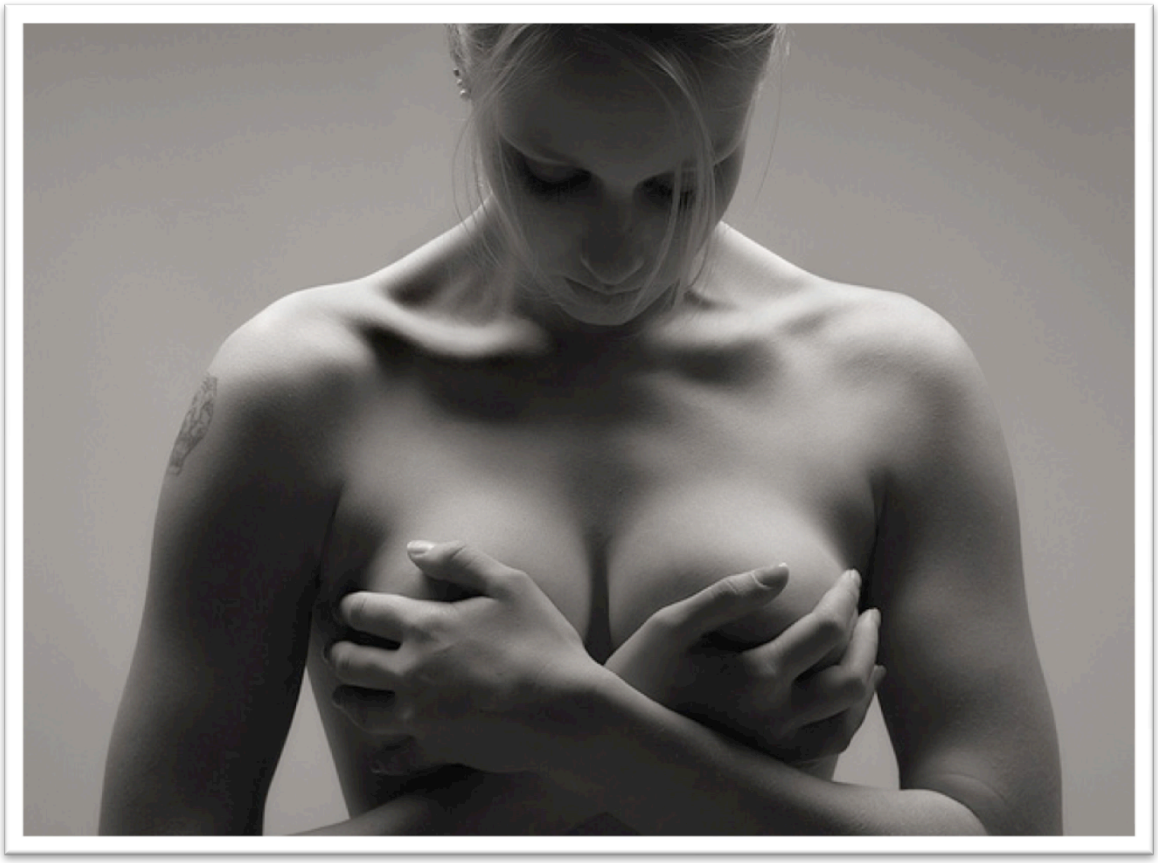
Gil Filipe Ramada Faria

Factores moleculares de prognóstico na recidiva loco-regional do cancro da mama.

Dissertação de Candidatura ao Grau de Mestre apresentada à
Faculdade de Medicina da Universidade do Porto



Mestrado em Medicina e Oncologia Molecular

Porto | 2009

Esta dissertação representa apenas o culminar de um árduo trabalho, desenvolvido ao longo dos últimos 3 anos, na avaliação dos factores moleculares de prognóstico na recidiva loco-regional do cancro da mama.

A necessidade de compreender o mundo em seu redor e a curiosidade natural da espécie humana, levou-nos desde cedo a "investigar" as relações biológicas e sociais. Ainda hoje, para que um médico se sinta completo na sua actividade profissional, é necessário que possa dar o seu humilde contributo para o avanço do conhecimento.

Este projecto, permitiu-me crescer enquanto médico, amadurecer como cirurgião e acima de tudo, melhorar como Homem. Contudo, tal não seria possível sem a inestimável ajuda, colaboração e amizade de todos quantos participaram neste projecto. Não posso deixar de referir alguns nomes em particular, pelo que gostaria de agradecer publicamente:

Ao Prof. Doutor Cardoso de Oliveira, pelos desafios constantes e pelos incondicionais votos de confiança com que sempre me brindou e ao Prof. Doutor Amadeu Pimenta, por ter permitido e incentivado a continuidade deste projecto;

À Prof. Doutora Maria João Cardoso, minha orientadora, pela paciência, tolerância e preserverança, mas principalmente pela maestria com que me guiou ao longo deste caminho;

À Dra. Isabel Amendoeira, pelo rigor científico e metodológico e pela ajuda a encontrar o "rumo";

À Dra. Diana Martins, pela extrema disponibilidade, simpatia e boa disposição e pela imprescindível realização dos "Tissue Micro-Arrays";

Ao Dr. Herberto Bettencourt, além da amizade pessoal, pela inestimável ajuda na recolha dos dados patológicos;

À Dra. Cristina Davila pelas horas intermináveis, que graciosamente dispendeu na recolha de dados oncológicos;

Ao Dr. Fernando Osório e à Dra. Susy Costa, pela ajuda desinteressada na recolha de dados clínicos;

Acima de tudo, ao Prof. Doutor Fernando Schmitt, pelo exemplo de rigor e profissionalismo, pela excelência do seu trabalho científico associada a uma disponibilidade inigualável, pela crítica construtiva, pela amabilidade do trato, pela análise dos TMA's e por toda a sua ajuda, sem a qual este projecto nunca teria sido possível.

Aos meus pais pela estabilidade familiar e apoio incondicional
e à Cecília... por ser a outra metade de mim.

Gil Faria | 2009

Resumo

INTRODUÇÃO – O cancro da mama é o tumor maligno mais frequente nas mulheres, sendo a primeira causa de morte no sexo feminino. A sua taxa de incidência tem vido a aumentar na maioria dos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento, mas dadas as melhorias no tratamento disponível e os programas de rastreio, a sobrevivência tem aumentado em todos os países desenvolvidos.

A recidiva loco-regional do cancro da mama é uma preocupação frequente no tratamento desta doença porque é um factor de risco independente, para metastização à distância e morte. O controlo da recidiva local tem sido associado a redução da metastização à distância e a melhoria da sobrevivência relativa.

O tamanho do tumor, o estadiamento ganglionar e o grau histológico têm sido descritos como os factores mais importantes para a sobrevivência a longo prazo. A P-caderina, foi já identificada como um factor independente de mau prognóstico no cancro da mama. A presença de Osteopontina no estroma do cancro da mama é associada à expressão de um grupo de genes associados a pior prognóstico. Nos doentes com cancro da mama, a proliferação celular está inversamente relacionada com a sobrevivência.

Existe uma variação significativa de prognóstico entre doentes com o mesmo estadiamento da doença e com expressão semelhante de um grupo de marcadores moleculares.

Assim, surge como necessidade a investigação dos "factores de risco" para recidiva loco-regional e a sua relação com o prognóstico das doentes.

MATERIAL E MÉTODOS – Analisamos os registos clínicos de 1432 doentes tratadas no Hospital de São João por cancro da mama num período de 10 anos, seleccionando um grupo de 101 doentes (7%) com evidência de recidiva loco-regional sem evidência de recidiva prévia à distância. Para grupo de controlo, seleccionamos um grupo de doentes com >10 anos de follow-up, sem evidência de progressão da doença oncológica (recidiva loco-regional ou à distância). Após aplicação dos critérios de exclusão, o grupo final de análise, constituiu-se por 70 doentes (69,3% do grupo inicial) com recidiva loco-regional (casos) e 52 doentes (56,5% do grupo inicial) sem sinais clínicos e imagiológicos de recidiva da doença (controlos).

RESULTADOS – O tempo médio decorrido entre a cirurgia do tumor primário e a recidiva foi de 41 meses, o tempo médio de sobrevivência após recidiva foi de 33 meses e a sobrevivência aos 5 anos foi de 55%. Em análise multivariada da sobrevivência livre de doença, o tamanho do tumor, a invasão ganglionar, o grau histológico e a expressão de P-caderina surgiram como factores de prognóstico independentes.

A expressão aberrante de P-caderina, associou-se a graus histológicos mais elevados e a negatividade para receptores de estrogéneos; os tumores que expressam Osteopontina, têm estadios mais avançados à data de diagnóstico; o índice proliferativo, aparece associado a graus histológicos mais elevados e a tumores negativos para receptores de estrogéneos.

CONCLUSÃO – A P-caderina e a osteopontina são marcadores promissores relativamente ao risco de progressão loco-regional da doença e poderão no futuro, contribuir para a pesquisa de novas alternativas terapêuticas. No entanto, está ainda por determinar o seu real valor biológico e se tem de facto uma relação independente com o comportamento dos tumores, ou se será apenas um marcador biológico dum conjunto de características clínicas e moleculares associadas a mau prognóstico.

RESUMO 5

INTRODUÇÃO 9

EPIDEMIOLOGIA DO CANCRO DA MAMA. 9

A IMPORTÂNCIA DA RECIDIVA LOCO-REGIONAL 11

SOBREVIDA 12

FACTORES DE PROGNÓSTICO NO CANCRO DA MAMA 13

AVALIAÇÃO DOS FACTORES CLÁSSICOS DE PROGNÓSTICO 13

Idade 13

Tamanho 14

Grau Histológico 14

Estadiamento ganglionar 14

Permeação Linfovascular 15

Outros factores 15

Receptores Hormonais 15

CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR 16

ESTUDOS MOLECULARES 19

P-caderina 19

Osteopontina 21

MIB1 (Ki67) 23

OBJECTIVOS 25

MATERIAL E MÉTODOS 27

ESTADIAMENTO. 28

TRATAMENTO DAS DOENTES PARTICIPANTES NO ESTUDO 29

TISSUE MICRO-ARRAYS 30

Construção de TMA's 31

Imunohistoquímica 31

Critérios de positividade 32

CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR 34

RESULTADOS 36

CARACTERIZAÇÃO DAS DOENTES 36

PADRÃO CLÍNICO-PATOLÓGICO DOS CASOS E DOS CONTROLOS 36

CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR 41

ANÁLISE MULTIVARIADA 41

CARACTERIZAÇÃO DAS RECIDIVAS 41

TISSUE MICRO-ARRAYS E MARCADORES MOLECULARES 43

SOBREVIVÊNCIA LIVRE DE DOENÇA E SOBREVIVÊNCIA GLOBAL 49

ANÁLISE TEMPORAL MULTIVARIADA (REGRESSÃO DE COX) 55

DISCUSSÃO 57

A IMPORTÂNCIA DA RECIDIVA LOCO-REGIONAL 58

FACTORES CLÁSSICOS COM INFLUÊNCIA NA RECIDIVA 59

VALIDAÇÃO DO MÉTODO DE TMA'S NA AMOSTRA. 61

IMPORTÂNCIA DOS FACTORES MOLECULARES 63

Tipos moleculares 63

Tipo Luminal 64

HER2 65

Triplo-negativo 66

P-CADERINA 68

OSTEOPONTINA 70

MIB (KI67) 72

ANÁLISE MULTIVARIADA 73

CONCLUSÃO 75

REFERÊNCIAS 79

ABSTRACT 85

Introdução

Epidemiologia do cancro da mama.

O cancro da mama é o tumor maligno mais frequente nas mulheres, sendo a primeira causa de morte no sexo feminino, com um milhão de casos e meio milhão de mortes anualmente.[1] É responsável por aproximadamente 21% de todos os cancros em mulheres. [2]

A combinação de uma elevada incidência e de um prognóstico favorável, faz com que o cancro da mama seja o tumor com maior prevalência, estimando-se que em todo o mundo se encontrem vivas aproximadamente 4,4 milhões de mulheres a quem foi diagnosticado cancro da mama nos últimos cinco anos.[1]

Além das variações geográficas na incidência do cancro da mama, têm sido detectadas variações ao longo do tempo. A taxa de incidência do cancro da mama tem vido a aumentar na maioria dos países desenvolvidos e em vias de desenvolvimento, e os aumentos têm sido maiores onde as taxas eram previamente mais baixas. Tem havido um aumento anual de 0,5% na taxa de incidência em todo o mundo e estima-se que isto resulte em 1,35 milhões de novos casos no ano de 2010.[2]

A incidência do cancro da mama aumenta rapidamente durante a quarta década de vida. Após a menopausa, continua a aumentar a incidência, embora de forma mais lenta.[3]

O risco individual de uma mulher desenvolver cancro da mama ao longo da sua vida é estimado em 12% (~1 em cada 8 mulheres) e o risco de morte pode ser de até 5% (~1 em cada 20 mulheres).[4]

Nos EUA, a incidência estimada para 2008 foi de 184.450 novos casos de cancro da mama , o que corresponde a 26% de todos os cancros em mulheres e de 40.930 mortes por cancro da mama, o que corresponde a 15% de todas as mortes por cancro no sexo feminino. Estes dados confirmam o cancro da mama como o 1º em incidência no sexo feminino e o 2º em mortalidade, sendo apenas ultrapassado pelo cancro do pulmão.[5]

As taxas de incidência aumentaram continuamente ao longo do século XX e as taxas de doença axilar à data de diagnóstico, começaram a diminuir no final da década de 80.[3] Entre 2001 e 2004, a taxa de incidência do cancro da mama em mulheres diminuiu de forma consistente, cerca de 3,5% ao ano, após terem aumentado desde 1980[5].

Estas alterações provavelmente reflectem por um lado o diagnóstico mais precoce após a introdução dos rastreios sistemáticos e por outro lado, o atingimento de uma fase de saturação ou *plateau* no rastreio mamográfico e a diminuição da terapêutica hormonal de substituição em mulheres pós-menopáusicas. [6]

Na Europa, o cancro da mama é o 3º cancro mais incidente, com 370.000 novos casos por ano (12,8% do total de cancros) e o 4º a nível de mortalidade (com quase 130.000 mortes por ano) [7]

Nos países da União Europeia, estima-se a ocorrência de 135.000 novos casos em cada ano (24% de todos os casos de cancro), sendo responsável por 58.000 mortes (18% de todas as mortes por cancro)[8], ultrapassando o cancro do pulmão em incidência e o cancro do estômago em mortalidade.[7] Analisando apenas as mulheres, é o cancro com maior incidência (risco cumulativo ao longo da vida de 7,79%) e mortalidade (risco cumulativo ao longo da vida de 2.05%).[7]

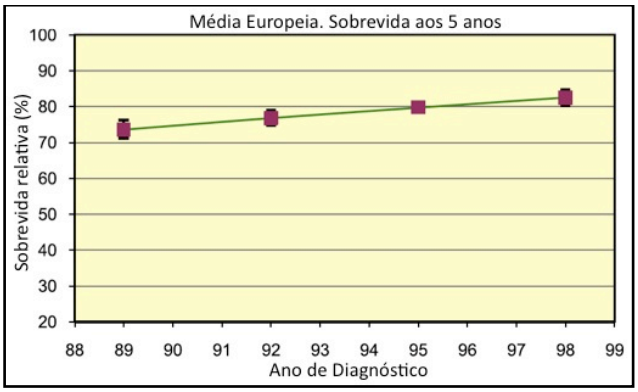


Figura 1. Sobrevida relativa aos 5 anos (Europa). Adaptado de Verdecchia, A., et al., Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999. Eur J Cancer, 2009. 45(6): p. 1042-66.

A sobrevivência por Cancro da Mama tem aumentado em toda a Europa (figura 1). A mortalidade por cancro da mama estagnou e começou a diminuir no início dos anos 90. Esta tendência tem-se mantido nos anos mais recentes, com uma redução mais evidente nas mulheres de "meia-idade". Esta queda na mortalidade, é atribuída por um lado ao rastreio mamográfico (permitindo diagnósticos mais precoces) e por outro lado a melhorias no tratamento oferecido.[9]

Os programas de rastreio foram introduzidos em muito países Europeus, durante o período referido e sem dúvida contribuíram para o aumento da sobrevivência documentado na Europa. Tem sido referido que além dos seus efeitos directos no diagnóstico precoce, o rastreio melhora também o tratamento dos cancros sintomáticos.[9]

A sobrevivência por Cancro da Mama na Europa, aumentou de 74% para 83% num período de 10 anos (1989-1999).[9] Actualmente, estima-se que a sobrevivência relativa do cancro da mama aos 5 anos seja de 88% e aos 10 anos de 77%, o que é substancialmente superior à sobrevivência relativa aos 5 anos no conjunto de todos os cancros (64%)[4]. Uma sobrevivente a longo-prazo é considerada uma doente que se encontre viva 5 anos após o diagnóstico inicial [4].

Em Portugal, o cancro da mama também é o tumor mais frequente nas mulheres, com cerca de 4300 novos casos e 1500 óbitos por ano (17% do total de mortes por causa oncológica), sendo a principal causa de morte por neoplasia no sexo feminino.[1]

No início da década de 1990 observou-se uma inversão na tendência crescente da mortalidade por cancro da mama em Portugal. Nas mulheres com idades entre 35 e 74 anos, registou-se uma diminuição anual de 2% durante a última década.[1]

As variações na mortalidade reflectem, para além da evolução da incidência, a letalidade. O padrão observado em Portugal relativamente à evolução da mortalidade por cancro da mama, espelha o que se passa em todos os países desenvolvidos e será também atribuível aos avanços substanciais que se têm registado nas últimas três décadas com a disponibilização de programas de rastreio e tratamentos mais eficazes e mais ajustados ao perfil clínico dos doentes.[1]

A importância da Recidiva Loco-Regional

A recidiva loco-regional após cirurgia por cancro da mama (mastectomia ou tumorectomia) é definida como o aparecimento de adenocarcinoma, confirmado por biópsia em uma ou mais das seguintes localizações: mama ipsilateral restante; pele, tecido celular subcutâneo ou músculos da parede torácica ipsilateral; axila, fossa supraclavicular ou cadeia mamária interna.[10]

A recorrência loco-regional do cancro da mama é uma preocupação frequente no tratamento desta doença porque é um factor de risco independente, bem estabelecido para metastização à distância e morte[3, 11-13]

Muitos estudos têm procurado factores associados com o risco de recidiva loco-regional. Alguns parâmetros conhecidos, que se relacionam de forma directa com o desenvolvimento de recidiva loco-regional são: tamanho do tumor, estadiamento ganglionar, estado dos receptores hormonais e o grau histológico do tumor. [10, 14]

Nos factores não dependentes do tumor mas do tipo de tratamento seleccionado, um dos mais conhecidos é o tipo de tratamento cirúrgico.[15] A cirurgia conservadora, associada a maior risco de recidiva quando comparada com a mastectomia[3] é seguramente o mais conhecido. Os factores de risco para recidiva local, em doentes tratados com cirurgia conservadora são margens positivas, componente intra-ductal extenso e idade jovem à data de diagnóstico.[3]

Os factores de risco habitualmente associados a recidiva loco-regional nos doentes submetidos a mastectomia são o grau histológico e envolvimento axilar extenso.[3]

Existem duas teorias principais, relativamente à origem e significado das recidivas loco-regionais: a primeira é que a recidiva loco-regional é causada por uma remoção incompleta do tumor primário; a segunda é que a recidiva loco-regional é um sinal precoce de disseminação da doença.[10]

Nos estudos mais recentes tem sido concluído que a recidiva loco-regional é um poderoso preditor independente de doença à distância. Contudo, especula-se se será uma causa de metastização à distância ou apenas um marcador precoce de um risco já existente. [12, 16, 17]

Apesar das ressecções com margem negativa para tumor, seguida de terapêutica sistémica e do uso adequado de radioterapia, entre 5 a 40% das doentes irá desenvolver recidiva loco-regional. [10, 18]

A maioria das recidivas loco-regionais (>70%) ocorrem nos primeiros 5 anos após a cirurgia e quase todas (>90%) até aos 10 anos.[15] Nas doentes submetidas a mastectomia, a recidiva loco-regional acontece habitualmente mais cedo do que nas doentes submetidas a cirurgia conservadora + radioterapia.[15]

A sobrevida livre de doença para os doentes com cancro da mama precoce submetidos a cirurgia conservadora varia entre os 90-97% aos 5 anos e entre 85-95% aos 10 anos. Na segunda década após o tratamento inicial, as recidivas loco-regionais continuam a ocorrer à taxa aproximada de 1% por ano. [19]

Existe alguma evidência que o crescimento do tumor recorrente, após cirurgia conservadora é mais rápido do que o crescimento do tumor inicial com as mesmas características.[20]

Contudo, após 20 anos de follow-up, não se detectaram diferenças significativas na sobrevivência global de mulheres submetidas a mastectomia ou a cirurgia conservadora.[15, 17] A utilização da radioterapia associada a cirurgia conservadora, permitiu melhorias substanciais na taxa de recidiva loco-regional. A incidência cumulativa de recidiva loco-regional na mama restante ipsilateral, 20 anos após a cirurgia, foi estimada em 14,3% para as mulheres submetidas a cirurgia conservadora e radioterapia adjuvante e de 39,2% para as mulheres submetidas apenas a cirurgia[15].

Diversos estudos randomizados, demonstraram que a sobrevida global em doentes com cancro da mama precoce era semelhante para os doentes tratados com mastectomia ou com cirurgia conservadora e radioterapia. Assim, a cirurgia conservadora seguida de radioterapia foi aceite como a opção *standard* no tratamento do cancro da mama precoce. [18]

Sobrevida

A evolução, significado e prognóstico da recidiva loco-regional do cancro da mama, é significativamente diferente entre as doentes submetidas a cirurgia conservadora ou a mastectomia. Na cirurgia conservadora, a taxa de recidiva esperada é de 10% a 25% aos 10 anos[3, 16, 21]. Isto tipicamente ocorre de uma forma arrastada no tempo e com a ocorrência de metástases sistémicas em menos de 10% dos doentes. A recidiva local após cirurgia

conservadora, está associada com um melhor prognóstico e possibilidade de cura, sendo que 50% a 63% dos doentes mantém-se livres de doença aos 5 anos após cirurgia da recidiva[3].

Pelo contrário, a recidiva local após mastectomia, tipicamente ocorre nos primeiros 2 a 3 anos após a cirurgia. Aparece associada a metastização em cerca de 2/3 dos doentes e, a maioria das doentes acaba por morrer de cancro da mama. Um terço dos doentes com recidiva loco-regional apresenta doença metastática na altura do diagnóstico e 50% apresenta metástases menos de 1 ano após recidiva. Neste contexto clínico, a sobrevida média é de 2 a 3 anos.[3] A sobrevivência aos 5 anos após recidiva pós-mastectomia varia entre os 40% e os 70%, estimando-se a sobrevivência livre de doença aos 5 anos entre 13% e 50%. [10]

Ao contrário de outros cancros, a taxa de sobrevivência relativa condicional mantém-se estável e inferior a 100% após 12 anos e baixa novamente cerca de 20 anos após o diagnóstico inicial, ou seja, o risco de recidiva e morte após cancro da mama diminui ao longo do tempo mas nunca desaparece. Isto pode ser uma consequência de recidivas locais ou sistémicas tardias, segundos cancros ou efeitos laterais tardios.[4]

O controlo da recidiva local tem sido associado a redução da metastização à distância e à melhoria da sobrevida relativa ao cancro da mama [22].

