

**MESTRADO EM MEDICINA MOLECULAR DA
FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO**

**EXPRESSÃO DE C-KIT(CD117)
EM LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DE MAMA**

Artur Filipe Sousa de Oliveira e Silva

**Porto
2003**



ARTUR FILIPE SOUSA DE OLIVEIRA E SILVA

**EXPRESSÃO DE C-KIT(CD 117)
EM
LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DE MAMA**

**Porto
2003**

DISSERTAÇÃO DE CANDIDATURA AO GRAU
DE MESTRE APRESENTADA À FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE DO PORTO

Artigo 48º, § 3 – A Faculdade não responde pelas doutrinas expendidas na dissertação. (*Regulamento da Faculdade de Medicina do Porto – Decreto nº 19337, 29 de Janeiro de 1931*)

ÍNDICE

1. Agradecimentos.....	5
2. Abreviaturas.....	7
3. Introdução.....	10
3.1. Proto-oncogene c-Kit.....	14
3.2. Regulação da expressão de c-Kit.....	18
3.3. Isoformas de SCF.....	20
3.4. Isoformas de c-Kit.....	21
3.5. Mutações de c-Kit	22
3.6. Activação constitutiva de c-Kit.....	23
3.7. Inibidores tirosina-cínase e expressão de c-Kit.....	24
3.8. Tumores mamários mesenquimatosos e expressão de c-kit.....	25
4. Objectivos.....	28
5. Material e Métodos.....	30
6. Resultados.....	34
7. Discussão.....	46
8. Conclusões.....	53
9. Perspectivas Futuras.....	55
10. Referências bibliográficas.....	58
11. Resumo em Português.....	68
12. Resumo em Inglês.....	71
13. Anexo 1.....	74

1. AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Doutor Fernando Schmitt, Orientador de todo o processo conducente a esta Dissertação, agradeço a orientação teórica, apoio e disponibilidade demonstrados durante as diversas etapas de preparação deste trabalho, acrescido de uma palavra de apreço pela afabilidade com que faz ciência.

Ao Prof. Doutor Manuel Sobrinho Simões, Coordenador do Mestrado em Medicina Molecular, agradeço todo o entusiasmo com que me incentivou a participar neste Curso de Mestrado que, pelo seu carácter inovador nesta Universidade, espelha bem a dinâmica e curiosidade científicas que sempre me procurou transmitir ao longo deste biénio.

À Prof.^a Doutora Maria de Fátima Carneiro, Directora do Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João, agradeço o incentivo e compreensão com que acompanhou a evolução do presente trabalho e que permitiram um melhor aproveitamento deste Curso de Mestrado.

À Dr.^a Isabel Amendoeira, Responsável no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João pelo Grupo de Patologia Mamária da referida Instituição, agradeço todos os ensinamentos transmitidos e a orientação inestimável na recolha e revisão dos casos nos quais se baseou esta Dissertação.

À Dr.^a Raquel Soares, agradeço o apoio e entusiasmo partilhados durante o período de preparação desta Dissertação.

À Técnica Dina Leitão, agradeço o apoio técnico e disponibilidade na realização dos estudos de imuno-histoquímica.

À Novartis Farma – Produtos Farmacêuticos SA, agradeço os meios que colocou à nossa disposição e que permitiram viabilizar este Projecto de Investigação.

A todo o Grupo de Patologia Mamária do IPATIMUP, pelo entusiasmo e abertura com que me acolheram na sua dinâmica incentivadora de grupo.

Aos colegas de Internato Complementar de Anatomia Patológica, igualmente colegas de Mestrado, pela amizade e partilha de pequenos momentos que humanizaram a elaboração mais técnica desta Dissertação.

À Helena e ao André, a quem subtraí as horas de preparação deste trabalho, pelos quais tudo vale a pena.

