEN loss in the continuum of common cancers, rare syndromes and mouse models*. Nat Rev Cancer, 2011. **11**(4): p. 289-301.
112. Depowski, P.L., S.I. Rosenthal, and J.S. Ross, *Loss of expression of the PTEN gene protein product is associated with poor outcome in breast cancer*. Mod Pathol, 2001. **14**(7): p. 672-6.
113. Hemel, D. and S.M. Domchek, *Breast cancer predisposition syndromes*. Hematol Oncol Clin North Am, 2010. **24**(5): p. 799-814.

114. Perez-Tenorio, G., et al., *PIK3CA mutations and PTEN loss correlate with similar prognostic factors and are not mutually exclusive in breast cancer*. Clin Cancer Res, 2007. **13**(12): p. 3577-84.
115. Perren, A., et al., *Immunohistochemical evidence of loss of PTEN expression in primary ductal adenocarcinomas of the breast*. Am J Pathol, 1999. **155**(4): p. 1253-60.
116. Mutter, G.L., et al., *Changes in endometrial PTEN expression throughout the human menstrual cycle*. J Clin Endocrinol Metab, 2000. **85**(6): p. 2334-8.
117. Aleskandarany, M.A., et al., *Clinicopathologic and molecular significance of phospho-Akt expression in early invasive breast cancer*. Breast Cancer Res Treat, 2011. **127**(2): p. 407-16.
118. Bose, S., et al., *The Akt pathway in human breast cancer: a tissue-array-based analysis*. Mod Pathol, 2006. **19**(2): p. 238-45.
119. Gershtein, E.S., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase/AKT signalling pathway components in human breast cancer: clinicopathological correlations*. Anticancer Res, 2007. **27**(4A): p. 1777-82.
120. Florena, A.M., et al., *Associations between Notch-2, Akt-1 and HER2/neu expression in invasive human breast cancer: a tissue microarray immunophenotypic analysis on 98 patients*. Pathobiology, 2007. **74**(6): p. 317-22.
121. Stoica, G.E., et al., *Estradiol rapidly activates Akt via the ErbB2 signaling pathway*. Mol Endocrinol, 2003. **17**(5): p. 818-30.
122. Lin, H.K., et al., *Akt suppresses androgen-induced apoptosis by phosphorylating and inhibiting androgen receptor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(13): p. 7200-5.
123. Niemeier, L.A., et al., *Androgen receptor in breast cancer: expression in estrogen receptor-positive tumors and in estrogen receptor-negative tumors with apocrine differentiation*. Mod Pathol, 2010. **23**(2): p. 205-12.
124. Peters, A.A., et al., *Androgen receptor inhibits estrogen receptor-alpha activity and is prognostic in breast cancer*. Cancer Res, 2009. **69**(15): p. 6131-40.
125. Sapp, M., A. Malik, and W. Hanna, *Hormone receptor profile of apocrine lesions of the breast*. Breast J, 2003. **9**(4): p. 335-6.

126. Lin Fde, M., et al., *Coordinated expression of oestrogen and androgen receptors in HER2-positive breast carcinomas: impact on proliferative activity*. J Clin Pathol, 2012. **65**(1): p. 64-8.
127. Nahleh, Z., *Androgen receptor as a target for the treatment of hormone receptor-negative breast cancer: an uncharted territory*. Future Oncol, 2008. **4**(1): p. 15-21.
128. Suzuki, T., et al., *Aromatase in human breast carcinoma as a key regulator of intratumoral sex steroid concentrations*. Endocr J, 2008. **55**(3): p. 455-63.