Factores de prognóstico no Cancro da Mama

A entidade clínica "cancro da mama" engloba um grupo heterogéneo de tumores. Vários marcadores clínico-patológicos têm sido utilizados para determinação do prognóstico e para definir a necessidade de terapêutica adjuvante. Os principais marcadores são: a idade, o tamanho, a invasão ganglionar, o grau histológico, os receptores hormonais de estrogéneos e progesterona e o HER2[23].

O tamanho do tumor, o estadiamento ganglionar e o grau histológico têm sido descritos como os factores mais importantes para a sobrevivência a longo prazo, apesar da sua influência se esbater à medida que aumenta o follow-up. A maioria dos autores concorda com a atribuição de valor prognóstico ao índice proliferativo, à invasão linfovascular, à positividade para Her2neu e aos perfis genéticos[4]. Um estudo que efectuou análise multivariada,[24] concluiu que a idade jovem e a terapêutica conservadora eram factores de risco isolados para recidiva loco-regional.

Avaliação dos factores clássicos de prognóstico

Idade

As mulheres jovens (idade inferior a 35 anos) têm uma pior sobrevida, tal como as mulheres com mais de 70 anos. Se no primeiro caso, a diminuição da sobrevida parece estar dependente de factores biológicos do tumor, no segundo caso, parece dever-se mais à existência de co-

morbilidades e à tendência generalizada para efectuar tratamentos menos agressivos[4, 25].

Contudo, o desenvolvimento do tratamento adjuvante (quimioterapia, hormonoterapia e imunoterapia específica) parece estar a diminuir o valor de mau prognóstico conferido pela idade jovem.[25]

Tamanho

O tamanho do tumor é um dos factores de prognóstico mais importantes, mesmo após 20 anos de follow-up. [4, 26]. Quando comparados os tumores com tamanho inferior ou igual a 2 cm, com aqueles >2cm, o risco relativo de mortalidade é de 1,64. [12]

O tamanho do tumor também tem sido relacionado com a presença de invasão de gânglios linfáticos regionais [27], tornando esta interacção ainda com maior impacto na sobrevivência do cancro da mama. Independentemente deste factor, a importância do tamanho do tumor foi comprovada estudando um grupo de doentes sem invasão ganglionar. Assim, a taxa de sobrevivência aos 10 anos para doentes com tumores de 2-5cm (sem envolvimento axilar) foi de 66%, comparada com 79% para os doentes com tumores inferiores a 1 cm. [4]

Relativamente à recidiva loco-regional, os doentes com evidência de recidiva tumoral, apresentaram uma percentagem significativamente maior de tumores de maiores dimensões.[10, 16]. Especificamente nos doentes submetidos a cirurgia conservadora, o tamanho do tumor inicial foi um dos factores mais importantes associados com a recidiva (juntamente com a permanência de doença residual após a cirurgia).[20]

Grau Histológico

O sistema de classificação mais utilizado a nível internacional é a classificação de Scarff-Bloom-Richardson, posteriormente modificado por Elston e Ellis.[28] Em diversos estudos, têm sido encontradas associações significativas entre o aumento do grau histológico e a diminuição da sobrevivência.[4, 26, 29]

Dependendo também de outros factores prognósticos (tais como o estadiamento ganglionar e o tamanho do tumor) a sobrevivência cumulativa para os doentes com tumores de grau I foi de 90-94% aos 10 anos e de 30-78% nos doentes com grau III.[4, 30] O risco relativo de mortalidade dos tumores grau III vs. tumores grau I/II, é de 2,28.[12] Os doentes com graus histológicos mais elevados, também apresentam uma maior probabilidade de recidiva loco-regional.[10]

Estadiamento ganglionar

O estadiamento ganglionar é um indicador importante da sobrevivência a longo prazo.[26, 27]

Os doentes com metastização ganglionar têm uma mortalidade estimada 4 a 8 vezes superior do que os doentes sem envolvimento ganglionar.[26, 31]

A quantidade de gânglios metastizados, também piora o prognóstico, sendo até um dos factores mais importantes detectados em estudos com análise estatística multivariada.[16] Os doentes com ≥ 10 gânglios envolvidos tiveram uma mortalidade 70% superior aos 10 anos do que os doentes com 1-3 gânglios metastizados.[27]

A recidiva loco-regional também é mais elevada em doentes com metastização ganglionar.[10] Em doentes sem metastização axilar, a taxa de recidiva local aos 10 anos foi de 12,1%, enquanto que nos doentes com metastização axilar foi de 19,1%.[16]

Permeação Linfovascular

Na reunião de consenso de St. Gallen em 2005, a permeação linfovascular foi adicionada como valor prognóstico nos doentes sem invasão ganglionar.[32] Os doentes com cancro da mama sem invasão ganglionar, mas com permeação linfovascular apresentaram taxas de mortalidade superiores aos doentes sem permeação linfovascular e com diferenças significativas em análise uni e multivariada.[33]

Outros factores

Outros factores independentes de prognóstico para a sobrevivência global de doentes com cancro da mama, após recidiva loco-regional foram o tempo decorrido até à recidiva e o Índice Prognóstico de Nottingham. [31, 34]

O tempo decorrido até à recidiva, provou ser um dos factores com maior impacto na sobrevivência global, em análise multivariada.[16]

Receptores Hormonais

Inúmeros marcadores moleculares têm sido estudados relativamente à recidiva e sobrevivência após cancro da mama. Contudo, nem todos os estudos são conclusivos quanto à sua eficácia e valor prognóstico, quer à data de diagnóstico, quer à data de recidiva.[10]

Nos últimos anos, têm sido encontrados marcadores moleculares cuja expressão influencia claramente o prognóstico e o tipo de terapêutica oferecido às doentes. Destes, o melhor exemplo talvez seja o dos receptores hormonais. Nas doentes com recidiva loco-regional, o estado de negatividade para Receptores de Estrogéneo (RE) e para Receptores de Progesterona (RP), foi estatisticamente associado a uma diminuição da sobrevivência global.[10] Vários estudos têm encontrado associações neste sentido, sendo que a positividade para RE e RP implica uma maior

sobrevivência livre de doença e uma sobrevivência global mais longa.[10, 35]

Contudo, segundo alguns autores, a presença de RE e RP não terá valor prognóstico independente[4], mas apenas valor preditivo de resposta à terapêutica hormonal.[36]

Em estudos de análise multivariada, juntamente com o número de gânglios linfáticos metastizados, o tempo livre de doença e o grau histológico do tumor; a positividade para RE apresentou valor prognóstico independente.[16]

Classificação molecular

Com o advento das novas tecnologias de *microarrays*, foi possível efectuar a análise de milhares de genes de uma só vez. Assim, surgiu uma classificação molecular do cancro da mama, baseada em perfis de expressão génica. Os investigadores identificaram um conjunto de genes de expressão estável (534 genes), responsáveis por grande parte das diferenças moleculares entre os cancros da mama de 42 doentes. Através de uma análise hierárquica dos grupos (*hierarchical cluster analysis*), identificaram 4 subgrupos de cancros com diferentes perfis de expressão génica.

Foram identificados os grupos: Luminal, tipo basal, tipo normal e erbB2+ , e demonstradas as suas diferenças no prognóstico. Estes resultados foram posteriormente validados, através da aplicação destes perfis genéticos a grandes séries. Os grupos tipo basal (essencialmente negativos para RE e HER-2) e erbB2+ (essencialmente com amplificação do HER-2 e negativos para RE) apresentaram as recidivas mais precoces e a sobrevivência global mais baixa, enquanto que o tipo Luminal (RE positivos) apresentou um curso clínico mais favorável.[37-39]

Assim, foi proposta a adopção de um esquema de classificação para os cancros da mama baseado nos seus perfis de expressão génica em tipo luminal, HER2/*neu* e basal (triplo negativo).[38-41] Além de ter sido demonstrado o valor prognóstico desta classificação, actualmente têm também importância no que respeita à escolha da terapêutica mais adequada a cada doente. Uma meta-análise dos diversos perfis de expressão génicos utilizados, identificou um conjunto de 374 genes aos quais conseguiu atribuir o maior valor preditivo individual para recidiva de cancro da mama.[42]

Apesar de esta classificação ter sido baseada em estudos sofisticados de análise hierárquica da expressão génica, alguns marcadores imunohistoquímicos disponíveis, permitem replicar com boa correlação a análise hierárquica dos grupos. Especificamente, com base em 3 marcadores imunohistoquímicos (RE, RP e HER2/*neu*), os tumores podem ser classificados em tipo luminal (positivo para RE ou RP), HER2/*neu* positivo ou tipo basal (negativo para os três marcadores).

Este sistema é actualmente muito utilizado e identifica os doentes *triplo-negativos* como sendo os de maior risco para doença sistémica.[41] Entretanto, na avaliação do prognóstico dos doentes *triplo-negativos*, chegou-se à conclusão que continham pelo menos 2 grupos heterogéneos de tumores: um dos quais com expressão de marcadores de diferenciação basal (CK5, EGFR, P-caderina, entre outros); e o outro, sem expressão diferencial com o parênquima mamário normal, então chamado de tipo "normal" ou indeterminado.[39]

A negatividade para RE (tipo basal e tipo HER2), é um critério demonstrado de resposta positiva à quimioterapia. Este grupo de doentes apresenta maiores benefícios absolutos em termos de melhoria de sobrevivência e tempo livre de doença do que os doentes RE+.[43]

A proteína HER2 é um receptor transmembranar, frequentemente sobre-expresso no cancro da mama. A sobre-expressão do HER2 correlaciona-se com pior prognóstico dos doentes. O papel do HER2 como indicador prognóstico foi controverso, até ao desenvolvimento do trastuzumab (um anticorpo monoclonal contra o domínio extra-celular do HER2), o definir como um importante alvo terapêutico. Desde o início da sua utilização clínica regular, o trastuzumab provou melhorar o prognóstico dos doentes com cancro da mama e sobre-expressão de HER2 (conforme determinado por imunohistoquímica ou amplificação génica por FISH).[44]

A família ErbB/HER de receptores, é composta por 4 receptores tipo I (EGFR/c-erbB1/HER1; c-erbB2/HER2/*neu*; c-erbB3/HER3; e c-erbB4/HER4), que apenas funcionam como homo ou hetero-dímeros. Existem três grupos de ligandos, de acordo com a sua ligação: exclusiva ao EGFR, ao EGFR e HER4 e, HER4 e/ou HER3. Até à data não foi identificado qualquer ligando para o HER2, o que sugere que apenas funcione por heterodimerização com outros membros da família.[44]

As principais vias de sinalização intra-celular da família ErbB são a via do Ras-Raf-MAPK e a do PI3K/Akt.[44]

Foi já estabelecida forte associação destes receptores com os carcinomas invasivos da mama, particularmente em dois dos seus subtipos moleculares: os que sobre-expressam HER2 e os carcinomas de tipo basal que sobre-expressam EGFR.[45]

Os tumores com sobre-expressão HER2/*neu*, estão habitualmente associados a um pior prognóstico do que os tumores do tipo luminal. Contudo, o desenvolvimento do trastuzumab (um anticorpo monoclonal dirigido ao HER2), pode ter um impacto significativo na sobrevivência destes doentes.[46]

Vários estudos avaliaram o prognóstico do grupo de tumores *triplo negativos* e determinaram que apresentam recidivas mais precoces, metastização mais cedo e menor sobrevivência, quando

comparados com os tumores *não triplo-negativos*.[23, 41] Os tumores do tipo basal, apesar de não terem expressão de receptores hormonais ou de sobre-expressão de HER2 e de terem um pior prognóstico, são aparentemente sensíveis à quimioterapia.[37]

Outros estudos recentes suportam a ideia adicional de que a quimioterapia pode melhorar significativamente a sobrevivência livre de doença, num grupo de doentes RE negativo e HER2 negativo. Contudo, doentes com doença residual no final do tratamento apresentam mau prognóstico, dado que sendo negativos para RE e HER2, não possuem no momento nenhum tratamento dirigido disponível.[23]

Assim, apesar de o grupo de mulheres com recidiva loco-regional isolada, poder ter uma sobrevivência significativa, neste grupo específico de tumores *triplo-negativos* o prognóstico é mau e o uso de terapêutica hormonal ou de trastuzumab não trará qualquer benefício terapêutico.[23]

Estudos moleculares

P-caderina

As células cancerosas podem invadir os tecidos vizinhos e "sobreviver" nestes locais ectópicos, dando origem a metástases em órgãos secundários. Para que este comportamento seja possível, é necessário que se perca a regulação normal de um complexo sistema de vias de sinalização envolvidas na proliferação e migração. Apesar da expressão aberrante de P-caderina epitelial estar associada com um fenótipo proliferativo e indiferenciado, o papel relativo desempenhado pela P-caderina na invasão e motilidade das células do cancro da mama ainda não é completamente conhecido.[47]

As caderinas são moléculas de adesão celular que formam junções com as cateninas, um grupo de proteínas citoplasmáticas que ligam a parte citoplasmática da caderina ao citoesqueleto de actina e facilitam a criação da estrutura juncional, formando complexos caderina-catenina, dos quais depende a força e a função da adesão celular mediada pela P-caderina.[47, 48]

A P-caderina (ou caderina placentária) foi a terceira caderina clássica a ser identificada e caracterizada na endoderme visceral do rato. Apesar do seu nome, a P-caderina não é expressa na placenta humana: o seu nome resulta do facto de esta molécula ter sido pela primeira vez identificada na placenta do rato.[47]

Ao contrário da caderina epitelial (E-caderina), a expressão da P-caderina está habitualmente ligada a propriedades tumorigénicas, permitindo a invasão celular e a agressividade tumoral e indicando um pior prognóstico nas doentes com cancro da mama. O principal mecanismo que tem sido proposto para regular a expressão do gene da P-caderina é a hipometilação do promotor.[48]

Apesar de quer a E-caderina, quer a P-caderina serem encontradas em áreas de contacto célula-célula, a relativa facilidade com que a P-caderina pode ser extraída, utilizando um detergente não iónico[47], demonstra uma ancoragem mais frágil ao citoesqueleto, o que corresponde a interacções célula-a-células menos permanentes do que as atribuídas à E-caderina.

Os tumores negativos para P-caderina preservam a expressão das cateninas na membrana celular enquanto que a expressão de P-caderina está associada à acumulação citoplasmática de cateninas.[48]

A expressão de P-caderina está restrita às camadas basais ou mais inferiores dos epitélios

estratificados, o que sugere que além do papel que desempenha na manutenção da adesão celular, a P-caderina poderá desempenhar outras funções na diferenciação e crescimento celular. Na glândula mamária adulta, a expressão de P-caderina é característica das células mioepiteliais. Estudos experimentais, também sugeriram um papel regulatório para a P-caderina durante o desenvolvimento da glândula mamária. Neste período de desenvolvimento, a expressão de P-caderina é característica nas células pluripotenciais da extremidade dos ductos. Estas células, são as precursoras das células mioepiteliais que não exprimem receptores de estrogéneos e têm uma elevada taxa de proliferação e baixa apoptose.[49]

A expressão aberrante de P-caderina em carcinomas da mama associa-se a factores de prognóstico desfavorável, tais como o alto grau celular (desdiferenciação), elevado índice proliferativo e negatividade para o receptor de estrogéneos, mas o seu papel funcional na tumorigénese do cancro da mama ainda não é completamente conhecido.[50-52]

Esta molécula é expressa, essencialmente nas neoplasias da mama do tipo basal, que são negativas para receptor de estrogéneo (RE), receptor de progesterona (RP) e HER2 (fenótipo *triplo-negativo*), que são carcinomas com mau prognóstico e para os quais não existe ainda terapêutica dirigida.[47] Outros estudos, referem que a expressão de P-caderina está habitualmente relacionada com a sobre-expressão de HER2.[53]

A P-caderina, foi já identificada como um factor independente de mau prognóstico no cancro da mama. [49, 54]

A perda da polaridade celular é um dos indicadores da desdiferenciação. A expressão da P-caderina, pode contribuir para esta perda da polaridade celular, dado que está envolvida em contactos célula-a-célula instáveis, facilmente quebrados e refeitos, e incapazes de manter células epiteliais diferenciadas. [47]

Foi também já demonstrado o envolvimento da P-caderina na invasibilidade celular.[55] A P-caderina, surge assim como a força motriz para tornar as células invasivas, sendo importante para destabilizar as adesões intercelulares e tornar as células susceptíveis ao movimento.[48]

Osteopontina

A Osteopontina (OPN) é uma glicofosfoproteína secretada que tem sido implicada numa quantidade de processos fisiológicos e patológicos. [56] A OPN tem sido descrita como estimuladora da adesão celular, migração e de diversas função de sinalização intra-celular. A sua sobre-expressão, tem sido encontrada no melanoma e nos carcinomas da mama, pulmão, cólon e recto, estômago e ovário.[57]

A Osteopontina é uma molécula pro-metastática e desempenha um papel importante na transformação maligna e na metastização dos tumores, através da promoção da proteólise da matriz extracelular. Além da alteração da matriz extracelular, altera também a imunidade do indivíduo através de numerosas vias de sinalização intracelular, entre as quais a via do PI3K/Akt e do NF-kB.[58]

A influência da OPN no comportamento celular baseia-se principalmente na sua interacção com um vasto leque de factores tais como os receptores da superfície celular (integrinas, CD44), proteases secretadas (metaloproteínases da matriz, activador do plasminogéneo urocinase, trombina) e vias de factores de crescimento/receptores (TGFa/EGFR, HGF/Met).[59]

A OPN tem sido associada a um número de diferentes processos associados com malignidade, tais como o aumento da capacidade de migração celular e do seu comportamento invasivo, o aumento de metástases (de forma geral e para o osso, com aumento da adesão celular às células endoteliais da medula óssea), protecção da apoptose, promoção da formação de colónias e capacidade de crescimento tridimensional, indução de células inflamatórias associadas ao tumor e indução da expressão de factores angiogénicos, com o consequente aumento de neovasos tumorais.[56]

De uma forma geral, são frequentemente encontrados níveis aumentados de mRNA de OPN (ou a sua proteína), em tumores da mama ou outros tipos de tumores, comparativamente com tecidos benignos.[60] Tem sido demonstrado que um nível mais elevado de OPN nas células tumorais está associado com pior prognóstico do cancro da mama[61] e que esta associação de OPN nas células tumorais com pior prognóstico é independente do estadio ganglionar ou de outros factores de prognóstico estabelecidos.[62] Actualmente, é consensual que a OPN expressa pelas células tumorais, altera as suas capacidade malignas, especificamente afectando a sua capacidade de crescimento, invasão e metastização.[57]

A quebra proteolítica da OPN pela trombina tem sido descrita como importante para o aumento da sua actividade biológica. Do ponto de vista terapêutico, existem vários agentes com capacidade para inibir a trombina. Assim, o argatroban (inibidor específico da trombina), atrasa o crescimento das células de cancro da mama, bem como a sua metastização linfática através de mecanismos dependentes da osteopontina, iniciados pela inibição da trombina.[59]

Sendo cada vez mais evidente que o cancro é influenciado por sinais provenientes do estroma tumoral[63], a OPN no estroma do cancro da mama é associado a tumores que expressam um grupo de genes associados a pior prognóstico e relacionados com respostas angiogénicas e inflamatórias dependentes do tumor. Sob condições fisiológicas normais, o estroma serve como uma barreira importante à transformação maligna das células; a relação entre as células epiteliais e o seu micro-ambiente, mantêm a polaridade e modulam o crescimento celular. Contudo, o estroma pode sofrer alterações em resposta à emergência de lesões malignas e pode desempenhar um papel fundamental no desenvolvimento e progressão de lesões cancerosas.[57, 63]

A expressão de OPN no cancro da mama, varia entre 26% e 43,4%, o que se associa de forma significativa com a sobrevivência global e com a sobrevivência livre de doença.[57, 64]

Os tumores de Grau III, expressam níveis de Osteopontina significativamente mais elevados do que os tumores Grau I/II. Os níveis de expressão de mRNA têm uma associação significativa com a recidiva local e com a sobrevivência livre de doença. Além disso, em doentes com carcinoma ductal invasor, foi estabelecida a associação entre níveis elevados de osteopontina e metastização óssea.[65]

MIB1 (Ki67)

Dado que a proliferação celular rápida é uma característica fundamental para a agressividade biológica, os marcadores de proliferação celular têm sido avaliados no cancro da mama.[66] Nos doentes com cancro da mama, a proliferação celular está inversamente relacionada com a sobrevivência[67].

O anticorpo monoclonal Ki67, identificado em 1983, reage com uma proteína nuclear, presente exclusivamente em células em proliferação[66], pelo que se correlaciona com a fracção em fase S e com o índice mitótico.[67] A determinação da expressão do Ki67, tem-se tornado num dos métodos preferidos, para avaliação da actividade proliferativa das células tumorais.[66]

Em secções de tecido fresco congelado, o índice de proliferação Ki67 demonstrou um valor prognóstico significativo, em diversos estudos de cancro da mama.[68, 69]

A expressão elevada de Ki67, que traduz um elevado índice proliferativo[70], tem sido associada a um tempo mais curto de sobrevivência livre de doença[71-73], a diminuição da sobrevivência global[70, 73] e também a diminuição da sobrevivência após recidiva loco-regional.[10]

O anticorpo MIB1, que é reactivo contra a proteína nuclear do Ki67, pode ser utilizado em tecidos incluídos em parafina, e confirmou em diversos estudos, o valor prognóstico do Ki67[69, 72-75] e demonstrou uma boa correlação entre a marcação por MIB1 e Ki67.[68, 76]

O valor prognóstico do MIB1, tem sido demonstrado mesmo em carcinomas *in situ*[77] e em cancros sem invasão ganglionar.[69, 76, 78, 79] Tem sido encontrada uma elevada expressão do Ki67 nos tumores do tipo *triplo-negativo* e uma expressão baixa nos tumores do tipo luminal.[80]

Além do valor prognóstico a nível de sobrevivência, a elevada expressão de Ki67, também tem sido associada com idades jovens[69] e elevados graus histológicos.[69]

Nos estudos de caracterização da expressão génica do cancro da mama, o Ki67 tem sido identificado como um dos genes envolvidos nos scores preditivos de recidiva do cancro da mama.[81]

Contudo, apesar dos inúmeros artigos publicados que analisam o valor prognóstico do Ki67 no cancro da mama, ainda não é um marcador prognóstico de rotina, principalmente devido à falta de consensos internacionais, relativamente aos métodos de recuperação antigénica e coloração, bem como à ausência de métodos de classificação consensuais.[66, 79]

Objectivos

Apesar de todos os avanços dos últimos anos na compreensão da biologia tumoral do cancro da mama, este mantém-se como uma doença muito heterogénea e com prognósticos bastante variáveis.

O desenvolvimento médico dos últimos 20 anos, permitiu-nos conhecer quer marcadores de prognóstico (clínicos, histológicos ou moleculares), quer potenciais alvos terapêuticos.

Existe contudo uma variação significativa de prognóstico entre doentes com o mesmo estadiamento da doença e com expressão semelhante de um grupo de marcadores moleculares.

A recidiva loco-regional surge, como um marcador precoce e importante de disseminação da doença oncológica que nos permitirá, em alguns casos, optimizar o tratamento oferecido às doentes. Assim, surge como necessidade a investigação dos "factores de risco" para recidiva loco-regional na nossa população e a sua relação com o prognóstico das doentes.

Este estudo sobre os factores moleculares de prognóstico na recidiva local do cancro da mama, teve como principais objectivos:

1. Caracterizar a população com recidivas loco-regionais de cancro da mama.
2. Avaliar a influência dos marcadores clínico-patológicos clássicos na recidiva loco-regional do cancro da mama
3. Avaliar a influência da classificação molecular na recidiva loco-regional do cancro da mama
4. Avaliar "novos" marcadores moleculares com possível influência na recidiva loco-regional do cancro da mama
5. Avaliar a influência dos diversos factores de prognóstico e dos marcadores moleculares na sobrevivência livre de doença e na sobrevivência global.