2. ABREVIATURAS

Ab- anticorpo
 α -HER- alfa-herregulina
AI- *imbalance* alélico
C- citoplasmático
CDIO- carcinoma ductal invasor outros tipos histológicos
CDIS- carcinoma ductal *in situ*
CDISOE- carcinoma ductal invasor sem outra especificação
c.g.a- campo de grande ampliação
CISH- hibridização *in situ* cromogénica
c-Kit- protooncogene que codifica a proteína KIT
CLIS- carcinoma lobular *in situ*
CSF1-R- receptor do factor estimulador de colónias de tipo 1
CXCR4- receptor do SDF-1 α
DMP- doença mieloproliferativa
EGFR- receptor do factor de crescimento epidérmico
EMT- transição epitélio-mesenquimatoso
EN- epitélio normal
FGFR- receptor do factor de crescimento fibroblástico
GAP- proteína activadora da GTPase
GIST- tumor estromal gastrointestinal
GM-CSF- factor estimulador de colónias de granulócitos e macrófagos
GNNK- tetrapeptídeo da região justamembranar do c-Kit
HE- hematoxilina e eosina
IGF-1R- receptor do factor de crescimento insulínico de tipo 1
IH- imuno-histoquímica
IL- *immunoglobulin-like*
IL-1- interleucina de tipo 1
IL-4- interleucina de tipo 4
IPN- índice prognóstico de Nottingham
K- cínase
kDa- kiloDalton
KIT- proteína monomérica codificada pelo protooncogene c-Kit
Kits- isoforma solúvel do receptor do c-Kit
KL- ligando do c-Kit (SCF)
LCTNK- linfoma de células T/NK
LMA- leucemia mielóide aguda
LMC- leucemia mielóide crónica
LOH- perda de heterozigotia
M- mastócito
MAST- mastocitose
MCGF- factor de crescimento dos mastócitos
M-CSF- factor estimulador de colónias de macrófagos
ME- mitoses epiteliais
MI- mesilato de imatinib
MS- mitoses estromais
N- núcleo
NS- sem significância estatística
P- nível de probabilidade estatística
PC- padrão de crescimento
PCR- reacção em cadeia polimerásica
PDGFRA- receptor alfa do factor de crescimento derivado das plaquetas
PDGFRB- receptor beta do factor de crescimento derivado das plaquetas
PH- região de homologia com a pleckstrina
PI3K- cínase-3' do fosfoinositol
PLC- fosfolípase C
Pro- rico em prolina
PTPase- proteína tirosina-fosfatase