Material e Métodos

Analisamos os registos clínicos de 1432 doentes tratadas no Hospital de São João por cancro da mama num período de 10 anos (1 de Janeiro de 1997 a 31 de Dezembro de 2006). Destas, seleccionamos um grupo de 101 doentes (7%) com evidência de recidiva loco-regional sem evidência de recidiva prévia à distância

Dado que a maioria das recidivas loco-regionais, ocorre durante os primeiros 10 anos após o diagnóstico inicial[15], seleccionamos um grupo de doentes com >10 anos de *follow-up*, sem evidência de progressão da doença oncológica (recidiva loco-regional ou à distância). Assim, para grupo de "controlo" seleccionamos todas as doentes operadas entre 1 de Janeiro de 1997 e 30 de Junho de 1998 (92), sem evidência de progressão da doença oncológica.

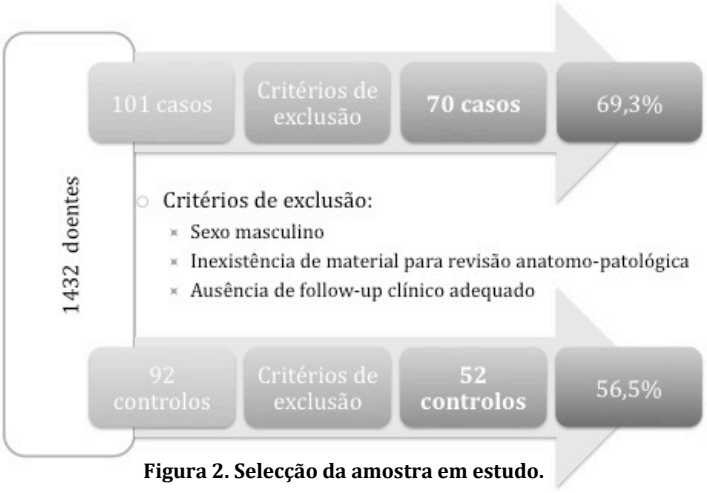


Figura 2. Selecção da amostra em estudo.

Foram excluídos do estudo todos os doentes do sexo masculino, todos os doentes perdidos para *follow-up* e os doentes dos quais não foi possível recuperar material biológico para revisão anátomo-patológica. Assim, o grupo final de análise, constituiu-se por 70 doentes (69,3% do grupo inicial) com recidiva loco-regional (***casos***) e 52 doentes (56,5% do grupo inicial) sem sinais clínicos e imagiológicos de recidiva da doença (***controlos***).

A recidiva loco-regional foi considerada como qualquer recidiva na mama ipsilateral restante, na parede torácica ipsilateral (cicatriz, pele, tecido celular subcutâneo ou músculo) e nos gânglios linfáticos regionais (axilares, mamária interna e supra-claviculares).

Nestas doentes, foram avaliados os parâmetros clínico-patológicos clássicos (idade, lateralidade, tipo de cirurgia, estadiamento TNM, tipo histológico, grau histológico [Bloom e Richardson][28], presença de CDIS associado, tamanho, invasão linfovascular, invasão ganglionar, número de gânglios invadidos, distância à margem mais próxima, Índice Prognóstico de Nottingham [IPN][*], expressão de RE e RP, e realização de QT, RT ou HT), a classificação molecular (Luminal A,

[*] O Índice de Prognóstico de Nottingham foi calculado com base na seguinte equação82. Galea, M.H., et al., *The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 1992. **22**(3): p. 207-19.: IPN= 0,2 tamanho do tumor (cm) + grau histológico (1-3) + envolvimento ganglionar (1-3).

Luminal B, Basal, HER2, Inclassificável) e a expressão de marcadores moleculares(P-caderina, Osteopontina [estroma e tumor] e Ki67), estudados por *Tissue Micro-Arrays (TMA's)*.

Uma vez que a prevalência da recidiva loco-regional é relativamente baixa na nossa série (~7%), optamos pela realização de um estudo caso-controlo, quer por motivos logísticos quer por motivos económicos. Assim, na avaliação das curvas de sobrevivência será necessário relembrar o método utilizado para a selecção das doentes, que implica que todos os "controlos" estejam vivos e livres de doença à data de realização do estudo e tenham um follow-up superior a 10 anos.

O tempo livre de doença (TLD) foi definido como o intervalo (em meses) desde a data da primeira cirurgia até ao diagnóstico da recidiva loco-regional. A sobrevivência global foi definida com o intervalo (em meses) entre a data da primeira cirurgia e a morte relacionada com o cancro da mama.

Estadiamento.

O estadiamento do cancro da mama foi adaptado com base nas *guidelines* da AJCC (American Joint Comittee on Cancer)[83, 84], utilizando os seguintes critérios:

Tabela1 . Estadiamento do Cancro da Mama

TNM		**Estadio**	T	N	M
Tumor primário		Estadio 0	Tis	N0	M0
Tx	Não avaliável	Estadio I	T1	N0	M0
T0	Sem evidência de tumor primário	Estadio IIa	T0	N1	M0
Tis	Carcinoma *in situ*		T1	N1	M0
T1	Tumor <2cm de maior dimensão		T2	N0	M0
T2	>2 - <=5cm	Estadio IIb	T2	N1	M0
T3	>5cm		T3	N0	M0
T4	Qq tamanho c/ invasão da pele ou parede torácica	Estadio IIIa	T0	N2	M0
Gânglios linfáticos regionais			T1	N2	M0
Nx	Não avaliável		T2	N2	M0
N0	Sem metastização nos gânglios linfáticos regionais		T3	N1	M0
N1	Metástase em gânglios regionais móveis		T3	N2	M0
N2	Metástase em gânglios regionais fixos ou aderentes	Estadio IIIb	T4	N0	M0
N3	Metástase em gânglios infra-claviculares, supra-claviculares ou simultaneamente em gânglios axilares e da mamária interna		T4	N1	M0
			T4	N2	M0
		Estadio IIIc	qqT	N3	M0
Metastização à distância		Estadio IV	qqT	qqN	M1
Mx	Não avaliável				
M0	Sem metastização à distância				
M1	Com metastização à distância				

Tratamento das doentes participantes no estudo

Actualmente, o tratamento das doentes com cancro da mama é baseado em parâmetros clínico-patológicos clássicos e na expressão de três marcadores biológicos "standard": RE, RP e Her2neu. Utilizando estas variáveis as doentes podem ser estratificadas em grupos de acordo com o risco de recidiva (Guidelines de St. Gallen 2007).[85, 86]

O "International Breast Cancer Study Group" demonstrou que em doentes N0, o benefício da associação de quimioterapia era substancialmente maior nas doentes com receptores de estrogéneos negativos (redução de ~50% no risco de recidiva e morte) do que nas doentes com receptores de estrogéneos positivos (redução do risco de ~1%).[43]

O tamoxifeno, foi inicialmente proposto para utilização em mulheres pós-menopáusicas, com ER+. Contudo, dada a sua eficácia e baixa toxicidade em estadios mais precoces, independentemente do estado menopáusico, as suas indicações clínicas têm aumentado. Associado à melhoria do prognóstico do cancro da mama (-47% de risco de recidiva e -26% de risco de morte aos 5 anos de tratamento), têm sido identificados efeitos benéficos a nível da densidade óssea, colesterol e redução do número de eventos cardiovasculares, que contrabalançam os riscos de cancro do endométrio e eventos tromboembólicos.[3] Com o surgimento dos inibidores da aromatase (IA), a maioria dos autores sugerem que após 2-3 anos de tratamento com tamoxifeno, se proceda à alteração para um IA.[85]

O trastuzumab (Herceptin) é um anticorpo monoclonal dirigido ao gene Her2neu, que codifica um receptor de crescimento da família HER2. O anticorpo liga-se ao receptor do gene Her2neu das células cancerígenas, pelo que o seu efeito está restrito ao grupo de doentes com sobre-expressão do Her2neu.[3]

Se a utilização de trastuzumab, actualmente tem um papel bem estabelecido no tratamento das doentes com cancro da mama, à data de tratamento das doentes incluídas no estudo não estava ainda estabelecido o seu papel na prática clínica. Assim, o esquema de tratamento destas doentes, baseou-se exclusivamente nos achados clínico-patológicos e na positividade para RE e RP.

Esta estratégia terapêutica sublinha a importância fundamental da terapêutica dirigida sempre que possível, o que confirma a absoluta necessidade de exames histopatológicos fiáveis, precisos e atempados, que incluam a identificação destas "moléculas-alvo".[85]

Tissue Micro-Arrays

A análise dos marcadores prognósticos e preditivos de resposta à terapêutica na doença oncológica, tem sido tradicionalmente efectuada pela pesquisa individual de um marcador isolado, em amostras relativamente pequenas. Contudo, antes da sua aplicação na prática clínica de rotina, são necessários estudos de larga-escala com a avaliação de centenas ou milhares de amostras de tecido com informação clínica fidedigna[87], o que facilmente se percebe consome uma grande quantidade de tempo e de recursos.

Através da introdução de tecnologias de genómica e proteómica de larga escala, a translação da investigação básica para a aplicação clínica tem tido enormes desafios. Por exemplo, numa única avaliação de *microarrays* de cDNA, é possível determinar a expressão de 50.000 genes humanos. Estas avaliações habitualmente necessitam de tecido fresco, o que dificulta a sua utilização em estudos clínicos.[87] Contudo, a avaliação de ainda que uma pequena fracção dos alvos de expressão destes gentes, está muito para lá do alcance das técnicas tradicionais de biologia molecular. Além de consumir muito tempo e de ser laborioso, a disponibilidade de tecido é também um factor limitante.[87]

Os *tissue microarrays* têm a vantagem de necessitar apenas de pequenas quantidade de tecido com 4-5µm de espessura e incluir centenas de amostras (~0,6mm de diâmetro) no mesmo bloco, e de serem construídos a partir de blocos de tecido fixado e parafinado, que são muito mais disponíveis e manejáveis do que secções de tecido congelado. Além do mais, quando comparado com a avaliação da expressão génica por RNA, os TMAs são muito mais baratos, fáceis e rápidos.[88]

Nesta tecnologia, são colhidos cilindros de tecido com 0,6mm de diâmetro de centenas de blocos primários e colocados num único bloco de *microarray.* As secções destes blocos podem então ser utilizadas para análise simultânea de centenas de tumores primários por imunohistoquímica.[87]

A possibilidade de miniaturizar a análise dos tecidos, além de facilitar ao nível do tempo dispendido para análise, também facilita a homogeneização e interpretação dos resultados. Dado que várias amostras de diferentes tumores, estão presentes na mesma lâmina, facilita ao patologista a observação e a comparação entre os diferentes níveis de expressão.[87]

A coloração de uma única lâmina de TMA também proporciona um maior grau de consistência e homogeneização dos resultados, do que a coloração de centenas de lâminas individuais, onde pequenas diferenças na técnica, poderão vir a traduzir expressões diferentes ao nível tecidular.[87]

O formato TMA também aumenta drasticamente a possibilidade de avaliação de diferentes alvos no mesmo grupo de tumores, ao poupar tecido. Calcula-se que de um bloco de parafina com uma área de tumor de 10x10x3mm, seja possível extrair dezenas de milhares de secções de TMA.[87]

A limitação mais óbvia da técnica de TMAs é a amostragem de tumores grandes, possivelmente

heterogéneos. A heterogeneidade dos tumores é habitualmente observada quer a nível morfológico, quer a nível genético. Esta heterogeneidade poderá representar a instabilidade dos tumores e é um dos conceitos base da actual teoria da evolução clonal do cancro.[87]

Para a nossa análise, foi possível recuperar as amostras de tumor incluídas em parafina e arquivadas no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João em 53 doentes com recidiva e em 33 doentes do grupo de controlo. Foram efectuados novos cortes do tecido tumoral e corados com hematoxilina-eosina. Foi efectuada uma selecção das áreas representativas do tumor e marcadas as áreas respectivas no bloco de parafina correspondente, para realização dos *Tissue Micro-Arrays (TMA's)*[10]

Construção de TMA's

Foram recolhidos 2 núcleos de tecido (2mm de diâmetro) de cada espécimen seleccionado e depositados num bloco de parafina receptor, utilizando uma estação de trabalho de TMA (TMA builder ab1802, Abcam, Cambridge, UK). Foram construídos 22 blocos de TMA, cada um dos quais contendo 24 núcleos de tecido (4x6). Em cada bloco de TMA, foi também incluído tecido mamário não-neoplásico e tecido hepático, respectivamente como controlo e guia do TMA.

Figura 3. Colheita de tecido seleccionado para construção de TMA's

Após a construção, foram cortadas secções de 2mm de tecido e colocadas em lâminas de vidro "Superfrost Plus". Uma secção de cada bloco, corada com HE foi revista para confirmação da presença de alterações morfológicas representativas das áreas da lesão original.

Imunohistoquímica

As secções foram coradas com anti-corpos monoclonais primários contra RE, RP, HER2, CK5 e MIB1[89], P-caderina e OPN. As marcações para RE, HER2, MIB1, CK5 e OPN foram realizadas utilizando a técnica da streptavidina-biotina-peroxidase (LabVision, Fremont, CA, USA), enquanto que a marcação para RP e P-caderina utilizou o polímero marcado por HRP (DakoCytomation, Carpinteria,CA, USA).

A recuperação antigénica de RE, RP e HER2 foi efectuada com uma diluição de 1:100 de uma solução comercial de tampão de citrato, ph=6,0 (Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) a 98ºC, enquanto que para a CK5 e a P-caderina, foi utilizada uma diluição de 1:10 de ácido tri-etilenodiaminotetraacético (EDTA) com pH=9,0 (DakoCytomation)

Os anticorpos utilizados, diluições e tempos de recuperação antigénica estão listados na Tabela 1.

Tabela 2. Anticorpos utilizados na criação de *TMA's*

Anticorpo	Clone	Fabricante	Tempo de	Diluição	Tempo de recuperação
RE	SP1	Neomarkers	30	1:150	30
RP	SP2	Neomarkers	30	1:300	30
HER-2	SP3	Neomarkers	30	1:80	30
P-	56	Transduction	60	1:50	30
CK5	XM26	Neomarkers	60	1:50	30
OPN	AKm2A1	Santa Cruz	60	1:500	30
MIB-1	SP6	Neomarkers	60	1:200	30

Após a recuperação antigénica, as lâminas foram lavadas com uma solução de tampão de fosfato (PBS) e submetidas a bloqueio da actividade endógena da peroxidase através da incubação a 3% de peróxido de hidrogénio (Panreac, Espanha) em metanol (Sigma-Aldrich). As lâminas foram ainda incubadas com um soro bloqueador (LabVision Corporation kit) durante 15 minutos e após com os anticorpos primários. Após a lavagem, as lâminas foram incubadas com o anticorpo secundário, seguido pela peroxidase conjugada com a estreptavidina (LabVision). Como corante foi utilizada a diaminobenzidina (DAB – DakoCytomation).

Para a marcação de RP e P-caderina, o anticorpo secundário foi associado com o polímero marcado com HRP (DakoCytomation) e imediatamente revelado com DAB. Os tecidos foram então contra-corados com hematoxilina de Mayer, desidratados e fixados com uma solução de montagem permanente (Zymed, San Francisco, CA, USA). Em cada ciclo foram incluídos controlos positivos, para garantir a fiabilidade dos testes. O tecido mamário não neoplásico e o tecido mamário normal em volta das células neoplásicas foram considerados controlos internos.

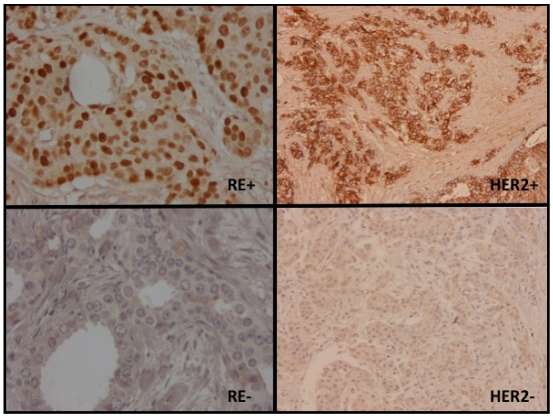


Figura 4 . Aspecto dos TMA's para RE e HER. Imagem com marcação positiva (superior) e com marcação negativa (inferior)

A avaliação dos TMA's foi efectuada por um patologista experiente (Prof. Doutor Fernando Schmitt), por forma a garantir a reprodutibilidade entre as observações.

Critérios de positividade

Todos os casos com marcação nuclear inequívoca para RE e RP em ≥10% das células neoplásicas foram considerados positivos.

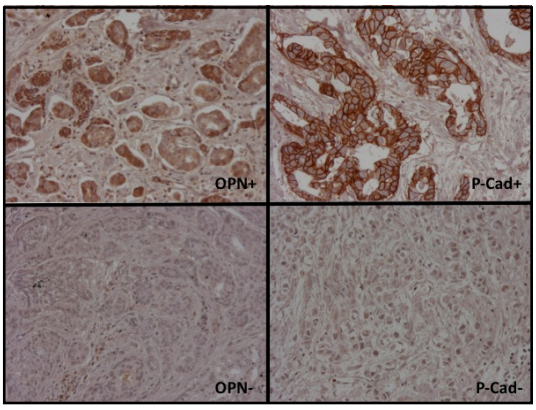


Figura 5 . Aspecto dos TMA's para OPN e P-cad. Imagem com marcação positiva (superior) e com marcação negativa (inferior)

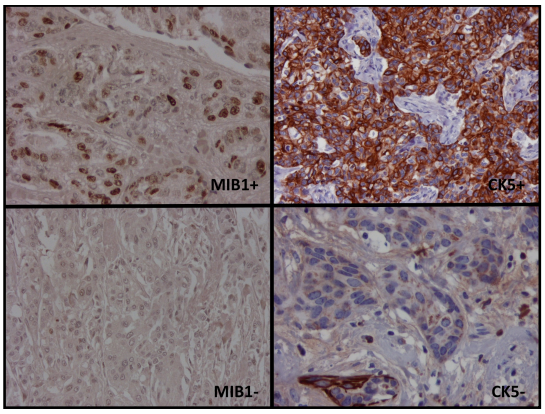


Figura 6 . Aspecto dos TMA's para RE e HER. Imagem com marcação positiva (superior) e com marcação negativa (inferior)

Todos os casos com marcação membranar de P-caderina e marcação citoplasmática de CK5, em ≥10% das células neoplásicas foram considerados positivos.

A expressão de HER2 foi avaliada de acordo com o sistema de classificação DakoCytomation HercepTest e os casos foram considerados positivos (sobre-expressão) para HER2 quando a marcação foi classificada como 3+.

A OPN foi considerada positiva sempre que qualquer marcação citoplasmática foi detectada em células neoplásicas e foi também avaliada na componente estromal do tumor.

O MIB-1 (Ki67) ≥15% foi considerado como alto índice proliferativo e <15% como baixo índice proliferativo.

Classificação molecular

A classificação molecular foi originalmente determinada através da análise de perfis de expressão génica em cancros da mama, aos quais correspondem expressões particulares de alguns marcadores imunohistoquímicos[38-40, 86, 90, 91]:

1. Luminal A – positivo para RE ou RP; negativo para HER2
2. Luminal B – positivo para RE ou RP; positivo para HER2 ou com elevado índice proliferativo
3. Her2neu positivo – negativo para RE ou RP; sobre-expressão de HER2
4. Basal – negativo para RE, RP e HER2, mas positivo para CK5/6, EGFR ou P-caderina. (Este constitui um subgrupo da categoria tradicional *triplo-negativos* [RE-, RP- e HER2-] e tem pior prognóstico) [86, 92]
5. Normal / Inclassificável - negativo para RE, RP, HER2, CK5/6, EGFR ou P-caderina.

As principais divisões na classificação molecular são efectuadas com base na expressão dos Receptores Hormonais (RE ou RP) e HER2.

Nos tumores positivos para RE, distinguem-se as categorias Luminal-A (RE+ e HER2 -) e Luminal B (RE+ e HER2 +). Nos tumores negativos para RE, distinguem-se as categorias HER2 (RE-, HER2+), basal (RE-, HER2- e pelo menos um marcador de diferenciação basal – CK5/6, EGFR, P-caderina) e inclassificável (RE-, HER2-, marcadores basais negativos).[93]

Resultados

Caracterização das doentes

Todas as doentes participantes no estudo eram do sexo feminino e a idade média à data de diagnóstico foi de 53,7 anos. A maioria das doentes foi submetida a mastectomia (67,2%) e 77% das doentes apresentavam estadio I ou II, de acordo com a classificação de TNM. O tipo histológico predominante foi o carcinoma ductal (87%) e aproximadamente metade das doentes (50,8%) tinham carcinomas de Grau II de Bloom e Richardson. O Carcinoma Ductal *in situ* associado ao tumor invasor estava presente em 59,7% das doentes e em 73% dos casos era de alto grau. Cerca de ¾ das doentes (77,7%) apresentavam tumores T1 ou T2, apresentando um tamanho médio de 39,5mm. Relativamente à invasão vascular, 47% apresentavam invasão linfática e 19% apresentavam invasão venosa. Quase metade das doentes (45,6%) apresentavam axilas negativas (N0). A distância média à margem de secção mais próxima foi de 8mm e o IPN médio foi de 4,8.

Mais de 2/3 das doentes (68,7%) apresentavam RE positivos, enquanto que apenas 52,3% apresentavam positividade para RP. Das 87 doentes em quem foi inicialmente estudada a expressão de Her2neu, 45% apresentaram sobre-expressão.

Dois terços das doentes (66,4%) realizaram terapêutica adjuvante com hormonoterapia, 43,4% realizou radioterapia adjuvante e apenas 37% das doentes não necessitaram de tratamento com quimioterapia (20% das doentes realizaram quimioterapia neo-adjuvante pré-operatória e 43% realizaram quimioterapia adjuvante).

A maioria das recidivas ocorreram na mama restante ou na parede torácica (73%) e 56% das doentes com recidiva, foram submetidas a nova intervenção cirúrgica. Após um tempo médio de *follow-up* de 93 meses (~8 anos), 69% das doentes da amostra encontram-se vivas.

Padrão clínico-patológico dos casos e dos controlos

Relativamente às diferenças no padrão clínico-patológico encontrado entre os 2 grupos (Tabela 3), foram encontradas associações significativas em:

Tipo de Cirurgia – no grupo de controlo, 51,9% das doentes foram tratadas com cirurgia conservadora, enquanto que no grupo de doentes com recidiva (casos), 81.4% das doentes foram submetidas a mastectomia. Em análise univariada, isto traduz um *Odds-ratio* de 1,69 para a mastectomia ($p<0,001$). Analisando os restantes parâmetros clínico-patológicos avaliados, podemos concluir que a cirurgia conservadora aparece associada a factores de melhor prognóstico (tumores mais pequenos, sem invasão ganglionar, sem invasão venosa ou linfática e com estadios

mais precoces - Tabela 4).

Estadio TNM – nas doentes com recidiva loco-regional, 38,6% das doentes pertenciam ao Estadio III, comparado com apenas 2% no grupo de controlo. (p<0,001).

Grau histológico – 43,9% das doentes com recidiva eram portadoras de tumores com grau III, enquanto que no grupo de controlo este grau histológico era encontrado em apenas 20,4% (p<0,001). O *Odds-ratio (OR)* estimado é de 1,46 para as doentes com grau II e 2,22 para as doentes com grau III.

Grau nuclear do CDIS, quando presente – A presença de CDIS, não foi associada de forma significativa com a "probabilidade de recidiva". Contudo, quando presente CDIS, o seu grau nuclear mais elevado correlacionou-se com uma maior probabilidade de recidiva (85% das vezes o CDIS era de alto grau no grupo dos "casos", enquanto que no grupo de controlo estava presente em apenas 55,6% das doentes – p=0,012).

Tamanho – o tamanho médio do tumor foi de 46mm nos casos e de 30mm nos controlos (p=0,002). O OR estimado para cada grupo de T, de acordo com a classificação de TNM (T1=1) é de 1,8 para T2, 3,8 para T3 e 2,0 para T4.

Permeação linfovascular – a permeação vascular linfática (OR – 2,97) e venosa (OR – 15,8), associou-se de forma estatisticamente significativa (p<0,001) à recidiva local. Dos doentes sem evidência de recidiva, apenas 2% apresentavam invasão venosa, comparado com 32,3% nos doentes com recidiva. Já relativamente à invasão linfática, estava presente em 66,7% dos casos e 22,4% dos controlos.

Invasão ganglionar – 76,1% dos doentes com recidiva loco-regional, apresentavam invasão ganglionar à data de diagnóstico, comparado com 27,5% dos doentes sem recidiva (OR – 2,6 para N1). O número de gânglios estudados foi semelhante entre os 2 grupos (11,7 nos casos vs 13,1 nos controlos, p=0,2), embora o número de gânglios invadidos tenha sido em média superior no grupo das recidivas (5,17 vs 0,94; p<0,001).

Índice Prognóstico de Nottingham (IPN) – o IPN médio foi significativamente (p<0,001) maior no grupo de doentes com recidiva (5,56 vs. 3,80.)

Receptores Hormonais – 85% das doentes do grupo de controlo apresentavam RE positivo, comparado com 57,6% das doentes com recidiva (OR – 0,68; p=0,004). Nos RP, apenas 39,6% das doentes com recidiva expressavam positividade, comparado com 70,3% no grupo de controlo (OR – 0,56; p= 0,05).

Hormonoterapia adjuvante – foi mais frequente a utilização de HT adjuvante no grupo de controlo (82,6%), do que no grupo das recidivas (55,7%), o que traduz um OR de 0,67 (p=0,003).

Tabela 3. Caracterização do padrão clínico-patológico de acordo com o grupo de recidiva.

	Casos (n=70)	Controlos (n=52)	p
Idade			0,84
Idade	53,9(±16,3)	53,4 (±11,5)	
Lateralidade			0,27
Dta	32 (45,7%)	29 (55,7%)	
Esq	38 (54,3%)	23 (44,3%)	
Tipo Cirurgia			**<0,001**
Cirurgia Conservadora	13 (18,6%)	27 (51,9%)	
Mastectomia	57 (81,4%)	25 (48,1%)	OR – 1,69 (1,25 – 2,29)
Estadio TNM			**<0,001**
I	6 (8,6%)	23(45,1%)	
IIa	19 (27,1%)	20 (39,2%)	
IIb	18 (25,7%)	7 (13,7%)	
IIIa	11 (15,7%)	1(2%)	
IIIb	16 (22,9%)	0(0,0%)	
Tipo Histológico			0,657
Carcinoma Ductal	60 (85,7%)	46 (88,5%)	
Carcinoma não-Ductal	10 (14,3%)	6 (11,5%)	
Grau			**<0,001**
1	1 (1,5%)	13 (26,5%)	
2	36 (54,5%)	26 (53,1%)	OR= 1,46 (1,16-1,83)
3	29 (43,9%)	10 (20,4%)	OR= 2,22 (1,39 – 3,56)
CDIS associado			0,284
N	25 (36,3%)	23 (46,0%)	
S	44 (63,7%)	27 (54,0%)	
Grau CDIS			**0,012**
Baixo	0 (0%)	3 (11,1%)	
Intermédio	6 (15,0%)	9 (33,3%)	
Alto	34 (85,0%)	15 (55,6%)	
T			**<0,001**
1	15 (21,4%)	30 (58,8%)	
2	31 (44,3%)	18 (35,3%)	OR – 1,80 (1,18 – 2,72)
3	8 (11,4%)	3 (5,9%)	OR – 3,82 (1,13 – 12.9)
4	16 (22,8%)	0 (0,0%)	OR – 2,08 (1,43 – 2,97)
T (mm – médio)	**46,13 (±30,7)**	**30,31 (±24,47)**	**0,002**

Invasão vascular			
Invasão linfática			**<0,001**
N	21 (33,3%)	38 (77,6%)	
S	42 (66,7%)	11 (22,4%)	OR= 2,97
Invasão venosa			**<0,001**
N	42 (57,7%)	48 (98,0%)	
S	20 (32,3%)	1 (2,0%)	OR= 15,8
N			**<0,001**
0	15 (23,9%)	37 (72,5%)	
1	38 (60,3%)	14 (27,5%)	OR= 2,6
2	9 (14,2%)	0	
3	1 (1,6%)	0	
N (estudados médio / **invadidos médio**)	11,67/**5,17**	13,10/**0,94**	0,239/**<0,001**
Margem			0,751
Margem (mm)	7,95(±12,11)	8,69 (±10,47)	
Nottingham			**<0,001**
Nottingham Médio	5,56 (±1,42)	3,80 (±0,98)	
RHE			**0,004**
Neg	25 (42,4%)	6 (15,0%)	
Pos	34 (57,6%)	34 (85,0%)	OR= 0,68
RHP			**0,05**
Neg	29 (60,4%)	11 (29,7%)	
Pos	19 (39,6%)	26 (70,3%)	OR= 0,56
QT			0,059
Não	25 (39,1%)	17 (34,0%)	
Adjuvante	22 (34,4%)	27 (54,0%)	
Primária	17 (26,6%)	6 (12,0%)	
RT			0,103
Não	44 (62,9%)	25 (48,1%)	
Sim	26 (37,1%)	27 (51,9%)	
HT			**0,003**
Não	31 (44,3%)	8 (17,4%)	
Sim	39 (55,7%)	38 (82,6%)	OR= 0,67

Tabela 4. Associação entre o tipo de cirurgia e os marcadores de prognóstico

	Mastectomia	Tumorectomia	p
Grau Histológico			0,321
1	7 (9,1%)	7(18,4%)	
2	44 (57,1%)	18(47,4%)	
3	26(33,8%)	13(34,2)	
T			0,021
1	24(29,6%)	21(52,5%)	
2	33(40,7%)	16(40,0%)	
3	10(12,3%)	1(2,5%)	
4	14(17,3%)	2(5,0%)	
N			<0,001
0	25(32,5%)	27(73%)	
1	44 (57,1%)	8(21,6%)	
2	8(10,4%)	1(2,7%)	
3	0(0%)	1(2,7%)	
Estadio TNM			0,001
I	12(14,8%)	17(42,5%)	
IIA	23(28,4%)	16(40,0%)	
IIB	22(27,2%)	3(7,5%)	
IIIA	10(12,3%)	2(5,0%)	
IIIB	14(17,3%)	2(5,0%)	
IV	0(0%)	0(0%)	
Invasão Venosa			0,049
Não	57(76,0%)	33(91,7%)	
Sim	18(24,0%)	3(8,3%)	
Invasão Linfática			<0,001
Não	30(39,5%)	29(80,6%)	
Sim	46(60,5%)	7(19,4%)	
RE			0,206
Neg	24(35,3%)	7(22,6%)	
Pos	44(64,7%)	24(77,4%)	
P-caderina			0,426
Neg	34(57,6%)	18(66,7%)	
Pos	25(42,4%)	9(33,3%)	

Classificação molecular

Relativamente ao tipo de classificação molecular utilizável com os marcadores imunohistoquímicos de rotina (separação em 3 categorias, de acordo com a positividade para RH e HER2), vemos que a maioria dos doentes expressa marcadores do tipo luminal, em ambos os grupos (70,7% nos casos vs 85,4% nos controlos). No grupo das doentes com recidiva, detecta-se uma maior quantidade de doentes com tumores *triplo-negativo* (20% vs. 8,3%), embora tal diferença não tenha significado estatístico (Tabela 5).

Tabela 5. Influência da classificação molecular na recidiva local

	Casos	Controlos	p
Classificação Molecular			0,167
Luminal	46 (70,7%)	41 (85,4%)	
HER2	6 (9,2%)	3 (6,3%)	
Triplo Negativo	13 (20,0%)	4 (8,3%)	

Análise multivariada

A análise multivariada pelo método de regressão logística (Tabela 6), identificou o grau histológico, o tamanho do tumor e a invasão ganglionar, como marcadores prognósticos independentes. O risco de recidiva loco-regional aumenta 3,8x por cada categoria do grau histológico, aumenta 4,7x por cada aumento de classe de T e 8,9x por cada aumento de estadio ganglionar.

Tabela 6. Regressão logística

	p	OR
Tipo de Cirurgia	,241	0,307
Grau Histológico	**,049**	**3,802**
T	**,034**	**4,672**
N	**,014**	**8,849**
Invasão Linfática	,251	3,215
Invasão Venosa	,495	2,857
RE	,530	0,464
Hormonoterapia	,960	0,942

Caracterização das recidivas

Avaliando apenas as doentes com recidiva loco-regional (Tabela 7), verificamos que a idade média da recidiva loco-regional foi de 57,4 anos , tendo ocorrido em média 41 meses após o tumor primitivo. A maioria das doentes apresentou recidiva da doença localizada à parede torácica (mama restante, pele, tecido celular subcutâneo ou músculo), sendo que 27,1% das doentes, manifestaram recidiva ganglionar axilar. Em 40% das doentes com recidiva loco-regional documentou-se progressão oncológica, com recidiva à distância. A sobrevivência média destas doentes foi de 75,3 meses após o tumor primitivo e de 33,6 meses após a recidiva, com uma mortalidade global de 54,3% aos 10 anos.

Tabela 7. Caracterização das recidivas

Idade Recidiva	57,4 a
Tempo livre de doença	41,2 m
Tipo Recidiva	
Local	72,9%
Regional	27,1%
Metastização	40%
Sobrevida média	75,3 m
Sobrevida após recidiva	33,6 m
Mortalidade global	54,3%

A recidiva loco-regional, aumentou de forma consistente com o tempo, sendo contudo mais frequente nos primeiros 2 anos após a doença original. Daí para diante, foi sendo diagnosticada de forma constante ao longo do tempo. A curva de sobrevivência nas doentes com recidiva, aparece paralela à curva de incidência da recidiva loco-regional, o que poderá traduzir uma associação directa entre as 2, constituindo assim a recidiva loco-regional um factor de risco (ou um marcador) precoce para progressão da doença e morte. (Figura 7)

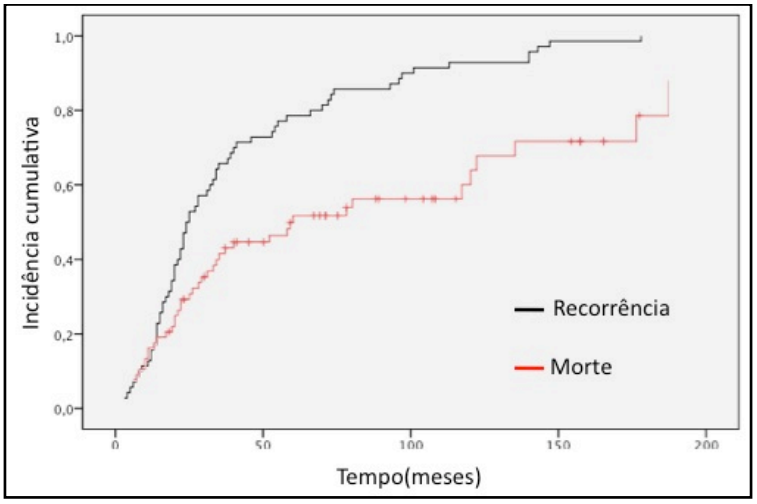


FIgura 7. Incidência cumulativa da recidiva loco-regional (preto) e de morte (vermelho). Incidência cumulativa no grupo de doentes com recorrência (100%) no final do período de follow-up. Cerca de 80% das doentes apresentaram recorrência nos primeiros 5 anos, altura em que ~60% das doentes se encontravam vivas.

Tabela 8. Avaliação da progressão da doença após recidiva local, de acordo com o tipo de cirurgia.

	Média (meses)	Mediana (meses)	P (log-Rank)
Tempo livre de doença			**<0,001**
Mastectomia	64,5	33	
Tumorectomia	132,9	178	
Sobrevivência			**0,002**
Mastectomia	131,9	142	
Tumorectomia	178,1	129	
Estado	**Vivo**	**Morto**	**<0,001**
Mastectomia	48 (58,5%)	34 (41,5%)	OR= 4,06
Tumorectomia	36 (90,0%)	4 (10,0%)	
Metastização	Sim	Não	0,66
Mastectomia	21 (26,2%)	59 (73,8%)	OR= 2,37
Tumorectomia	4 (10,0%)	36 (90,0%)	

Relativamente ao tipo de cirurgia inicial (Tabela 8), podemos observar que as doentes submetidas a mastectomia têm recidivas mais precoces do que as doentes submetidas a tumorectomia (64,5 vs 132,9 meses de sobrevivência livre de doença – p<0,001). A sobrevivência global é superior nas doentes submetidas a tumorectomia (178,1 vs. 131,9 meses – p=0,002). O risco de morte por cancro da mama é superior nas doentes submetidas a mastectomia (OR=4,06; <0,001), com uma sobrevivência aos 5 anos de 68%, comparada com 92% para as doentes submetidas a tumorectomia.

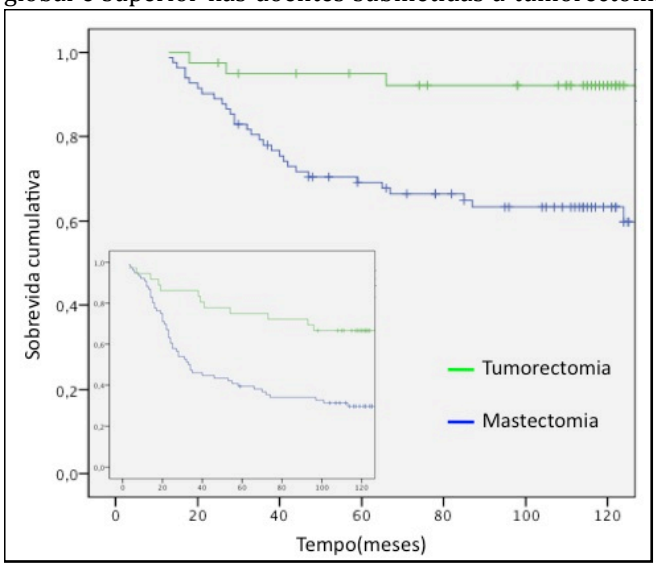


Figura 8. Sobrevida global, estratificada por tipo de cirurgia. Inserido no canto inferior esquerdo, tempo livre de doença, estratificado por cirurgia conservadora+RT (verde) ou mastectomia (azul).

Tissue Micro-Arrays e Marcadores moleculares

Relativamente à correlação encontrada entre o estudo imunohistoquímico primário, efectuado em peças tumorais à data de diagnóstico e a técnica de TMA's, constatamos existir uma diferença significativa entre ambas as classificações. A correlação (k) para o RE foi de 0,53 e para RP de 0,46. Estes valores, (considerando a avaliação histológica em peça tumoral como o "gold-standard"), traduzem uma sensibilidade de 70% e de 57% para os RE e RP, respectivamente. A especificidade do exame é de 94% para RE e de 85% para RP (Tabela 9).

Tabela 9. Receptores hormonais: histologia vs. TMA's

	Receptor Estrogéneos		Receptor Progesterona	
TMA's / Histologia	Positivo	Negativo	Positivo	Negativo
Positivo	32	14	17	13
Negativo	2	21	3	23
Correlação (k)	0,53		0,46	
Sensibilidade TMA's	70%		57%	
Especificidade TMA's	94%		85%	

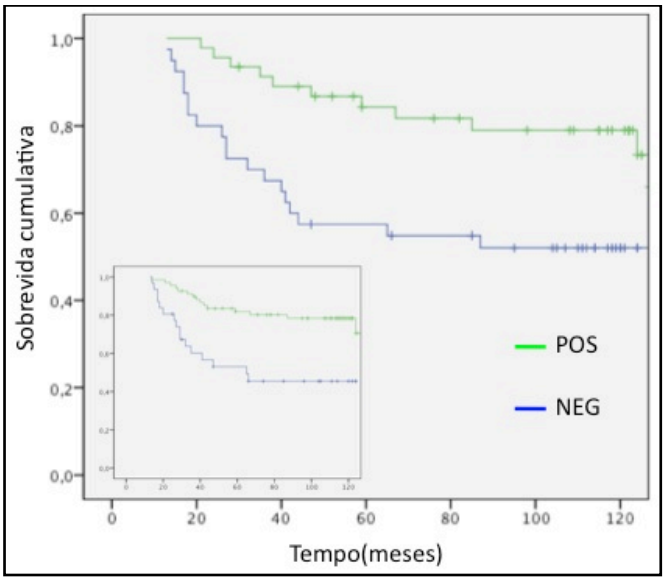


Figura 9. Sobrevida de acordo com estado dos receptores hormonais. Detecta-se claramente uma melhor sobrevida nos doentes com expressão positiva de RE (verde), comparado com os doentes negativos para RE (azul). Gráfico maior: Avaliação dos resultados por TMA's (p=0,007). Gráfico menor no canto inferior esquerdo: Avaliação dos resultados por histologia clássica (p<0,001)

As curvas de sobrevivência obtidas, quer através da avaliação histológica da peça tumoral, quer através dos TMA's, são significativamente diferentes de acordo com a positividade para os RE e sobreponíveis entre si (Figura 9).

A classificação molecular dos tumores (Tabela 10), efectuada por TMA's, não revelou diferenças estatisticamente significativas entre os grupos. No grupo de doentes com recidiva, 37,7% apresentavam tumores tipo Luminal A, 20,8% tipo Luminal B, 15,1% tipo HER2 e 22,6% do tipo Basal. Já no grupo de controlo as percentagens eram respectivamente de 60,6%, 6,0%, 12,1% e 21,3%.

A positividade para RE foi de 50,9% no grupo de doentes com recidiva e de 39,4% no grupo de controlo (p=0,29). Os RP estavam positivos em 62,3% dos casos e em 60,6% dos controlos (p=0,88). A sobre-expressão do receptor Her2neu foi detectada em 71,7% dos casos de recidiva e em 63,6% dos controlos e a marcação com CK5 foi positiva em 71,7% das doentes com recidiva e 78,8% do grupo de controlo (p=0,46).

Relativamente aos "novos" marcadores moleculares examinados, a P-caderina foi positiva em 45,3% dos casos e 30,3% dos controlos (p=0,17), calculando-se um OR de 1,49. A expressão de osteopontina no estroma foi positiva em 15,1% dos casos e 3,0% dos controlos (OR – 4,98; p=0,08). Em 41% dos tumores com recidiva, detectou-se positividade para a osteopontina nas células tumorais, comparado com 27,3% nos tumores que não recidivaram (OR – 1,52; p=0,18). O MIB-1 estava positivo (>15%) em 64,1% dos casos e em 81,8% dos controlos (p=0,08), o que traduz um OR de 1,97.

Tabela 10. Avaliação dos factores moleculares por TMA's

TMA's	Casos (n=53)	Controlos (n=33)	p
RHE			0,29
Negativo	27 (50,9%)	13 (39,4%)	
Positivo	26 (49,1%)	20 (60,6%)	
RHP			0,88
Negativo	33 (62,3%)	20 (60,6%)	
Positivo	20 (47,7%)	13 (39,4%)	
HER2			0,43
Negativo	38 (71,7%)	21 (63,6%)	
Positivo	15 (28,3%)	12 (36,4%)	
CK5			0,46
Negativo	38 (71,7%)	26 (78,8%)	
Positivo	15 (28,3%)	7 (21,2%)	
Classificação Molecular TMA			0,16
Luminal A	20 (37,7%)	20 (60,6%)	
Luminal B	11 (20,8%)	2 (6,0%)	
HER2	8 (15,1%)	4 (12,1%)	
Basal	12 (22,6%)	7 (21,3%)	
Inclassificável	2 (3,8%)	0 (0%)	
Classificação molecular			0,167
Luminal	46 (70,8%)	41 (85,4%)	
HER2	6(9,2%)	3(6,2%)	
Triplo negativo	13(20%)	4(8,35)	
P-caderina			0,17
Negativo	29 (54,7%)	23 (69,7%)	
Positivo	24 (45,3%)	10 (30,3%)	OR= 1,49
Osteopontina Estroma			0,08
Negativo	45 (84,9%)	32 (97,0%)	
Positivo	8 (15,1%)	1 (3,0%)	OR= 4,98
Osteopontina Tumor			0,18
Negativo	31 (58,5%)	24 (72,7%)	
Positivo	22 (41,5%)	9 (27,3%)	OR= 1,52
MIB-1			0,08
Negativo	34 (64,1%)	27 (81,8%)	
Positivo	19 (35,9%)	6 (18,2%)	OR – 1,97

A expressão de RE, associou-se a graus histológicos menos graves, sem que tenham sido identificadas outras associações significativas. (Tabela 11)

Tabela 11. Associação entre estado RE e outros factores de prognóstico

		RE NEG		RE POS		
		N	(%)	N	(%)	p
Estadio TNM	I	4	13,3%	18	26,5%	0,407
	IIA	11	36,7%	22	32,4%	
	IIB	7	23,3%	11	16,2%	
	IIIA	5	16,7%	6	8,8%	
	IIIB	3	10,0%	11	16,2%	
Grau Histológico	1	2	7,1%	10	15,2%	<0,001
	2	7	25,0%	41	62,1%	
	3	19	67,9%	15	22,7%	
T	1	8	26,7%	27	39,7%	0,378
	2	15	50,0%	24	35,3%	
	3	4	13,3%	6	8,8%	
	4	3	10,0%	11	16,2%	
N	0	10	33,3%	33	54,1%	0,134
	1	17	56,7%	23	37,7%	
	2	2	6,7%	5	8,2%	
	3	1	3,3%	0	,0%	
MIB-1	Neg	13	56,5%	36	78,3%	0,061
	Pos	10	43,5%	10	21,7%	
Invasão Linfática	Não	14	50,0%	34	53,1%	0,782
	Sim	14	50,0%	30	46,9%	
HT Adjuvante	Não	23	74,2%	10	15,4%	<0,001
	Sim	8	25,8%	55	84,6%	
Índice Nottingham		5,7		4,5		

Uma análise multivariada por regressão logística, avaliando o estado dos receptores hormonais e a realização de hormonoterapia adjuvante, atribui um valor estatisticamente significativa apenas à primeira variável. (Tabela 12)

Tabela 12. Regressão logística

Variável	p
RE	0,021
Hormonoterapia	0,807

Tabela 13. Classificação molecular e factores de mau prognóstico

		Luminal		Basal		HER2		
		N	(%)	N	(%)	N	(%)	p
Estadio TNM	I	22	25,3%	1	6,2%	1	11,1%	0,407
	IIA	26	29,9%	6	37,5%	3	33,3%	
	IIB	19	21,8%	3	18,8%	3	33,3%	
	IIIA	8	9,2%	4	25,0%	0	,0%	
	IIIB	12	13,8%	2	12,5%	2	22,2%	
Grau Histológico	1	11	13,3%	2	12,5%	0	,0%	<0,001
	2	52	62,7%	4	25,0%	2	22,2%	
	3	20	24,1%	10	62,5%	7	77,8%	
T	1	32	36,8%	3	18,8%	3	33,3%	0,638
	2	35	40,2%	8	50,0%	4	44,4%	
	3	8	9,2%	3	18,8%	0	,0%	
	4	12	13,8%	2	12,5%	2	22,2%	
N	0	39	48,8%	5	29,4%	2	22,2%	0,011
	1	35	43,8%	9	52,9%	6	66,7%	
	2	6	7,5%	3	17,6%	0	,0%	
	3	0	,0%	0	,0%	1	11,1%	
MIB-1	Neg	50	76,9%	5	41,7%	6	66,7%	0,045
	Pos	15	23,1%	7	58,3%	3	33,3%	
Invasão Linfática	Não	42	51,2%	8	50,0%	5	55,6%	0,963
	Sim	40	48,8%	8	50,0%	4	44,4%	
Índice Nottingham			4,6		5,6		6,0	

Tabela 14. Avaliação do MIB-1 em tumores RE+ e em doentes N0

RE+	Casos (n=26)	Controlos (n=20)	p	Sobrevivência 5 anos
MIB			0,33	
Negativo	19 (73,1%)	17 (85,0%)		72%
Positivo	7 (26,9%)	3 (15,0%)		72%
N0	Casos (n=7)	Controlos (n=23)	p	
MIB			0,132	
Negativo	3(42,8%)	17(73,9%)		
Positivo	4(57,2%)	6(26,1%)		

A avaliação da influência do MIB (Ki67) na recidiva local, analisando apenas os tumores positivos para RE (Tabela 14), revelou que 26,9% dos casos e 15% dos controlos eram positivos para MIB (p=0,33), sendo que apenas no grupo de doentes com expressão de RE, o MIB-1 também não

parece estar associado com a probabilidade de recidiva. Nos tumores N0, também não se detectou associação significativa com o MIB-1, apesar de terem elevado índice proliferativo 57% dos casos e 26% dos controlos.