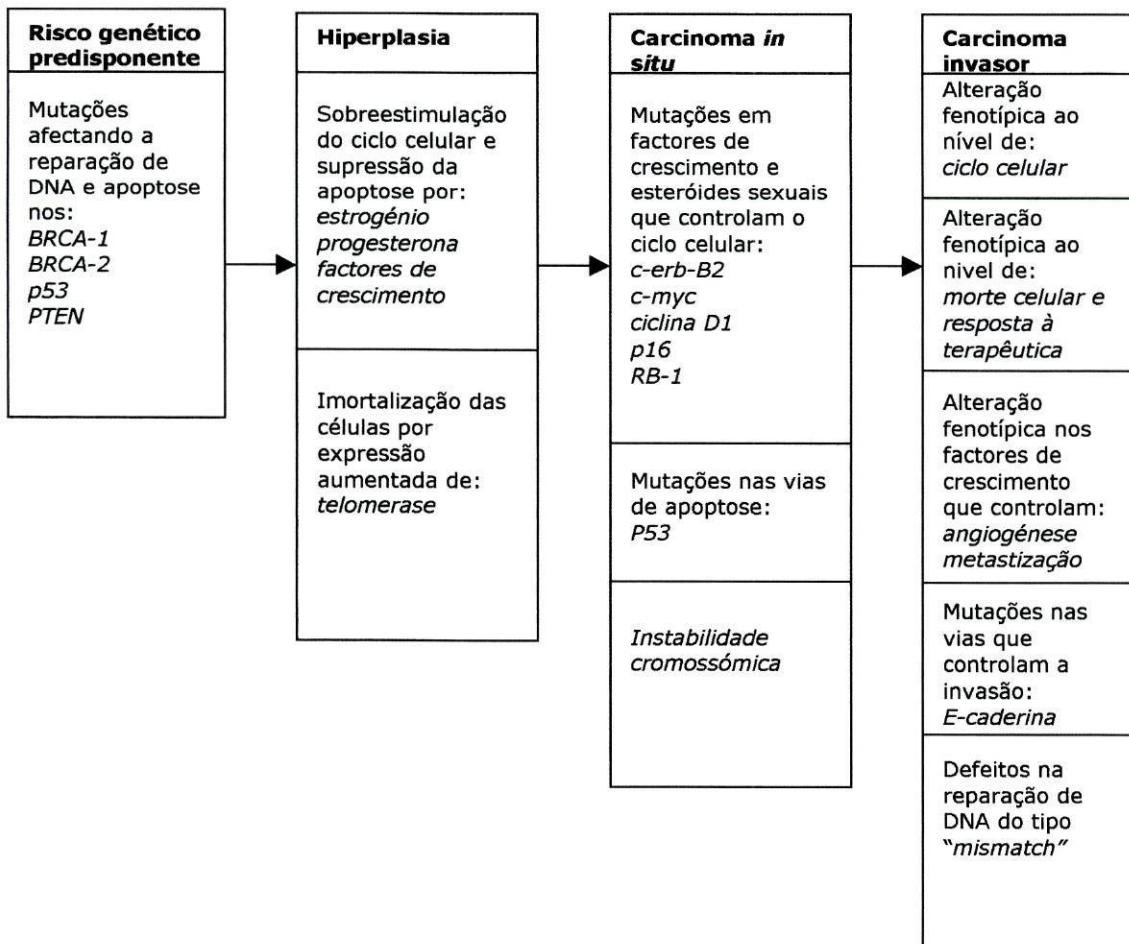
RE- receptor de estrogénio
RTK- receptor tirosina-cínase
SCF- factor de célula estaminal (ligando do c-Kit)
SCFR- receptor do SCF (c-Kit)
SDF-1 α - factor derivado das células estromais de tipo 1-alfa
SH2- região de homologia com o src de tipo 2
SH3- região de homologia com o src de tipo 3
SSCP- polimorfismos conformacionais de cadeia única
TF- tumor filóide mamário
TGF- α - factor de crescimento e de transformação de tipo alfa
TGF- β - factor de crescimento e de transformação de tipo beta
TM4SF- superfamília transmembranar de tipo 4
Tr-Kit- isoforma truncada do c-Kit
TSH- hormona estimuladora tireoideia
VEGF- factor de crescimento do endotélio vascular

Foi estimado em 2001 que, anualmente, 3 milhões de europeus desenvolvem cancro.¹ O cancro de mama, a par do cancro do pulmão e do cancro colo-rectal, é um dos três tipos de cancro mais frequentes na população europeia, sendo responsável por uma incidência de 200000 novos casos oncológicos por ano.² A taxa de mortalidade do cancro mamário tem vindo a decrescer de forma sustentada desde o início dos anos noventa, tendo sido observada no decénio 1990-2000 uma redução em 25 a 35%.^{3,4,5,6} Tal facto é atribuível essencialmente a dois factores:

1. A generalização do rastreio mamográfico em mulheres pós-menopáusicas assintomáticas;
2. A consciencialização da opinião pública feminina para a importância do auto-exame da mama e do exame médico periódico.

No cancro de mama, uma única célula neoplásica [resultante do efeito cumulativo de uma série de mutações somáticas (adquiridas) e de mutações germinativas (herdadas)] pode, através de um processo sequencial e estocástico de progressão tumoral, sofrer uma transformação maligna e metastizar (Tabela 1).⁷

Tabela 1. Alterações genóticas e fenóticas das células epiteliais mamárias associadas com o início e progressão do cancro de mama ^{8,9}



Encontra-se descrita uma tríade de factores de risco implicada no desenvolvimento de neoplasia maligna de mama: acção estrogénica; história familiar; e, ainda, radioterapia prévia (susceptibilidade aumentada para idade inferior a 30 anos, com dose de radiação única superior a 3600 cGy ou múltiplas doses de radiação superior a 200 cGy).^{10,11,12,13} No que se refere ao primeiro factor considerado, o cancro da mama é uma neoplasia hormono-dependente, como demonstrado por inúmeros estudos que confirmam o estrogénio como o principal promotor da carcinogénese mamária.^{14,15,16} Como corolário do anteriormente referido, mulheres desprovidas de ovários funcionantes e que não efectuam terapêutica hormonal de substituição não desenvolvem cancro de mama.^{7,17}