A P-caderina foi negativa em 70,8% dos carcinomas do tipo luminal (Tabela 15), e negativa em 77,8% dos tumores HER2 e 66,7% dos tumores *triplo negativos*, o que traduz uma associação significativa (p=0,002) entre a P-caderina e os tumores de tipo não-luminal. A P-caderina, também se associou a tumores com maior índice proliferativo (p=0,003), com 64% dos tumores que expressam P-caderina positivos para MIB-1 vs. 36% nos tumores negativos para P-caderina.

Tabela 15. Associação entre a p-caderina, o tipo molecular e o índice proliferativo

P-caderina	Positivo (n=34)	Negativo (n=52)	p
Tipo molecular			**0,002**
Luminal	19 (29,2%)	46 (70,8%)	
HER2	7 (77,8%)	2 (22,2%)	
Triplo negativo	8 (66,7%)	4 (33,3%)	
MIB-1			**0,003**
Positivo	16 (64,0%)	9 (36,0%)	
Negativo	18 (29,5%)	43 (70,5%)	

Tabela 16. Associação entre a P-caderina, osteopontina no estroma, MIB-1 e os marcadores de prognóstico

	P-caderina					Osteopontina					MIB-1				
	NEG		POS		p	NEG		POS		p	NEG		POS		p
	N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)		N	(%)	N	(%)	
Estadio															
I	8	15,4%	7	20,6%	,807	15	19,5%	0	,0%	,034	10	16,4%	5	20,0%	,883
IIA	15	28,8%	11	32,4%		23	29,9%	3	33,3%		19	31,1%	7	28,0%	
IIB	13	25,0%	5	14,7%		17	22,1%	1	11,1%		14	23,0%	4	16,0%	
IIIA	7	13,5%	4	11,8%		7	9,1%	4	44,4%		8	13,1%	3	12,0%	
IIIB	9	17,3%	7	20,6%		15	19,5%	1	11,1%		10	16,4%	6	24,0%	
Grau histológico															
1	5	10,0%	4	12,1%	,008	9	12,2%	0	,0%	,035	8	13,6%	1	4,2%	,015
2	32	64,0%	10	30,3%		40	54,1%	2	22,2%		34	57,6%	8	33,3%	
3	13	26,0%	19	57,6%		25	33,8%	7	77,8%		17	28,8%	15	62,5%	
T															
1	15	28,8%	12	35,3%	,325	24	31,2%	3	33,3%	,628	20	32,8%	7	28,0%	,519
2	20	38,5%	14	41,2%		31	40,3%	3	33,3%		23	37,7%	11	44,0%	
3	8	15,4%	1	2,9%		7	9,1%	2	22,2%		8	13,1%	1	4,0%	
4	9	17,3%	7	20,6%		15	19,5%	1	11,1%		10	16,4%	6	24,0%	
N															
0	17	36,2%	13	39,4%	,779	29	39,7%	1	14,3%	,273	20	35,1%	10	43,5%	,260
1	25	53,2%	16	48,5%		37	50,7%	4	57,1%		32	56,1%	9	39,1%	
2	4	8,5%	4	12,1%		6	8,2%	2	28,6%		5	8,8%	3	13,0%	
3	1	2,1%	0	,0%		1	1,4%	0	,0%		0	,0%	1	4,3%	
Índice Nottingham															
		4,9		5,4			5,0		5,7			5,0		5,1	
Classificação Molecular															
Luminal A	32	61,5%	8	23,5%	<0,001	39	50,6%	1	11,1%	,161	38	62,3%	2	8,0%	<0,001
Luminal B	9	17,3%	4	11,8%		11	14,3%	2	22,2%		3	4,9%	10	40,0%	
Basal	5	9,6%	14	41,2%		16	20,8%	3	33,3%		9	14,8%	10	40,0%	
HER2	4	7,7%	8	23,5%		9	11,7%	3	33,3%		9	14,8%	3	12,0%	
Inclassificável	2	3,8%	0	,0%		2	2,6%	0	,0%		2	3,3%	0	,0%	
Receptores Estrogéneos															
NEG	6	16,7%	17	51,5%	0,002	19	31,7%	4	44,4%	,448	13	26,5%	10	50,0%	0,061
POS	30	83,3%	16	48,5%		41	68,3%	5	55,6%		36	73,5%	10	50,0%	

Sobrevivência livre de doença e Sobrevivência global

A análise da evolução temporal da doença oncológica, nomeadamente através da avaliação do tempo livre de doença e da sobrevivência (Tabela 17) revela que, para os doentes com recidiva loco-regional, o tempo livre de doença é significativamente maior nos tumores RE+, RP+, do Tipo Luminal e P-caderina negativos. Neste grupo de doentes, o único marcador com efeito directo na sobrevivência é a positividade para RE. Nos tumores RE+, temos uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 62,6%, com uma sobrevivência média de 107,2 meses. Relativamente aos "novos" marcadores moleculares estudados, a positividade para P-caderina traduziu-se num menor tempo livre de doença (25,4 vs 49,8 meses; p=0,01) e numa menor sobrevivência (96,7 vs 106,7

meses; p=0,14), com uma sobrevivência aos 5 anos de 34,6% para os tumores positivos para P-caderina e de 69,0% para os tumores negativos para P-caderina. Nos restantes marcadores (Osteopontina no estroma e tumor e MIB-1), não se verificaram diferenças significativas entre os 2 grupos.

Tabela 17. Tempo livre de doença e sobrevivência no grupo de doentes com recidiva

	Tempo livre de doença			Sobrevivência			
	Média (meses)	Mediana (meses)	P (log-Rank)	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	P (log-Rank)
RHE			**0,004**				**0,03**
Negativo	20,4	18		56,5	41	40,9%	
Positivo	36,5	25		107,2	124	62,6%	
RHP			**0,003**				0,16
Negativo	19,3	19		54,9	36	38,1%	
Positivo	34,5	34		89,2	67	57,9%	
HER2			0,09				0,41
Negativo	44,1	25		104,3	124	57,8%	
Positivo	25,1	22		63,9	59	43,6%	
CK5			0,66				0,34
Negativo	39,4	27		100,8	87	62,0%	
Positivo	37,1	18		73,9	41	33,3%	
Class. Molecular			**<0,001**				**0,07**
Luminal	45,6	28		115,6	124	66,1%	
HER2	19,0	19		56,0	32	33,3%	
Triplo Negativo	17,8	16		82,6	29	35,9%	
P-caderina			**0,01**				0,14
Negativo	49,8	34		106,7	124	69,0%	
Positivo	25,4	19		96,7	41	34,6%	
Osteopontina Estroma			0,32				0,89
Negativo	41,2	23		97,7	67	54,9%	
Positivo	24,9	25		55,8	44	43,8%	
Osteopontina Tumor			0,98				0,84
Negativo	38,7	23		97,8	59	49,8%	
Positivo	38,7	25		89,1	67	59,1%	
MIB-1			0,84				0,68
Negativo	38,5	27		89,8	65	52,4%	
Positivo	39,2	19		112,6	67	57,4%	

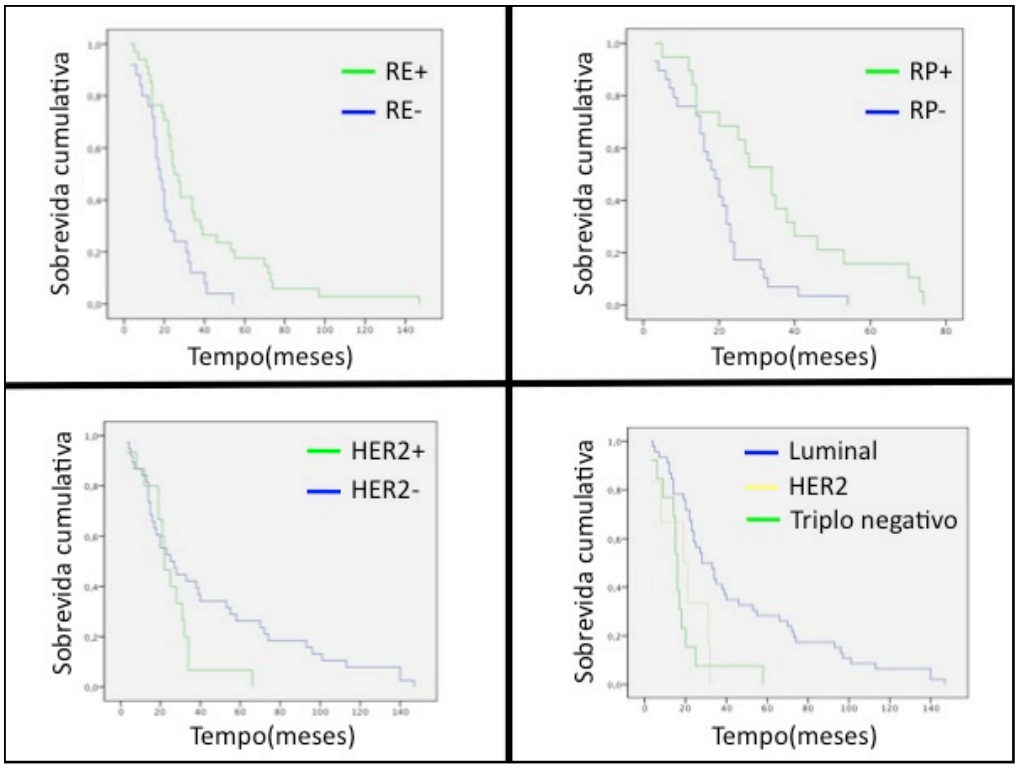


Figura 10. Sobrevida livre de doença. Nas doentes com recidiva loco-regional. Curvas relativas ao Estado para Receptores Hormonais (superiores), HER2 (canto inferior esquerdo) e tipo molecular (canto inferior direito)

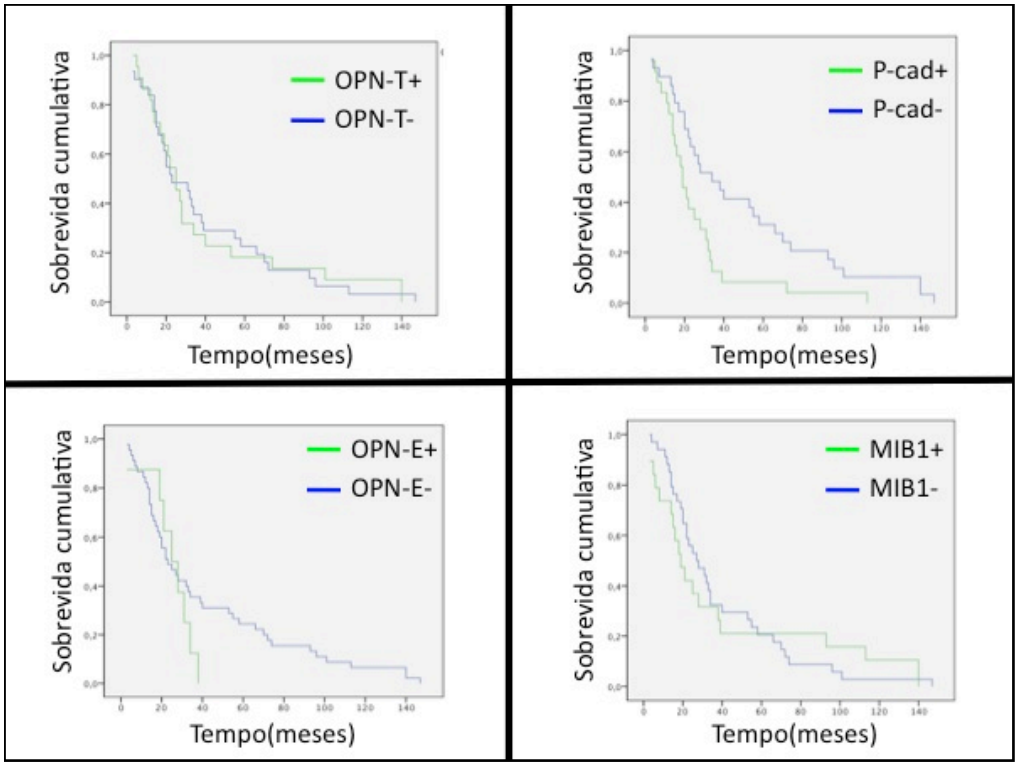


Figura 11. Sobrevida livre de doença. Nas doentes com recidiva loco-regional. Curvas relativas ao Estado para Osteopontina no Tumor e no Estroma (esquerdos), P-caderina (canto superior direito) e índice proliferativo (canto inferior direito)

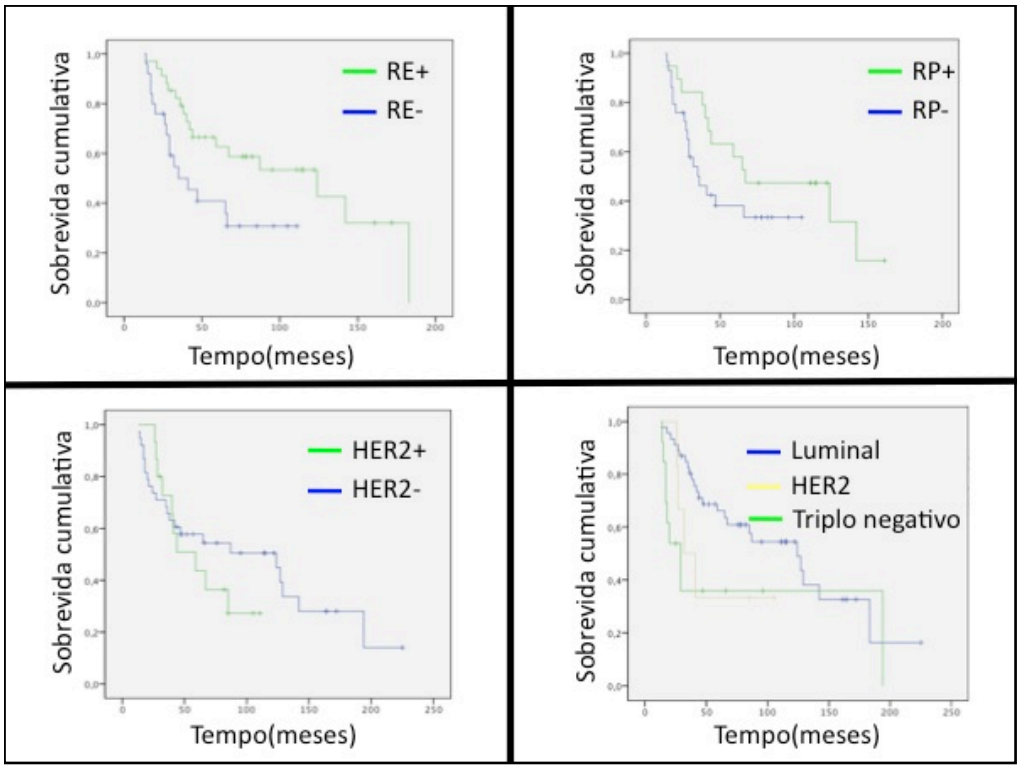


Figura 12. Sobrevida global. Nas doentes com recidiva loco-regional. Curvas relativas ao Estado para Receptores Hormonais (superiores), HER2 (canto inferior esquerdo) e tipo molecular (canto inferior direito)

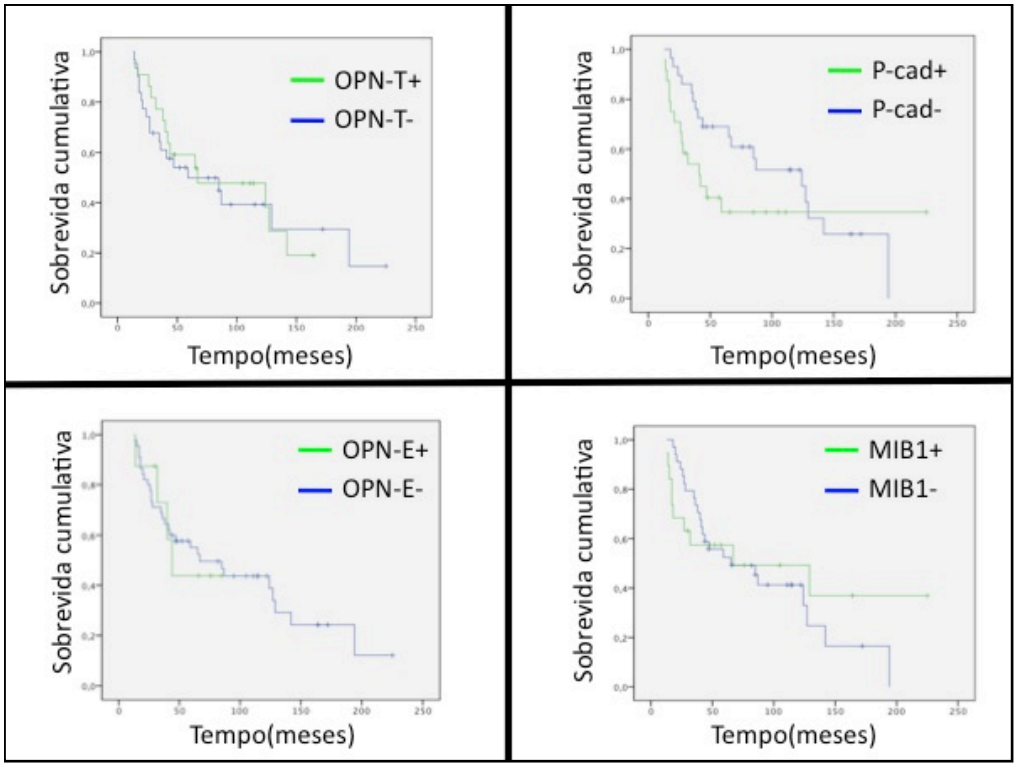


Figura 13. Sobrevida global. Nas doentes com recidiva loco-regional. Curvas relativas ao Estado para Osteopontina no Tumor e no Estroma (esquerdos), P-caderina (canto superior direito) e índice proliferativo (canto inferior direito)

Relativamente à análise do tempo livre de doença e da sobrevivência na globalidade da amostra (Tabela 18), verifica-se que desta interacção entre a associação com a recidiva loco-regional e com o seu "timing" de desenvolvimento e prognóstico após recidiva, os tumores com positividade para RE apresentam um tempo livre de doença médio de 83,1 meses (40,5 meses para os tumores com RE negativos; p=0,001) com uma sobrevivência média de 140,5 meses (vs 73,8 meses nos RE negativo; p<0,001) e uma sobrevivência aos 5 anos de 81,9% vs 53,1%.

Relativamente à classificação molecular, os carcinomas do tipo luminal, apresentam maior tempo livre de doença (85,0 meses vs 53,0 para HER2 vs 42,8 para *triplo negativo*; p=0,016), maior sobrevivência média (148,5 meses vs 81,2 vs 110,1; p=0,02) e maior sobrevivência aos 5 anos com 82,5% para o tipo luminal, 55,6% para o tipo HER2 e 51,8% para o tipo *triplo negativo*.

A P-caderina, associa-se a pior prognóstico, com uma diminuição do tempo livre de doença de 90,5 meses (P-caderina negativo) para 55,2 meses (P-caderina positivo); p=0,017. Contudo, esta "antecipação" da recidiva, não traz efeitos significativos a nível de sobrevivência global, estimando-se a sobrevivência média em 135,5 meses e 136,2 meses respectivamente (p=0,19), apesar da diferença na sobrevivência aos 5 anos (82,7% vs 58,3%).

A expressão de Osteopontina no estroma também se associa a uma diminuição do tempo livre de doença (34 meses vs 83 meses para as doentes sem expressão de osteopontina no estroma), sem que se consiga documentar associação com a sobrevivência global (p=0,29), com sobrevivências médias de 70,6 e 134,6 meses respectivamente e uma taxa de sobrevivência aos 5 anos de 50,8% e 73,9%.

A avaliação do MIB-1 revela resultados contraditórios, com uma diminuição do tempo livre de doença nos doentes com expressão de MIB-1 (63,1 meses vs 86,3 meses; p=0,07), mas um aumento do tempo médio de sobrevivência (p=0,78) de 125,1 meses (MIB-1 negativo) para 135,4 meses (MIB-1 positivo), associado a uma taxa de sobrevivência aos 5 anos inferior nos doentes com expressão de MIB-1 (67,8% vs 73,7%).

Tabela 18. Avaliação de Sobrevida global e Sobrevida Livre de Doença - todas as doentes

	Sobrevida Livre de Doença			Sobrevida			
	Média (meses)	Mediana (meses)	p(log-Rank)	Média (meses)	Mediana (meses)	% aos 5 anos	p(log-Rank)
RHE			**0,001**				**<0,001**
Negativo	40,5	20		73,8	65	53,1%	
Positivo	83,1	72		140,5	183	81,9%	
Class. Molecular			**0,016**				**0,02**
Luminal	85,0	93		148,5	183	82,5%	
HER2	53,0	31		81,2	NA	55,6%	
Triplo Negativo	42,8	17		110,1	194	51,8%	
P-Caderina			**0,017**				0,10
Negativo	90,5	101		135,5	142	82,7%	
Positivo	55,2	28		136,2	NA	58,3%	
OPN Estroma			**0,024**				0,29
Negativo	83,0	93		134,6	142	73,9%	
Positivo	34,0	28		70,6	NA	50,8%	
MIB-1			0,07				0,78
Negativo	86,3	74		125,1	142	73,7%	
Positivo	63,1	28		135,4	129	67,8%	

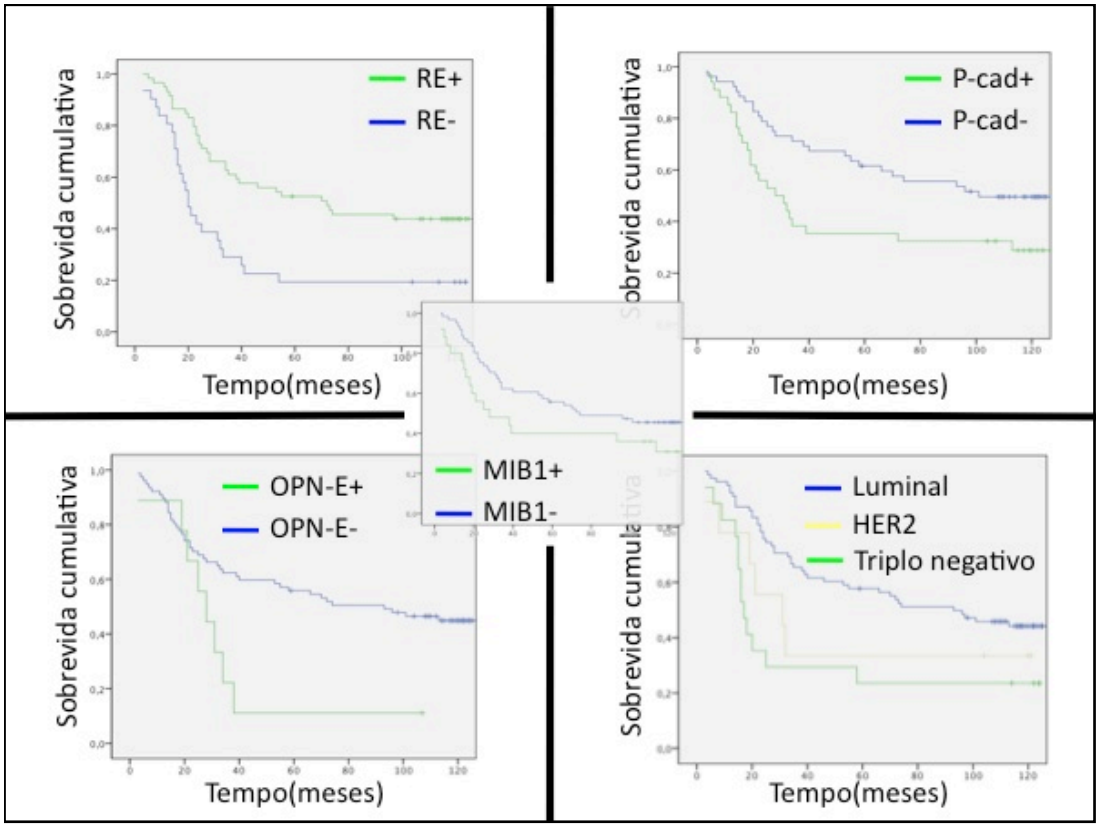


Figura 14. Sobrevida livre de doença. Todas as doentes. Do centro, no sentido horário: Índice proliferativo, P-caderina, Classificação molecular, Osteopontina no Estroma e Receptores de Estrogéneos.

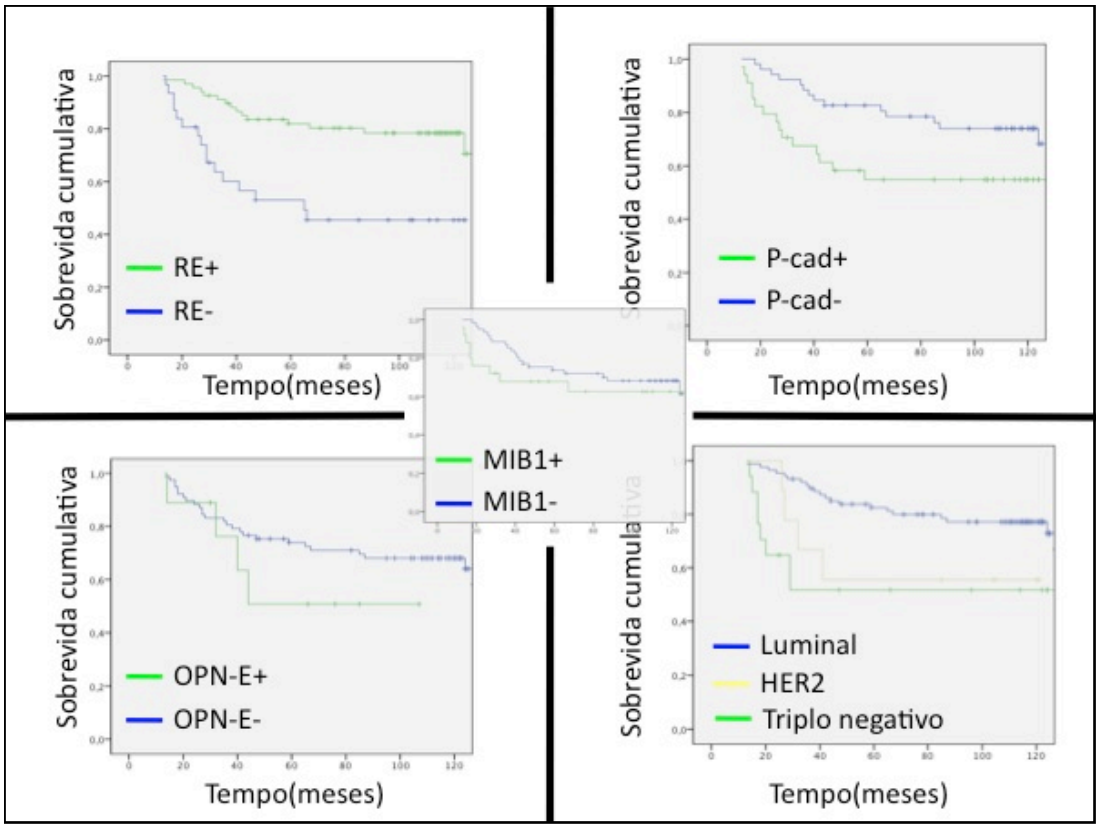


Figura 15. Sobrevida global. Todas as doentes. Do centro, no sentido horário: Índice proliferativo, P-caderina, Classificação molecular, Osteopontina no Estroma e Receptores de Estrogéneos.

Análise temporal multivariada (Regressão de Cox)

A avaliação multivariada dos factores (Tabela 19)com efeito na sobrevivência livre de doença, atribui valor prognóstico independente à P-caderina e aos factores clássicos já conhecidos: tamanho do tumor, invasão ganglionar e grau histológico. Os doentes com expressão positiva de P-caderina, têm um risco de recidiva mais precoce, cerca de 2x superior aos doentes com tumores negativos para P-caderina.

Tabela 19. Regressão de Cox - Sobrevivência global e sobrevivência livre de doença

	Sobrevivência livre de doença		Sobrevivência global	
	p	OR	p	OR
P-caderina	,022	**2,213**	,848	,908
Osteopontina	,865	,913	,852	,880
MIB-1	,713	1,486	,243	1,721
T	,003	**1,693**	,002	**2,026**
N	,000	**2,991**	,183	1,581
Grau	,001	**3,287**	,000	**8,557**
Classe Molecular	,912	,976	,967	1,012

Na avaliação multivariada da sobrevivência (Tabela 19) pelo método de regressão logística de Cox, as únicas variáveis, com valor estatístico independente são o tamanho do tumor e o grau histológico. Nesta série de doentes, o factor com maior impacto na sobrevivência (OR=8,6) foi o grau histológico.

Discussão

A descoberta de marcadores moleculares, ainda que de forma estandardizada, não enviesada e validada pelos dados clínicos, pode mesmo assim não ter nenhuma importância clínica, se não conseguir oferecer mais informação do que a que é dada pelos marcadores clássicos já conhecidos.[94] É importante que os marcadores moleculares possam acrescentar informação e poder discriminativo aos *scores* utilizados com os marcadores clássicos, mas é também importante que possam trazer novos conhecimentos sobre a biologia dos tumores e potenciais novos alvos terapêuticos.

O presente estudo tem diversas limitações. Das 193 possíveis amostras, apenas fomos capazes de analisar os parâmetros clínicos patológicos em 122 (63%) e de recuperar 86 (45%) dos blocos de parafina, para realização de TMA's. Por outro lado, o método de selecção dos doentes, implica que foram excluídos da análise todos os carcinomas com metastização à distância, sem recidiva local prévia e todos os carcinomas sem progressão da doença mas com menos de 10 anos de follow-up. Além do mais, o estudo realizado é retrospectivo, ao longo dos últimos 12 anos. Durante este período de tempo o tratamento do cancro da mama sofreu alterações consideráveis e, dada a natureza retrospectiva do estudo, não conseguimos controlar o tipo de tratamento oferecido ás doentes. Pensamos que um estudo com mais casos e com maior controlo sobre o tratamento efectuado, poderia trazer maior evidência e valor discriminativo a estes dados.

Contudo, os resultados encontrados, merecem-nos algumas reflexões…

A importância da recidiva loco-regional

Diversos estudos demonstraram que o risco de recidiva local após tratamento por cancro da mama é de 5-40%.[10, 18]. Destas mulheres, apesar dos avanços na terapêutica, 40% irão desenvolver progressão da doença e eventualmente morte. Na série aqui apresentada, temos uma percentagem de recidiva loco-regional de 7% (101/1432), sendo que destas, 54% acabaram por morrer de cancro da mama, o que está concordante com a maioria dos estudos clínicos, e no limite inferior do "expectável".[18, 95]

O tempo médio decorrido entre a cirurgia primária e a recidiva foi de 41 meses, o que está de acordo com os dados descritos na literatura.[21] O tempo médio de sobrevivência após recidiva foi de 33 meses e a sobrevivência aos 5 anos após o diagnóstico inicial foi de 55%, o que parece ligeiramente inferior ao reportado pela maioria das séries, com taxas de sobrevivência livre de doença entre os 60% e os 70%.[19, 96]

Apesar de não podermos avaliar a mortalidade das doentes sem recidiva loco-regional, dado que para serem incluídas no estudo as doentes teriam que estar vivas à data de início do estudo, parece que, tal como encontrado noutros estudos[12, 85, 95], a recidiva loco-regional é um factor de risco para mortalidade e que a curva de mortalidade segue de forma paralela a curva de recidiva loco-regional, o que traduz uma associação entre ambas.

Diversos estudos têm apontado para uma sobrevivência semelhante entre os doentes submetidos a mastectomia e a cirurgia conservadora.[96] Outros estudos, mais recentes, parecem demonstrar alguma vantagem na cirurgia conservadora associada a radioterapia.[21] Na nossa série, existe uma clara vantagem da cirurgia conservadora, conseguindo tempos médios de sobrevivência livre de doença de 132 meses vs. 64,5 meses na mastectomia. A mastectomia também aparece associada a uma maior probabilidade de recidiva loco-regional (OR – 1,69). Estes dados poderão ser explicados, não por diferenças biológicas ou no tratamento dos doentes, mas pela associação entre a realização de mastectomia a um grupo de doentes com tumores com pior prognóstico[21] (tamanho, invasão ganglionar, grau histológico, estadio TNM e IPN). Uma vez ajustado para estes factores, o benefício da cirurgia conservadora desaparece, sendo que a recidiva é semelhante nos 2 tipos de cirurgia.

Seja considerado um factor de risco, ou apenas um marcador associado a outros factores de mau prognóstico, a recidiva é mais precoce nas doente submetidas a mastectomia e está associada a maior mortalidade (41,5% vs 10% - OR= 4,06).

Factores clássicos com influência na recidiva

O tamanho do tumor (p=0,002) e o estado ganglionar (p<0,001) foram 2 factores de prognóstico importantes para recidiva loco-regional. À medida que aumentou o tamanho do tumor e o número de gânglio invadidos, aumentou a recidiva loco-regional, o que confirma os dados de diversos estudos.[18, 97, 98]

Tal como encontrado noutros estudos, os doentes com tumores >5cm apresentam uma probabilidade quatro vezes superior de recidiva loco-regional do que os doentes com tumores <2cm (OR= 3,82).[11]

Os doentes com metastização ganglionar à data de diagnóstico apresentaram um risco de recidiva loco-regional quase três vezes superior aos doentes sem metastização (OR= 2,6), tal como encontrado noutros estudos[99, 100]. Segundo alguns autores, a invasão axilar à data de diagnóstico é mesmo um dos mais fortes marcadores de prognóstico, independentemente do tamanho do tumor, do tipo de recidiva ou do tempo decorrido até à recidiva, pelo que especulam que o envolvimento ganglionar não é um mero evento decorrente da progressão do tumor, mas sim um marcador biológico de agressividade.[98]

Contudo, os dados da literatura não são unânimes, encontrando-se diversos estudos que não encontram relação entre o estadiamento axilar e a recidiva loco-regional.[13, 18, 101]. Outros estudos, apesar de não encontrarem associação entre o estadiamento axilar e a recidiva loco-regional, associam a invasão ganglionar à data de diagnóstico, a pior prognóstico e sobrevivência global.[11]

Também de acordo com diversos estudos[10, 12], encontramos uma associação significativa entre os graus histológicos mais elevados e a recidiva loco-regional. (OR=1,46 no Grau 2 e OR=2,22 no Grau 3; p<0,001).

A invasão vascular linfática (p<0,001) e venosa (p<0,001) foram também dois factores associados com a recidiva loco-regional. O risco de recidiva dos doentes com invasão linfática foi cerca de três vezes superior (OR= 2,97)e dos doentes com invasão venosa cerca de 16 vezes (OR=15,8).

O IPN[31, 34], tal como esperado, por ser calculado com base em 3 variáveis intimamente relacionadas com a recidiva loco-regional, também demonstrou associação significativa com a recidiva.

A idade das doentes é um factor frequentemente associado a maior risco de recidiva e progressão da doença oncológica.[11] Contudo, na nossa série, não se detectou nenhuma diferença na idade entre os 2 grupos. Mais uma vez, isto poderá dever-se ao método de selecção da doentes, tendo sido excluídas as doentes mais jovens e com tumores agressivos por apresentarem recidiva à distância e por outro lado, poderem ter sido excluídas as doentes mais idosas, com tumores menos agressivos, dada a possível morte por outras causas ou devido a perdas no *follow-up.*

Validação do método de TMA's na amostra.

Várias críticas têm sido feitas à utilização de TMAs na investigação oncológica. A principal crítica, recorrentemente lançada está relacionada com a possível baixa representatividade de pequenas amostras de tumores potencialmente heterogéneos, quando comparado com as lâminas histológicas clássicas. Contudo, diversos estudos têm demonstrado excelente concordância imunohistoquímica quando são seleccionadas 2 ou 3 amostras de tumor por patologistas experientes.[87, 88]

Comparado com a análise histológica convencional uma única amostra de tumor identificou correctamente aproximadamente 95% das amostras de RE e 81% das amostras de RP [87]e a heterogeneidade do tecido não prejudicou a análise, nem o valor preditivo dos TMA's.

De forma a validar a utilização de TMA's na nossa amostra, comparamos os resultados da imunohistoquímica dos TMA's, com os resultados disponíveis de imunohistoquímica em secções histológicas clássicas, tal com descrito por outros autores.[93]

A frequência de RE positivos nas lâminas clássicas foi de 68,7% e de RP foi de 52,3%. Nos TMA's, a positividade para RE foi de 53,5% e para RP de 38,4%. Considerando a avaliação do tecido histológico como "gold-standard", de acordo com os dados apresentados (Tabela 6 e 7), os TMA's apresentaram uma sensibilidade de "apenas" 70% para os RE e de 57% para os RP.

Esta diferença de expressão da positividade para RE e RP, pode dever-se de facto à heterogeneidade dos tumores, sendo que na confecção dos TMA's poderá não ter sido incluída alguma área com expressão focal dos receptores de estrogéneos, que terá sido identificada nos cortes histológicos. Por outro lado, as diferenças também se poderão dever a variabilidade nos métodos de análise, dado que existe uma variabilidade interlaboratorial substancial entre os resultados dos RE, devido a diferenças dos protocolos de fixação, recuperação antigénica e coloração.[102]

Por outro lado, os resultados clínicos dos doentes com expressão heterogénea de RE são sobreponíveis aos dos doentes com RE negativo. Isto pode ser explicado por uma resposta insuficiente dos tumores à terapêutica hormonal, devido à sua expressão apenas focal.[87] Nestes doentes, os agentes hormonoterápicos, actuariam apenas sobre as células com expressão de RE, seleccionando um "clone" de células sem expressão de receptores hormonais. Isto, talvez ajude a explicar que os resultados dos testes imunohistoquímicos actuais demonstrem um valor preditivo de resposta à terapêutica hormonal isolada relativamente modesto (30%-60%).[102]

Uma revisão[87] dos casos discordantes entre os TMA's e a histologia clássica, demonstrou que a maioria das discrepâncias não se deveria a heterogeneidade tumoral, mas sim a colorações

ligeiras para os marcadores utilizados. Estes tumores seriam considerados negativos nos TMA's, porque na pequena quantidade de tecido utilizado, não se conseguiriam cumprir os critérios de positividade (>10% das células coradas de forma inequívoca). Nas secções histológicas clássicas, estes critérios seriam atingidos, pelo menos em algumas partes do tumor avaliadas.

Também não pode ser desprezado o facto de que as secções de tecido histológico, muitas vezes também representam pequenas fracções (p.ex. 0,004x10x10mm) de grandes tumores (p.ex. 30x30x30mm). Assim, a questão sobre se os TMA's conseguem reproduzir os achados da histologia clássica tornam-se menos importantes do que a questão de conseguirem reproduzir as associações clínico-patológicas conhecidas ou se poderão ser descobertas novas associações através da utilização de TMA's.[87]

Além do mais, a possível heterogeneidade que pode resultar em alguns resultados falsos negativos, pode ser compensada por um lado pelo elevado número de amostras que poderão ser incluídos num TMA e pelo maior grau de consistência e homogeneidade na coloração do que em centenas de lâminas individuais.[87]

Contudo, na nossa série, a avaliação da sobrevivência dos doentes, demonstrou curvas praticamente semelhantes e com a mesma significância estatística, quer a análise partisse dos resultados da histologia clássica, quer dos resultados dos TMA's. Independentemente do método de classificação, a positividade para RE, demonstrou uma relação forte com o aumento da sobrevivência dos doentes. Se esta diferença se deve a doentes com fraca expressão de RE ou a doentes com expressão focal, talvez não seja a questão mais importante.

No entanto, dado que a avaliação em TMA's, a nível de receptores hormonais tem uma sensibilidade relativamente baixa (~70%), sempre que disponíveis, serão preferencialmente utilizados os resultados obtidos a partir do exame histológico clássico. Contudo, pensamos que nos restantes marcadores estudados o valor da análise não fica prejudicado, dado ter sido demonstrado a sobreponibilidade do efeito clínico.

Importância dos factores moleculares

Além da elevada incidência e mortalidade do cancro da mama, existem poucas terapêuticas dirigidas, à excepção da terapia hormonal e do trastuzumab (anticorpo dirigido ao receptor do factor de crescimento HER2). Apesar das inúmeras tentativas, poucos potenciais alvos terapêuticos têm sido identificados.[103] A identificação de factores genéticos e moleculares, além de potenciais factores preditivos e prognósticos, poderá identificar candidatos a alvos terapêuticos.[103]

Na avaliação dos resultados das classificações moleculares é importante lembrar que é esperada a identificação de diversas associações, dado que existem associações entre as classificações moleculares e as variáveis histopatológicas clássicas.[102]

Habitualmente atribui-se a diferença na evolução clínica de doentes com tumores histologicamente semelhantes, a diferenças moleculares entre as neoplasias. Daí, que se possa inferir que a avaliação molecular detalhada das neoplasias, poderia fornecer importantes informações prognósticas.[102]

Tipos moleculares

Os estudos genéticos com micro-arrays, permitiram identificar 3 grupos principais de cancro da mama: um com as características das células luminais, um com diferenciação basal (ou mioepitelial) e um que sobre-expressa HER2. Os tumores com fenótipo luminal apresentam habitualmente melhor prognóstico e são actualmente divididos em 2 grupos: Luminal A e Luminal B; sendo que estes últimos (Luminal B) co-expressam Receptores de Estrogéneos e HER2. Caracteristicamente, os tumores de tipo basal, são RE e HER2 negativos e expressam CK5, 14 e 17, P-caderina e EGFR.[44] Estas diferenças moleculares são já encontradas a nível molecular nos carcinomas ductais *in situ*, o que parece traduzir vias de progressão oncológica diferentes, para cada tipo de tumor.[104]

As diferenças moleculares resultam em *outcomes* clínicos diferentes e diferentes respostas ao tratamento. De uma forma geral, os tumores do tipo basal e HER2, apresentam os piores prognósticos e os tumores do tipo luminal o melhor.[38, 104]

É possível reconhecer os subtipos de cancros da mama através do fenótipo imunohistoquímico apenas com a utilização de dois anticorpos – contra RE e HER2 – que definem os subtipos principais: luminal (RE+/HER2-/+), o que sobre-expressa o HER2 (RE-/HER2+) e o basal (RE-/HER2-). A utilização de marcadores basais/mioepiteliais permite uma caracterização mais completa do fenótipo basal.[45, 93]

Na série de doentes aqui apresentada, a recidiva ocorreu mais tarde nos tumores do tipo Luminal (p<0,001), em média ao final de 45,6 meses, comparado com 19 meses para os tipo HER2 e 17,8 meses para os de tipo *triplo negativo.* Nestes doentes, que apresentaram recidiva loco-regional, a sobrevivência aos 5 anos foi de 66% no grupo Luminal, 33% no grupo HER2 e 36% no grupo *triplo negativo*. Estes achados vêm de encontro ao que foi documentado noutros estudos, em que a positividade para RE e RP são marcadores de bom prognóstico, mesmo após recidiva local.[35]

Relativamente ao grupo global de doentes, o tempo médio livre de doença foi superior nos doentes com tumores do tipo Luminal (p=0,016): 85 meses vs 53 meses no grupo HER2 e 43 meses no grupo *triplo negativo*. A sobrevivência aos 5 anos também foi superior nos tumores do grupo Luminal (p=0,02): 82,5% vs 55,6% no grupo HER2 e 51,8% no grupo *triplo negativo*.

Os tumores negativos para RE, têm tendência para serem menos diferenciados, de maior grau histológico, associados a maiores taxas de recidiva e menor sobrevivência.[105] Os nossos dados parecem confirmar estas indicações, tendo sido encontrada associação significativa entre o estado dos receptores hormonais e o grau histológico. Não foram identificadas outras associações significativas entre os receptores hormonais e os factores de prognóstico. Relativamente ao índice proliferativo, parece ser maior nos tumores com receptores hormonais negativos, mas a diferença não assumiu relevância estatística.

Tipo Luminal

Este subtipo representa cerca de 70% dos cancros da mama invasivos e está associado a um prognóstico mais favorável e a melhor resposta à terapêutica endócrina com tamoxifeno e inibidores da aromatase.[45, 53]

No global, 68,7% dos tumores eram positivos para RE e 52,3% para RP, o que parece ser ligeiramente superior ao descrito noutras séries[106], o que se traduziu numa percentagem global de tumores do tipo luminal de 77%. Mais uma vez, o método de escolha das doentes, seleccionando um grupo de doentes com "bom prognóstico", pode ter enviesado o peso relativo da nossa amostra.

Num estudo de Costa, com 670 doentes seguidos ao longo de 11 anos, o estado dos receptores hormonais parece ter efeito prognóstico apenas nos primeiros 5 anos após a doença inicial. A partir deste período, o risco de progressão da doença oncológica seria o mesmo em ambos os grupos.[36] Na nossa série, este efeito protector da positividade para RE, parece manter-se, pelo menos até aos 10 anos de follow-up.