Do ponto de vista genético, o cancro de mama hereditário é responsável por 1 % dos cancros de mama, ocorrendo em síndromes clínicas hereditárias (Li-Fraumeni, Cowden, Peutz-Jeghers, Muir-Torre), caracterizados por uma elevada penetrância de múltiplas neoplasias malignas. Já o cancro de mama familiar é responsável por 5-10 % de casos de cancro de mama, sendo as mutações dos genes oncossuppressores BRCA-1 e BRCA-2 responsáveis por quase 90 % desses mesmos casos.^{18,19} As duas anomalias genéticas mais frequentemente envolvidas na progressão do cancro de mama são, em primeiro lugar, a perda de heterozigotia – LOH – de um determinado gene supressor tumoral (por deleção do alelo normal dominante) e, em segundo lugar, a amplificação génica de um determinado oncogene (Tabela 2).¹

Tabela 2. Principais defeitos genéticos no cancro de mama ¹

GENES DE CANCRO MAMÁRIO FAMILIAR ESTABELECIDOS			
<i>Gene</i>	<i>Localização cromossómica</i>	<i>Classe</i>	<i>Doença</i>
<i>p53</i>	17p13	oncossupressor (mutação / LOH)	síndrome Li-Fraumeni
<i>PTEN</i>	10q23	oncossupressor (mutação / LOH)	síndrome de Cowden
<i>RCA-1</i>	17q21	oncossupressor (mutação / LOH)	ca mama / ovário familiar
<i>BRCA-2</i>	13q14	oncossupressor (mutação / LOH)	ca mama fem./ masc. familiar
GENES DE PROGRESSÃO DE CANCRO MAMÁRIO ESTABELECIDOS			
<i>Gene</i>	<i>Localização cromossómica</i>	<i>Classe</i>	<i>Função</i>
<i>c-erb-B2</i>	17q12	oncogene(amplificação)	Subunidade receptor factor crescimento
<i>c-myc</i>	8q24	oncogene(amplificação)	Regulador ciclo cel. /apoptose /sint. prot.
<i>ciclina D1</i>	11q13	oncogene(amplificação)	Regulador ciclo cel. (fase G1)
<i>p16</i>	9p21	oncossupressor(metilação/LOH)	Regulador ciclo cel. (fase G1)
<i>RB-1</i>	13q14	oncossupressor(mutação/LOH)	Regulador ciclo cel. (fases G1/S)
<i>p53</i>	17p13	oncossupressor(mutação/LOH)	Reg. ciclo cel. /apoptose/ repar. DNA
<i>E-caderina</i>	16q22-23	oncossupressor(metilação/LOH)	Proteína adesão célula-célula

LOH – perda de heterozigotia

Os avanços mais recentes no conhecimento da carcinogénese mamária situam-se em grande parte no plano da genética oncológica, com a descoberta de 12 oncogenes e genes supressores tumorais reconhecidamente implicados no desenvolvimento desta neoplasia e a perspectiva de 14 outros genes suspeitos de participar no processo de oncogénese mamária poderem vir a integrar a lista das referidas alterações genéticas.²

Os genes supressores tumorais (oncossupressores) sofrem normalmente mutações ou deleções, enquanto que os oncogenes são usualmente amplificados ou sobreexpressos (Tabela 3).¹

Tabela 3. Principais genes oncossupressores e oncogenes (estabelecidos e suspeitos) no cancro de mama ¹

GENES ONCOSSUPRESSORES <i>ESTABELECIDOS</i>	ONCOGENES <i>ESTABELECIDOS</i>
p53	c-myc
RB1	c-erb-B2
BRCA1	FGF R1
BRCA2	FGF R2
PTEN	ciclina D1
p16/MTS-1	ciclina E
<i>SUSPEITOS</i>	<i>SUSPEITOS</i>
TSG101	A1B1
NM23	FAK
IGF-2 R	c-erb-B4
E-caderina	integrina $\alpha6\beta4$
p73	integrina $\alpha6\beta1$
integrina $\alpha2\beta1$	telomerase
	EGFR
	β -catenina