Segundo alguns autores, o estado dos receptores hormonais (e consequentemente) o tipo molecular é um factor prognóstico irrelevante, sendo antes um excelente preditor de resposta à terapêutica endócrina. Segundo esses autores, só através da administração da terapêutica adequada é que os doentes com receptores hormonais positivos apresentam melhor

prognóstico.[43] Apesar de no nosso estudo não conseguirmos controlar o tipo de tratamento efectuado e da maioria dos doentes com terem realizado hormonoterapia adjuvante, em análise multivariada, a variável que toma valor independente é a positividade para RE e não a realização de hormonoterapia (p=0,021).

Na presente série, é aparente um melhor prognóstico dos doentes com tumores do tipo Luminal B, o que não é descrito em nenhuma série conhecida até à data. Com os dados disponíveis, não conseguimos determinar se essa diferença se deve ao acaso, ao enviesamento da amostra ou a diferenças biológicas ou de resposta ao tratamento destes tumores. Dado que existem interacções complexas entre as vias moleculares dos RE e HER2, o que tem sido ligado com uma relativa resistência à terapêutica endócrina com o tamoxifeno em diversos estudos[107], a positividade simultânea para RE e HER2, providenciando 2 alvos terapêuticos poderá ser uma explicação para este achado.

HER2

A sobre-expressão de HER2 é frequentemente observada em carcinomas humanos, mas em nenhum está tão bem definida como no cancro da mama. O HER2 está sobre-expresso em 15 a 25% dos carcinomas da mama. A sua sobre-expressão é causada por amplificação génica em mais de 90% dos casos.[44]

No nosso grupo de doentes, a sobre-expressão de HER2 (Tabela 10) foi identificada em 29% dos doentes (25/88), sendo que em 52% (13/25) destes doentes surgiu associada a expressão de receptores hormonais (Tipo Luminal B). Assim, apenas 12% dos doentes foram classificados como tipo HER2.

Foi já demonstrado por diversos grupos que, alguns carcinomas HER2 positivos, têm uma diferenciação celular do tipo basal.[44] Na nossa série, 2/3 dos doentes do grupo HER2 demonstra positividade para P-caderina e 33% apresenta positividade para CK5.

Os tumores com sobre-expressão de HER2 estão habitualmente associados à expressão ausente ou reduzida de RE, à desregulação da sinalização mitogénica celular e consequentemente a um comportamento biológico mais agressivo[8, 45]. Apesar de serem classificados com um grupo distinto de carcinomas, esta divisão não é baseada puramente em características de diferenciação celular, mas na existência de uma terapêutica dirigida.[44, 45]

Na nossa série de doentes, os tumores do tipo HER2, apresentaram de facto, um prognóstico global mais desfavorável do que os tumores do tipo Luminal. O seu comportamento biológico aparece de forma intermédia entre os tumores do tipo Luminal e os tumores do tipo Basal. Assim sendo, nos doentes com recidiva loco-regional, o tempo livre de doença neste grupo foi de 19 meses, comparado com 45,6 no grupo Luminal e 17,8 no grupo *triplo negativo.* Apesar das

recidivas aparecerem ligeiramente mais tarde do que no grupo *triplo negativo*, o prognóstico final a nível de sobrevivência parece ser ligeiramente pior, com uma sobrevivência média de 56 meses, comparada com 82,6 meses no grupo *triplo negativo*. Seleccionando todos os doentes da amostra, comprova-se o prognóstico intermédio deste tipo de tumores, apresentando uma sobrevivência livre de doença global de 53 meses (85 no tipo Luminal e 42,8 no tipo *triplo negativo*; p=0,016). Também relativamente à sobrevivência aos 5 anos, apresentam valores intermédios (p=0,02) de 55,6% vs 82,5% no tipo Luminal e 51,8% no tipo *triplo negativo*.

Os nossos dados parecem confirmar os resultados de diversas séries internacionais, levantando-se porém a questão de qual será o prognóstico destes tumores, agora que entrou na prática clínica uma terapêutica específica dirigida ao receptor HER2.

Triplo-negativo

Dado o reduzido número de doentes na nossa amostra, com tumores do tipo normal ou inclassificável (n=2), para efeitos de análise estatística, utilizamos apenas 3 grupos de classificação molecular.[39] Assim, os tipos basal e indeterminado, foram agrupados num grupo de tumores *triplo negativos*.

Os carcinomas de tipo basal, que representam cerca de 2 a 18% dos carcinomas invasivos da mama, apresentam elevada agressividade e menor taxa de resposta às terapias tradicionais, sem alvo molecular específico, representando por isso uma área de interesse cada vez maior, pois a caracterização do seu perfil molecular poderá conduzir à aplicação de terapias dirigidas.[45] Em algumas séries, este tipo de tumor representa 20 a 30% de todos os carcinomas da mama.[108, 109]

Na nossa série de doentes, os carcinomas de tipo *triplo negativo*, constituíram 16,5% do total de doentes, com uma preferência para expressão no grupo de doentes com recidiva (20% vs 8,3% nos controlos; p=NS). Outros estudos têm concluído que este tipo de tumores não se encontra associado a maior taxa de recidiva loco-regional e que portanto, a estes doentes não deve ser retirada a possibilidade de cirurgia conservadora, desde que adequadamente realizada e seguida de radioterapia.[41]

Relativamente ao prognóstico, estes doentes foram os que apresentaram recidivas mais precoces e menor sobrevivência aos 5 anos (51,8%). Estes achados vão de encontro com o publicado noutras séries, em que se confirma o comportamento biológico mais agressivo destes tumores[44] e a elevada probabilidade (>50%) de progressão da doença aos 5 anos[38], que é aparente logo desde a fase de carcinoma *in situ*.[41]

Tal como descrito noutros estudos, os carcinomas *triplo-negativos* apresentaram graus histológicos mais elevados (62,5% são grau III), maior índice proliferativo[109] e apenas 30% não apresentavam invasão ganglionar à data de diagnóstico.[93, 108]

Os nossos dados confirmam pois, o pior prognóstico global destes doentes (apesar de a recidiva loco-regional não ser significativamente diferente) e a sua associação com outros marcadores de mau prognóstico, como seja a ausência de RE (por definição), o aumento do grau histológico e da invasão ganglionar e o aparecimento de elevado índice proliferativo numa maior percentagem dos tumores.

P-caderina

Num dos primeiros estudos sobre a expressão da P-caderina no cancro da mama, esta foi identificada apenas em 4% dos cancros da mama invasivos. Em estudos seguintes, a sua expressão foi observada em cerca de 20% dos tumores e associada à redução da E-caderina e a tumores de elevado grau histológico.[52] Com o desenvolvimento dos anticorpos monoclonais anti-P-caderina, foi demonstrado que a sua expressão varia entre 30 a 50% de todos os carcinomas ductais invasores.[47, 49, 54, 55]

Na nossa série, a P-caderina está expressa em 39,5% de todos os tumores, sendo que é positiva em 45,3% dos doentes com recidiva e em apenas 30,3% dos controlos (OR= 1,49; p=NS), o que está de acordo com a maioria dos dados disponíveis na literatura.

Diversos estudos revelaram que a expressão aberrante de P-caderina nas células tumorais, se associava a outros factores de mau prognóstico, nomeadamente: tamanho do tumor[49]; grau histológico[49, 52, 55], negatividade para RE[49, 52, 55] e metastização ganglionar[49]. Contudo, em análises multivariadas, apenas a metastização ganglionar e o grau histológico, mantiveram o seu valor estatístico.[49] Outros autores, concluiram que não existe associação entre a expressão de P-caderina e o tamanho do tumor ou a metastização axilar.[55] Estes resultados díspares e esta associação com diferentes factores de prognóstico sugere que talvez a P-caderina possa estar relacionada com a progressão oncológica do carcinoma da mama, mas ainda não está estabelecido o seu valor prognóstico independente.[49]

Na nossa série, a expressão aberrante de P-caderina, associou-se a graus histológicos mais elevados (58% dos tumores P-caderina+ eram grau III; p=0,008) e a negatividade para RE (48,5% dos tumores P-caderina+ expressavam RE, comparado com 83,3% dos tumores P-caderina-; p=0,002). O tamanho do tumor (44mm nos P-caderina+ e 45mm nos P-caderina-) e o envolvimento ganglionar, não se associaram com a expressão de P-caderina.

Relativamente aos tipos moleculares, apenas 35% dos tumores com expressão de P-caderina correspondiam ao tipo luminal, com uma predominância dos tumores do tipo basal (41%; p<0,001). Os tumores P-caderina positivos, também se associaram de forma significativa (p=0,003) com um índice proliferativo mais elevado (MIB1>15%), positivo em 47% dos tumores, comparado com 17,3% dos tumores P-caderina-.

Estes dados estão de acordo com diversos outros estudos e parecem comprovar que, de facto, a expressão de P-caderina se associa a outros factores de mau prognóstico, como sejam o "tipo

basal" [53, 103, 105], o índice proliferativo[55, 93] e o grau histológico elevado.[53, 93, 103]

Tem sido sugerido por alguns autores, que a expressão de P-caderina nas células do cancro da mama poderá representar a aquisição de um fenótipo embrionário, semelhante ao das células da extremidade dos ductos, que são altamente proliferativas, negativas para receptores de estrogéneos e positivas para P-caderina.[52] Estes resultados, tal como outros[49], suportam esta hipótese, dado que a P-caderina foi positiva em cancros com maior grau histológico, maior índice proliferativo e negativos para receptores hormonais.

Diversos autores documentaram uma relação inversa entre a expressão de P-caderina e de receptores hormonais. A maioria dos casos com expressão para P-caderina são negativos para receptores hormonais[51, 52, 54, 55, 110] e positivos para HER2, EGFR, altos graus histológicos e índices de proliferação, que são associações biológicas com tumores de pior prognóstico.[49, 52, 54, 55] Estes autores, sugerem então que o estado hormonal negativo é condição essencial para que a expressão de P-caderina possa ocorrer, provavelmente através da diferenciação das células de tipo "luminal" em células de tipo "mioepitelial", onde a P-caderina é normalmente expressa.[55]

Em análise multivariada, relativamente à sobrevivência livre de doença, a expressão de P-caderina surge como um factor prognóstico independente, tal como o tamanho do tumor, a invasão ganglionar e o grau histológico. Contudo, a nível de sobrevivência global, não conseguimos documentar efeito relativamente à expressão de P-caderina.

Diversos autores reportaram associação entre a expressão de P-caderina e má sobrevivência global [49, 51, 54], mesmo em análise multivariada.

Contudo, a observação das curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier sugere-nos que existe um efeito da P-caderina na sobrevivência, mais evidente por volta dos 5 anos (daí que na nossa amostra a sobrevivência aos 5 anos para os doentes com expressão de P-caderina seja de 58,3%, comparado com 82,7% para os doentes sem expressão anómala de P-caderina), que se esbate ao longo do tempo, sendo praticamente inexistente aos 10 anos (52% vs 60% de sobrevivência aos 10 anos).

Estas diferenças, foram também encontradas por outros autores[49, 54, 55], que sugerem este desaparecimento de efeito nos estudos com longo tempo de follow-up.

Osteopontina

A osteopontina, interage com uma grande variedade de receptores celulares de superfície, incluindo diversas integrinas. A ligação da osteopontina a estes receptores de superfície, estimula a adesão celular, a migração e funções específicas de sinalização. Dada a sua multiplicidade de efeitos sinalizadores, não é de estranhar que a sua sobre-expressão tenha sido encontrada em diversos cancros, incluindo o da mama.[111]

Diversos estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que as células que formam o micro-ambiente tumoral (as células mioepiteliais, endoteliais, fibroblastos e células inflamatórias, p. ex.), tal como as moléculas da matriz extra-celular, modulam a especificidade tecidular do tecido mamário normal e o crescimento, sobrevivência, polaridade e comportamento invasor das células do cancro da mama.[104] Entre estas moléculas, uma das envolvidas é a osteopontina que, dada a localização predominante no espaço extra-celular, poderá desenvolver um papel importante no comportamento do estroma tumoral.

Na nossa série, encontramos uma positividade global para osteopontina no tumor de 36% e de osteopontina no estroma de 11%, o que está abaixo do reportado por outras séries[57, 112], onde estes valores podem ultrapassar os 60%.

Alguns estudos, não têm encontrado associações significativas entre os parâmetros clínico-patológicos clássicos de prognóstico e a expressão de Osteopontina.[57, 64, 112] Outros autores, no entanto, descrevem associação entre a expressão de Osteopontina e, p. ex., o estadiamento axilar ou o tamanho do tumor.[61, 62, 64]

Na série de doentes aqui apresentada, foi detectada uma associação significativa entre a expressão de Osteopontina no estroma tumoral e o grau histológico (77% dos tumores com expressão de OPN são grau III; p=0,035). Apesar de não terem sido encontradas associações significativas com o tamanho do tumor ou a invasão ganglionar à data de diagnóstico, de acordo com a classificação de TNM, os tumores que expressam Osteopontina, têm estadios mais avançados, sendo que 55,5% se encontram no Estadio III (comparado com 28,6% no grupo de tumores sem expressão de OPN; p=0,034), tal como descrito noutra série.[113]

Relativamente à classificação molecular e à expressão de receptores hormonais, apesar dos valores absolutos tenderem para uma diminuição da expressão de RE e de tumores do tipo Luminal nos doentes com expressão de OPN, estas diferenças não têm significado estatístico. Noutras séries, porém, a expressão da OPN, tem sido associada a tumores do tipo *triplo-negativo*[113] e a tumores sem expressão de receptores hormonais.[112]

Na avaliação da sobrevivência global, não foram encontradas associações significativas entre a expressão de Osteopontina, mas em análise univariada da sobrevivência livre de doença em todos os doentes estudados, a expressão de osteopontina foi um critério de pior prognóstico, com recidivas mais precoces (63 meses de sobrevivência livre de doença vs. 86,3 nos doentes sem expressão de Osteopontina; p=0,024). Contudo, em análise multivariada por regressão de Cox, não se documentou qualquer efeito. Esta associação com o tempo de sobrevivência livre de doença, sem contudo influenciar a sobrevivência global, embora tenha sido documentado também noutro estudo[113], provavelmente deve-se apenas ao reduzido número de doentes com expressão de OPN no estroma tumoral.

MIB (Ki67)

O MIB-1 é um marcador de proliferação celular, cuja utilização e *cut-offs* não estão ainda perfeitamente estabelecidos.[114] Assim, a utilização de diferentes valores de referência, torna um pouco difícil a comparação entre diversos autores. Na nossa amostra, utilizamos um critério de positividade definido pela marcação de >15% das células tumorais.

O índice proliferativo (MIB-1) foi considerado elevado em 36% das doentes que apresentaram recidiva loco-regional e em apenas 18% das doentes do grupo de controlo (OR=1,97), tal como encontrado num estudo de Nishimura.[114] Contudo, estas diferenças não atingiram significado estatístico.

Relativamente a outros factores de mau prognóstico, aparece associado a graus histológicos mais elevados (62,5% dos tumores com elevado índice proliferativo são grau III, comparado com 28,8% nos tumores com baixo índice proliferativo; p=0,015), e a tumores negativos para receptores de estrogéneos (50% dos tumores com elevado índice proliferativo eram positivos para RE vs. 73,5% nos tumores com baixo índice proliferativo). Estes valores confirmam os dados de outras séries, em que os tumores com elevado índice proliferativo, aparecem associados a RE negativos.[109]

Ao contrário do documentado noutros estudos[109, 114], na nossa série, não se documentou qualquer influência a nível de sobrevivência global. A recidiva parece ocorrer mais cedo (63,1 meses vs 86,3 meses) nos tumores com maior índice proliferativo, apesar de os resultados não apresentarem significância estatística.

A proliferação celular parece ser um marcador precoce de mau prognóstico, dado que tem sido demonstrado o seu valor preditivo a nível de sobrevivência, principalmente em estudos limitados a doentes com cancro da mama precoce, sem metastização ganglionar.[69, 72, 79]

Na nossa amostra, 55% das doentes apresentavam metastização ganglionar axilar à data de diagnóstico. Seleccionando apenas as doentes sem metastização ganglionar, 85% das doentes do grupo de controlo têm baixo índice proliferativo, enquanto que nas doentes com recidiva esse valor baixa para 15% (p=NS).

Segundo alguns estudos[71], o MIB-1, poderá ajudar a seleccionar dentro do grupo de doentes com expressão de RE, quais os que poderão vir a apresentar pior prognóstico. Na nossa amostra, 68,7% dos doentes apresentavam expressão de RE. Seleccionando apenas estes doentes, vemos que o índice proliferativo está aumentado em 27% dos doentes com recidiva e 15% dos doentes do grupo de controlo (p=NS), sem diferenças relativamente à sobrevivência aos 5 anos.

Análise multivariada

Em análise multivariada, apenas o grau histológico, o tamanho do tumor e a invasão ganglionar, demonstraram efeito prognóstico independente. Apesar do tamanho da amostra ser relativamente pequeno, os nossos achados confirmam as conclusões da maior parte dos estudos.[10] Contudo, ao contrário desses estudos, não conseguimos demonstrar de forma significativa associação entre os receptores hormonais ou o tratamento adjuvante e a recidiva loco-regional.

Relativamente à sobrevivência livre de doença, além dos factores com efeito na probabilidade de recidiva loco-regional, a positividade para P-caderina, demonstrou ter um valor prognóstico independente. Os receptores de estrogéneos, a osteopontina e a classificação molecular, apesar do valor documentado em análise univariada, não demonstraram ter valor prognóstico independente na análise multivariada de Cox.

Relativamente à sobrevivência global, apenas o grau histológico e o tamanho do tumor demonstraram associação de forma significativa.

Conclusão

O cancro da mama é uma das doenças oncológicas mais prevalentes em todo o mundo, sendo a principal causa de morte por cancro nas mulheres[1] e consequentemente, uma das doenças com mais impacto global, inclusivamente a nível económico.[115] Nos últimos anos, quer devido à implementação dos programas de rastreio, quer devido à melhoria nos cuidados oferecidos, a sua mortalidade tem diminuído.[116]

A recidiva loco-regional tem sido demonstrada, como sendo um marcador de progressão da doença oncológica e um factor de risco importante para morte.[3] Por esse motivo, têm sido efectuados diversos estudos, para tentar avaliar os factores associados com o risco de recidiva loco-regional.[10]

Apesar da sua expressão clínica muito heterogénea, os avanços registados nos últimos anos no campo da biologia molecular, permitiram-nos conhecer melhor a biologia tumoral, agrupar melhor os tumores de acordo com o seu comportamento biológico previsível e definir novos alvos terapêuticos.[117]

A publicação selectiva de resultados científicos, facilita a disseminação de resultados positivos, que demonstram significância estatística.[118] Assim sendo, na análise de resultados será necessário manter um sentido crítico apurado, sob pena de se "ignorarem" resultados em sentidos opostos, mas que por serem negativos não foram indexados.

Além do mais, um marcador prognóstico pode ter grande interesse científico, mas pouca utilidade clínica se a sua informação prognóstica puder ser avaliada com base em critérios clínicos facilmente avaliáveis. Assim, na avaliação de um parâmetro ou padrão molecular, interessa saber além do valor real da associação, a sua utilidade clínica.[118]

No futuro, a análise das vias de transdução do sinal e dos receptores envolvidos, poderá permitir uma melhor adequação dos tratamentos disponíveis aos doentes, evitando sub-tratamentos ou sobre-tratamentos ou até mesmo, permitindo a descoberta de novos alvos terapêuticos.[90, 103, 119]

No presente estudo, pretendemos avaliar a importância clínica na recidiva loco-regional, da classificação molecular do cancro da mama, do índice proliferativo e da expressão tecidular de 2 proteínas: P-caderina e osteopontina.

Pensamos portanto, que conseguimos responder às questões colocadas nos "objectivos" desta tese:

1. Caracterizar a população com recidivas loco-regionais de cancro da mama.

A recidiva loco-regional aconteceu em 7% das 1432 doentes tratadas entre 1997 e 2007. As características clínico-patológicas dos tumores foram as esperadas para uma população heterogénea, sendo que a maioria dos tumores foram detectados em estadios precoces (Estadios I e II), com uma clara predominância do tipo ductal. A maioria das doentes foi submetida a mastectomia. Cerca de 2/3 das doentes apresentavam expressão de RE e foram submetidas a hormonoterapia adjuvante. A taxa de sobrevivência actual (~8 anos de follow-up global) foi de 69%.

2. Avaliar a influência dos marcadores clínico-patológicos clássicos na recidiva loco-regional do cancro da mama

Em análise univariada, foram encontradas associações significativas com a recidiva loco-regional nos parâmetros: tipo de cirurgia, estadiamento do tumor, grau histológico, tamanho do tumor, invasão linfovascular, metastização ganglionar e número de gânglios invadidos, índice prognóstico de Nottingham, receptores hormonais e realização de HT adjuvante. Contudo, em avaliação multivariada por regressão logística, as variáveis que mantiveram significado estatístico foram o tamanho do tumor, a invasão ganglionar e o grau histológico.

Relativamente ao tempo livre de doença, analisado por regressão de Cox, estes factores mantiveram a sua relevância estatística, sendo que quanto à sobrevivência global, apenas o tamanho do tumor e o grau histológico revelaram associação significativa.

3. Avaliar a influência da classificação molecular na recidiva loco-regional do cancro da mama

Os tumores do tipo luminal, associaram-se de forma significativa a recidivas mais tardias e a maiores sobrevivências. Foi também evidente uma relação entre os factores clínico-patológicos de mau prognóstico e os tumores de tipo HER2 e *triplo-negativo*.

A nível de análise multivariada, não se conseguiu provar a associação independente entre a classificação molecular do cancro da mama e o comportamento biológico dos tumores.

4. Avaliar "novos" marcadores moleculares com possível influência na recidiva loco-regional do cancro da mama

A análise da P-caderina, permitiu concluir que: está associada a factores de mau prognóstico e índices proliferativos elevados; predomina nos tipos moleculares não-luminais; parece ter um efeito na sobrevivência na 1ª década de evolução da doença; tem valor prognóstico independente na sobrevivência livre de doença.

Relativamente à expressão de Osteopontina: está expressa numa baixa percentagem de tumores (11%); aparece em graus histológicos mais elevados e estadios mais avançados e associa-se a recidivas mais precoces, sem influir na sobrevivência global.

Quanto ao índice proliferativo, pudemos observar que se associa a graus histológicos mais elevados e a ausência de expressão de RE. Não se documentaram alterações significativas na recidiva loco-regional ou na sobrevivência.

Estes dados, permitem-nos concluir que apesar do método de escolha das doentes do grupo de controlo poder enviesar a amostra, os determinantes biológicos habitualmente associados com o prognóstico das doentes, mantêm a sua expressão neste grupo de doentes. Dado que os resultados apresentam plausibilidade biológica e concordância com a literatura, relativamente aos factores clássicos e à classificação molecular, parece-nos correcta a utilização desta amostra para avaliação de expressão de padrões moleculares.

Tal como noutros estudos, os factores clínicos clássicos, parecem ser determinantes prognósticos úteis e com maior relevância biológica do que a avaliação isolada de proteínas ou marcadores moleculares. [105] A heterogeneidade e complexidade das vias moleculares presentes no desenvolvimento e progressão do cancro da mama, tornam difícil o isolamento de alguns factores fundamentais relacionados com a evolução clínica da doença. Assim, ainda que com muitas imperfeições, os factores clássicos parecem transmitir um valor prognóstico decorrente da sua associação com diversas alterações e características moleculares, cuja importância isolada é difícil de definir.

A P-caderina e a osteopontina, contudo, são marcadores promissores relativamente ao risco de progressão loco-regional da doença e poderão no futuro, abrir novas alternativas terapêuticas. No entanto, está ainda por determinar o seu real valor biológico e se tem de facto uma relação independente com o comportamento dos tumores, ou se será apenas um marcador biológico dum conjunto de características clínicas e moleculares associadas com mau prognóstico.

A esta pergunta, só estudos prospectivos e com coortes significativamente maiores poderão tentar dar resposta.

Referências

1. Bastos, J., H. Barros, and N. Lunet, *[Breast cancer mortality trend in Portugal (1955-2002)].* Acta Med Port, 2007. **20**(2): p. 139-44.

2. Dey, S., A.S. Soliman, and S.D. Merajver, *Xenoestrogens may be the cause of high and increasing rates of hormone receptor positive breast cancer in the world.* Med Hypotheses, 2009. **72**(6): p. 652-6.

3. Barry Feig, D.B., George Fuhrman, *The M.D. Anderson Surgical Oncology Handbook*. 3rd ed. 624.

4. Soerjomataram, I., et al., *An overview of prognostic factors for long-term survivors of breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **107**(3): p. 309-330.

5. Jemal, A., et al., *Cancer statistics, 2008.* CA Cancer J Clin, 2008. **58**(2): p. 71-96.

6. Jemal, A., E. Ward, and M.J. Thun, *Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women.* Breast Cancer Res, 2007. **9**(3): p. R28.

7. Boyle, P. and J. Ferlay, *Cancer incidence and mortality in Europe, 2004.* Ann Oncol, 2005. **16**(3): p. 481-8.

8. Widakowich, C., et al., *Molecular targeted therapies in breast cancer: Where are we now?* The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007. **39**(7-8): p. 1375-1387.

9. Verdecchia, A., et al., *Survival trends in European cancer patients diagnosed from 1988 to 1999.* Eur J Cancer, 2009. **45**(6): p. 1042-66.

10. Carreño, G., et al., *Local recurrence after mastectomy for breast cancer: analysis of clinicopathological, biological and prognostic characteristics.* Breast Cancer Res Treat, 2007. **102**(1): p. 61-73.

11. Wapnir, I., *Prognosis After Ipsilateral Breast Tumor Recurrence and Locoregional Recurrences in Five National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Node-Positive Adjuvant Breast Cancer Trials.* J Clin Oncol, 2006. **24**(13): p. 2028-2037.

12. Whelan, T., et al., *Ipsilateral breast tumor recurrence postlumpectomy is predictive of subsequent mortality: results from a randomized trial. Investigators of the Ontario Clinical Oncology Group.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1994. **30**(1): p. 11-6.

13. Touboul, E., et al., *Local recurrences and distant metastases after breast-conserving surgery and radiation therapy for early breast cancer.* Int J Radiat Oncol Biol Phys, 1999. **43**(1): p. 25-38.

14. Crowe, J.P., Jr., et al., *Local-regional breast cancer recurrence following mastectomy.* Arch Surg, 1991. **126**(4): p. 429-32.

15. Fisher, B., et al., *Twenty-year follow-up of a randomized trial comparing total mastectomy, lumpectomy, and lumpectomy plus irradiation for the treatment of invasive breast cancer.* N Engl J Med, 2002. **347**(16): p. 1233-41.

16. Schmoor, C., et al., *Role of isolated locoregional recurrence of breast cancer: results of four prospective studies.* J Clin Oncol, 2000. **18**(8): p. 1696-708.

17. Veronesi, U., et al., *Local recurrences and distant metastases after conservative breast cancer treatments: partly independent events.* J Natl Cancer Inst, 1995. **87**(1): p. 19-27.

18. Cèfaro, G., et al., *Predictors of local recurrence after conservative surgery and whole-breast irradiation.* Breast Cancer Res Treat, 2006. **98**(3): p. 329-335.

19. Vandersangen, M., et al., *The prognosis of patients with local recurrence more than five years after breast conservation therapy for invasive breast carcinoma.* European Journal of Surgical Oncology, 2006. **32**(1): p. 34-38.

20. Smith, M.J., et al., *Mechanisms driving local breast cancer recurrence in a model of breast-conserving surgery.* Ann Surg Oncol, 2008. **15**(10): p. 2954-64.

21. Fodor, J., et al., *Prognosis of patients with local recurrence after mastectomy or conservative surgery for early-stage invasive breast cancer.* Breast (Edinburgh, Scotland), 2008. **17**(3): p. 302-8.

22. *Favourable and unfavourable effects on long-term survival of radiotherapy for early breast cancer: an overview of the randomised trials. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group.* Lancet, 2000. **355**(9217): p. 1757-70.

23. Parikh, R., et al., *Prognostic Value of Triple-Negative Phenotype at the Time of Locally Recurrent, Conservatively Treated Breast Cancer.* International Journal of Radiation OncologyBiologyPhysics, 2008: p. 8.

24. Debock, G., et al., *Isolated loco-regional recurrence of breast cancer is more common in young patients and following breast conserving therapy: Long-term results of European Organisation for Research and Treatment of Cancer studies.* European Journal of Cancer, 2006. **42**(3): p. 351-356.

25. Kroman, N., et al., *Factors influencing the effect of age on prognosis in breast cancer: population based study.* BMJ, 2000. **320**(7233): p. 474-8.

26. Arriagada, R., et al., *Twenty-five years of follow-up in patients with operable breast carcinoma: correlation between clinicopathologic factors and the risk of death in each 5-year period.* Cancer, 2006. **106**(4): p. 743-50.

27.Weiss, R.B., et al., *Natural history of more than 20 years of node-positive primary breast carcinoma treated with cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil-based adjuvant chemotherapy: a study by the Cancer and Leukemia Group B.* J Clin Oncol, 2003. **21**(9): p. 1825-35.

28.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.

29.Tabar, L., et al., *Primary and adjuvant therapy, prognostic factors and survival in 1053 breast cancers diagnosed in a trial of mammography screening.* Jpn J Clin Oncol, 1999. **29**(12): p. 608-16.

30.Pinder, S.E., et al., *The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy.* Cancer, 1998. **83**(8): p. 1529-39.

31.D'Eredita, G., et al., *Prognostic factors in breast cancer: the predictive value of the Nottingham Prognostic Index in patients with a long-term follow-up that were treated in a single institution.* Eur J Cancer, 2001. **37**(5): p. 591-6.

32.Goldhirsch, A., et al., *Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005.* Ann Oncol, 2005. **16**(10): p. 1569-83.

33.Schoppmann, S.F., et al., *Prognostic value of lymphangiogenesis and lymphovascular invasion in invasive breast cancer.* Ann Surg, 2004. **240**(2): p. 306-12.

34.Fredriksson, I., et al., *Local recurrence in the breast after conservative surgery--a study of prognosis and prognostic factors in 391 women.* Eur J Cancer, 2002. **38**(14): p. 1860-70.

35.Haffty, B., et al., *Molecular markers for prognosis after isolated postmastectomy chest wall recurrence.* Cancer, 2004. **100**(2): p. 252-263.

36.Costa, S.D., et al., *Factors influencing the prognostic role of oestrogen and progesterone receptor levels in breast cancer--results of the analysis of 670 patients with 11 years of follow-up.* Eur J Cancer, 2002. **38**(10): p. 1329-34.

37.Rouzier, R., et al., *Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy.* Clin Cancer Res, 2005. **11**(16): p. 5678-85.

38.Sørlie, T., et al., *Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications.* Proc Natl Acad Sci USA, 2001. **98**(19): p. 10869-74.

39.Perou, C.M., et al., *Molecular portraits of human breast tumours.* Nature, 2000. **406**(6797): p. 747-52.

40.Sorlie, T., *Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities.* European Journal of Cancer, 2004. **40**(18): p. 2667-2675.

41.Haffty, B.G., et al., *Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer.* J Clin Oncol, 2006. **24**(36): p. 5652-7.

42.Lauss, M., et al., *Consensus genes of the literature to predict breast cancer recurrence.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **110**(2): p. 235-44.

43.Berry, D.A., et al., *Estrogen-receptor status and outcomes of modern chemotherapy for patients with node-positive breast cancer.* JAMA, 2006. **295**(14): p. 1658-67.

44.Milanezi, F., S. Carvalho, and F.C. Schmitt, *EGFR/HER2 in breast cancer: a biological approach for molecular diagnosis and therapy.* Expert Rev Mol Diagn, 2008. **8**(4): p. 417-434.

45.Silva, F., et al., *[Basal-like carcinoma of the breast].* Acta médica portuguesa, 2008. **21**(4): p. 373-8.

46.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.

47.Paredes, J., et al., *P-cadherin expression in breast cancer: a review.* Breast Cancer Res, 2007. **9**(5): p. 214.

48.Paredes, J., et al., *Breast carcinomas that co-express E- and P-cadherin are associated with p120-catenin cytoplasmic localisation and poor patient survival.* Journal of Clinical Pathology, 2008. **61**(7): p. 856-62.

49.Gamallo, C., et al., *The prognostic significance of P-cadherin in infiltrating ductal breast carcinoma.* Mod Pathol, 2001. **14**(7): p. 650-4.

50.Sarrió, D., et al., *Functional characterization of E- and P-cadherin in invasive breast cancer cells.* BMC Cancer, 2009. **9**: p. 74.

51.Paredes, J., et al., *P-cadherin expression is associated with high-grade ductal carcinoma in situ of the breast.* Virchows Arch, 2002. **440**(1): p. 16-21.

52.Palacios, J., et al., *Anomalous expression of P-cadherin in breast carcinoma. Correlation with E-cadherin expression and pathological features.* Am J Pathol, 1995. **146**(3): p. 605-12.

53.Paredes, J., et al., *P-cadherin and cytokeratin 5: useful adjunct markers to distinguish basal-like ductal carcinomas in situ.* Virchows Arch, 2007. **450**(1): p. 73-80.

54.Peralta Soler, A., et al., *P-cadherin expression in breast carcinoma indicates poor survival.* Cancer, 1999. **86**(7): p. 1263-72.

55.Paredes, J., *P-Cadherin Overexpression Is an Indicator of Clinical Outcome in Invasive Breast Carcinomas and Is Associated with CDH3 Promoter Hypomethylation.* Clinical Cancer Research, 2005. **11**(16): p. 5869-5877.

56.Tuck, A.B., A.F. Chambers, and A.L. Allan, *Osteopontin overexpression in breast cancer:*

knowledge gained and possible implications for clinical management. J Cell Biochem, 2007. **102**(4): p. 859-68.

57.Rodrigues, L.R., et al., *Significance of Osteopontin Expression in Human Invasive Breast Tumour Stroma.* The Open Breast Cancer Journal 2008. **1**: p. 1-9.

58.Kapoor, S., *Inhibition of osteopontin dependent carcinogenesis.* J Cancer Res Clin Oncol, 2008. **134**(8): p. 927-8.

59.Schulze, E.B., et al., *The thrombin inhibitor Argatroban reduces breast cancer malignancy and metastasis via osteopontin-dependent and osteopontin-independent mechanisms.* Breast Cancer Res Treat, 2008. **112**(2): p. 243-54.

60.Brown, L.F., et al., *Osteopontin expression and distribution in human carcinomas.* Am J Pathol, 1994. **145**(3): p. 610-23.

61.Tuck, A.B., et al., *Osteopontin expression in a group of lymph node negative breast cancer patients.* Int J Cancer, 1998. **79**(5): p. 502-8.

62.Rudland, P.S., et al., *Prognostic significance of the metastasis-associated protein osteopontin in human breast cancer.* Cancer Res, 2002. **62**(12): p. 3417-27.

63.Finak, G., et al., *Stromal gene expression predicts clinical outcome in breast cancer.* Nat Med, 2008. **14**(5): p. 518-27.

64.Kim, Y.W., et al., *Expression of osteopontin and osteonectin in breast cancer.* J Korean Med Sci, 1998. **13**(6): p. 652-7.

65.Patani, N., W. Jiang, and K. Mokbel, *Osteopontin C mRNA expression is associated with a poor clinical outcome in human breast cancer.* Int. J. Cancer, 2008. **122**(11): p. 2646.

66.Colozza, M., et al., *Proliferative markers as prognostic and predictive tools in early breast cancer: where are we now?* Ann Oncol, 2005. **16**(11): p. 1723-39.

67.Weidner, N., D.H. Moore, 2nd, and R. Vartanian, *Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB1 antibody.* Hum Pathol, 1994. **25**(4): p. 337-42.

68.Veronese, S.M., C. Maisano, and J. Scibilia, *Comparative prognostic value of Ki-67 and MIB-1 proliferation indices in breast cancer.* Anticancer Res, 1995. **15**(6B): p. 2717-22.

69.Sahin, A.A., et al., *Ki-67 immunostaining in node-negative stage I/II breast carcinoma. Significant correlation with prognosis.* Cancer, 1991. **68**(3): p. 549-57.

70.Veronese, S.M., et al., *Proliferation index as a prognostic marker in breast cancer.* Cancer, 1993. **71**(12): p. 3926-31.

71.Viale, G., et al., *Prognostic and predictive value of centrally reviewed Ki-67 labeling index in postmenopausal women with endocrine-responsive breast cancer: results from Breast International Group Trial 1-98 comparing adjuvant tamoxifen with letrozole.* J Clin Oncol, 2008. **26**(34): p. 5569-75.

72.Mirza, A.N., et al., *Prognostic factors in node-negative breast cancer: a review of studies with sample size more than 200 and follow-up more than 5 years.* Ann Surg, 2002. **235**(1): p. 10-26.

73.Trihia, H., et al., *Ki-67 expression in breast carcinoma: its association with grading systems, clinical parameters, and other prognostic factors--a surrogate marker?* Cancer, 2003. **97**(5): p. 1321-31.

74.Goodson, W.H., 3rd, et al., *The prognostic value of proliferation indices: a study with in vivo bromodeoxyuridine and Ki-67.* Breast Cancer Res Treat, 2000. **59**(2): p. 113-23.

75.Locker, A.P., et al., *Ki67 immunoreactivity in breast carcinoma: relationships to prognostic variables and short term survival.* Eur J Surg Oncol, 1992. **18**(3): p. 224-9.

76.Clahsen, P.C., et al., *The utility of mitotic index, oestrogen receptor and Ki-67 measurements in the creation of novel prognostic indices for node-negative breast cancer.* Eur J Surg Oncol, 1999. **25**(4): p. 356-63.

77.Imamura, H., et al., *Prognostic significance of MIB1-determined proliferative activities in intraductal components and invasive foci associated with invasive ductal breast carcinoma.* Br J Cancer, 1999. **79**(1): p. 172-8.

78.Lee, A.K., et al., *Lymph node negative invasive breast carcinoma 1 centimeter or less in size (T1a,bNOMO): clinicopathologic features and outcome.* Cancer, 1997. **79**(4): p. 761-71.

79.Jung, S.Y., et al., *Ki-67 expression gives additional prognostic information on St. Gallen 2007 and Adjuvant! Online risk categories in early breast cancer.* Ann Surg Oncol, 2009. **16**(5): p. 1112-21.

80.Pinero-Madrona, A., et al., *[Immunohistochemical characterisation of breast cancer: towards a new clasification?].* Cir Esp, 2008. **84**(3): p. 138-45.

81.Paik, S., et al., *A multigene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer.* N Engl J Med, 2004. **351**(27): p. 2817-26.

82.Galea, M.H., et al., *The Nottingham Prognostic Index in primary breast cancer.* Breast Cancer Res Treat, 1992. **22**(3): p. 207-19.

83.Frederick L. Greene, A.J.C.o.C., American Cancer Society, David L. Page, April G. Fritz, Irvin D. Fleming, Charles M. Balch, Daniel G. Haller, Monica Morrow, *AJCC CANCER STAGING ATLAS*. 2006. 328.

84.Singletary, S.E., et al., *Staging system for breast cancer: revisions for the 6th edition of the AJCC Cancer Staging Manual.* Surg Clin North Am, 2003. **83**(4): p. 803-19.

85.Goldhirsch, A., et al., *Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007.* Annals of Oncology, 2007. **18**(7): p. 1133.

86.Nofech-Mozes, S., et al., *Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers.* Breast Cancer Res Treat, 2009.

87.Torhorst, J., et al., *Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints.* Am J Pathol, 2001. **159**(6): p. 2249-56.

88.Garcia, S., et al., *Poor prognosis in breast carcinomas correlates with increased expression of targetable CD146 and c-Met and with proteomic basal-like phenotype☆.* Human Pathology, 2007. **38**(6): p. 830-841.

89.Bhargava, R., et al., *CK5 is more sensitive than CK5/6 in identifying the "basal-like" phenotype of breast carcinoma.* Am J Clin Pathol, 2008. **130**(5): p. 724-30.

90.van de Vijver, M.J., et al., *A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer.* N Engl J Med, 2002. **347**(25): p. 1999-2009.

91.Calza, S., et al., *Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients.* Breast Cancer Res, 2006. **8**(4): p. R34.

92.Cheang, M.C., et al., *Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype.* Clin Cancer Res, 2008. **14**(5): p. 1368-76.

93.Matos, I., et al., *p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas.* Virchows Arch, 2005. **447**(4): p. 688-694.

94.Ioannidis, J., *Is Molecular Profiling Ready for Use in Clinical Decision Making?* The Oncologist, 2007. **12**(3): p. 301-311.

95.Vicini, F.A., et al., *Does local recurrence affect the rate of distant metastases and survival in patients with early-stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy?* Cancer, 2003. **97**(4): p. 910-9.

96.van Tienhoven, G., et al., *Prognosis after treatment for loco-regional recurrence after mastectomy or breast conserving therapy in two randomised trials (EORTC 10801 and DBCG-82TM). EORTC Breast Cancer Cooperative Group and the Danish Breast Cancer Cooperative Group.* Eur J Cancer, 1999. **35**(1): p. 32-8.

97.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.

98.Rack, B., et al., *Patients with recurrent breast cancer: does the primary axillary lymph node status predict more aggressive tumor progression?* Breast Cancer Res Treat, 2003. **82**(2): p. 83-92.

99.Mirza, N.Q., et al., *Predictors of locoregional recurrence among patients with early-stage breast cancer treated with breast-conserving therapy.* Ann Surg Oncol, 2002. **9**(3): p. 256-65.

100.Broet, P., et al., *Analyzing prognostic factors in breast cancer using a multistate model.* Breast Cancer Res Treat, 1999. **54**(1): p. 83-9.

101.Menes, T., et al., *The Consequence of Multiple Re-Excisions to Obtain Clear Lumpectomy Margins in Breast Cancer Patients.* Ann Surg Oncol, 2005. **12**(11): p. 881-885.

102.Pusztai, L., *Molecular Classification of Breast Cancer: Limitations and Potential.* The Oncologist, 2006. **11**(8): p. 868-877.

103.Mcsherry, E., et al., *Common Molecular Mechanisms of Mammary Gland Development and Breast Cancer.* Cell. Mol. Life Sci., 2007. **64**(24): p. 3201-3218.

104.Polyak, K., *Breast cancer: origins and evolution.* J Clin Invest, 2007. **117**(11): p. 3155-3163.

105.Rakha, E., et al., *Prognostic markers in triple-negative breast cancer.* Cancer, 2007. **109**(1): p. 25-32.

106.Rom, J., et al., *Comparison of immunohistological parameters in primary breast cancers and corresponding locoregional recurrences.* Pathology - Research and Practice, 2006. **202**(3): p. 125-130.

107.Ellis, M.J., et al., *Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial.* J Clin Oncol, 2001. **19**(18): p. 3808-16.

108.Carey, L.A., et al., *Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study.* JAMA, 2006. **295**(21): p. 2492-502.

109.Umemura, S., et al., *Estrogen receptor-negative and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer tissue have the highest Ki-67 labeling index and EGFR expression: gene amplification does not contribute to EGFR expression.* Oncol Rep, 2005. **14**(2): p. 337-43.

110.Paredes, J., et al., *Aberrant P-cadherin expression: is it associated with estrogen-independent growth in breast cancer?* Pathol Res Pract, 2002. **198**(12): p. 795-801.

111.Rodrigues, L.R., et al., *The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer.* Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2007. **16**(6): p. 1087-97.

112.Ribeiro-Silva, A. and J.P. Oliveira da Costa, *Osteopontin expression according to molecular profile of invasive breast cancer: a clinicopathological and immunohistochemical study.* Int J Biol Markers, 2008. **23**(3): p. 154-60.

113.Wang, X., et al., *Increased expression of osteopontin in patients with triple-negative breast cancer.* Eur J Clin Invest, 2008. **38**(6): p. 438-46.

114.Nishimura, R., et al., *Investigation of factors related to periods to ipsilateral breast tumor recurrence after breast-conserving surgery and measures for preventing recurrence in early breast cancer.* Breast Cancer, 2006. **13**(2): p. 152-8.

115.Lamerato, L., et al., *Economic burden associated with breast cancer recurrence.* Cancer, 2006. **106**(9): p. 1875-1882.

116.Bosetti, C., et al., *Cancer mortality in the European Union, 1970-2003, with a joinpoint analysis.* Ann Oncol, 2008. **19**(4): p. 631-40.

117.Riley, L.B. and D.C. Desai, *The molecular basis of cancer and the development of targeted therapy.* Surg Clin North Am, 2009. **89**(1): p. 1-15, vii.

118.Kyzas, P.A., K.T. Loizou, and J.P. Ioannidis, *Selective reporting biases in cancer prognostic factor studies.* J Natl Cancer Inst, 2005. **97**(14): p. 1043-55.

119.Buyse, M., et al., *Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer.* J Natl Cancer Inst, 2006. **98**(17): p. 1183-92.

Abstract

INTRODUCTION – Breast cancer is the most frequent cancer in women and the leading cause of death in the female sex. Its incidence has been rising all over the world, but due to improvements in the treatment and to the screening programmes, the survival has been rising in all the developed countries.

The loco-regional relapse is a concern in the treatment of this disease, as it is a well known independent predictor of metastization and death. The local control of the relapse has been associated to an improvement in metastization and relative survival.

The tumour size, nodal status and histological grade have been described as the most important factors for long term survival. P-cadherin has been identified has an independent predictor of prognosis in breast cancer. The expression of Osteopontin in the stroma of breast cancer has been related with the expression of a group of genes associated with worst prognosis. In patients with breast cancer, the proliferation index is inversely related with survival.

There is a significant discrepancy in the prognosis of patients with same stage disease and with similar pattern of molecular markers. As such, arises the need for knowledge about risk factors for local relapse and its relation with overall prognosis.

MATERIAL AND METHODS – We analyzed the clinical records of 1432 patients treated at our institution in a period of 10 years. Selected a group ou 101 patients (7%) with local relapse without previous metastization. For control group, we selected a group of patients with more than 10 years follow-up, wothout disease progression. After exlcusion criteria, we ended up with a group of 70 cases and 52 controls.

RESULTS – The average time to recurrence was 41 months; the mean survival after relapse was 33 months and the 5-year survival was 55%. In multivariate analysis of disease-free survival, tumour size, nodal status, histological grade and P-cadherin expression had independent prognostic value.

The aberrant expression of P-cadherin is related to higher histological grades and estrogen-receptor negativity; Osteopontin expressing tumours have more advanced disease at diagnosis and the proliferation index is associated with malignant tumours that are negative for estrogen receptors.

CONCLUSION – P-cadherin and Osteopontin are two promising markers for loco-regional disease and might be able to become novel therapeutic targets. Its real biological value is still undetermined. Wether if P-cadherin is directly related to tumour biology or represents just a surrogate marker of a set of clinical and molecular factors related with prognosis, is still to be determined.

Porto, Maio de 2009