Existem aproximadamente 500 proteínas cínases no genoma humano, enzimas que actuam fosforilando substratos com resíduos tirosina, treonina ou serina e que se denominam, respectivamente, de tirosina-cínases, treonina-cínases e serina-cínases (há, ainda, cínases - caso da MAP cínase - que são serina-treonina-cínases).²⁰ As proteínas cínases encontram-se envolvidas na tradução do sinal, regulando positiva ou negativamente a actividade dos factores de transcrição. As tirosina-cínases constituem o domínio intracitoplasmático dos receptores dos factores de crescimento. Nas formas normais destes receptores, a actividade cínase sofre uma activação transitória quando o receptor complexa com o seu factor de crescimento específico. Dá-se, então, uma dimerização do receptor e uma fosforilação pela tirosina de vários substratos incluídos na cascata da indução do ciclo celular. Nas neoplasias humanas, a activação persistente da tirosina-cínase do receptor do factor de crescimento torna desnecessária a ligação ao seu ligando correspondente, conduzindo a uma estimulação contínua do sinal proliferativo nas células neoplásicas.⁸

Os oncogenes (genes dominantes) são activados por uma mutação que dá à célula uma vantagem selectiva competitiva. Apenas um alelo dos dois existentes tem de sofrer essa alteração. Os oncogenes podem actuar no sentido da tradução de sinais dos factores de crescimento, no sentido de serem anti-apoptóticos ou de contrariarem a acção dos genes supressores tumorais específicos. De uma forma

geral, a activação dos oncogenes durante a carcinogénese ocorre por mutações que induzem o ganho de função, como por exemplo, amplificação da ciclina D1 e do c-erb-B2 ou mutação pontual do ras. Pensa-se que a maioria das alterações nos factores de crescimento (sendo estes factores de crescimento proteínas secretadas) envolvem mecanismos autócrinos ou parácrinos de secreção.²¹ Os receptores dos factores de crescimento são normalmente activados por sobreexpressão. Muitos destes receptores são activados por homodimerização e os níveis aumentados destes receptores parecem reduzir a sua dependência do ligando na iniciação do sinal.

Também no cancro de mama os receptores tirosina-cínase (RTK) formam complexos homo-ou heterodiméricos funcionais, apresentando, como noutros tipos de neoplasias humanas, três domínios fundamentais: domínio extracelular de ligação hormonal (englobando uma região rica em cisteína); domínio transmembranar hidrofóbico; e, finalmente, domínio citoplasmático (englobando uma região tirosina-cínase).²² Dos 15 receptores tirosina-cínase associados com o cancro de mama, 9 possuem uma localização epitelial e 6 uma localização estromal (Tabela 4).

Tabela 4. Receptores tirosina-cínase associados com o cancro de mama ⁸

EPITELIAL	ESTROMAL
EGF (c-Erb-B1)	EGF R
FGF R1	FGF R1
FGF R2	FGF R2
c-Erb-B2	PDGF R
c-Erb-B3	R insulínico
c-Erb-B4	IGF-1 R
R insulínico	
c-Met	
IGF-1 R	

3.1 PROTO-ONCOGENE C-KIT

O proto-oncogene c-Kit (conhecido igualmente como CD 117) codifica o domínio tirosina-cínase numa proteína transmembranar que funciona como um receptor de factor de crescimento do tipo III estruturalmente similar ao receptor do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGF-R) e ao receptor do factor estimulador de colónias de tipo 1 (CSF1-R).^{23,24,25}

O c-Kit pertence, dentro da família de receptores RTK, à subfamília de receptores de tipo III, cujos membros incluem:

- receptores alfa e beta do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR alfa e beta)
- receptor do factor estimulador de colónias de tipo 1 (CSF1-R)
- receptor FLT3

Todos os membros desta família de receptores tirosina-cínase contêm cinco domínios *immunoglobulin-like* (IL) no seu domínio extracelular para ligação do respectivo ligando. Possuem, ainda, um único domínio transmembranar e, para

além disso, um domínio citoplasmático tirosina-cínase, no qual se encontra inserida uma cínase de grandes proporções (Figura 1).

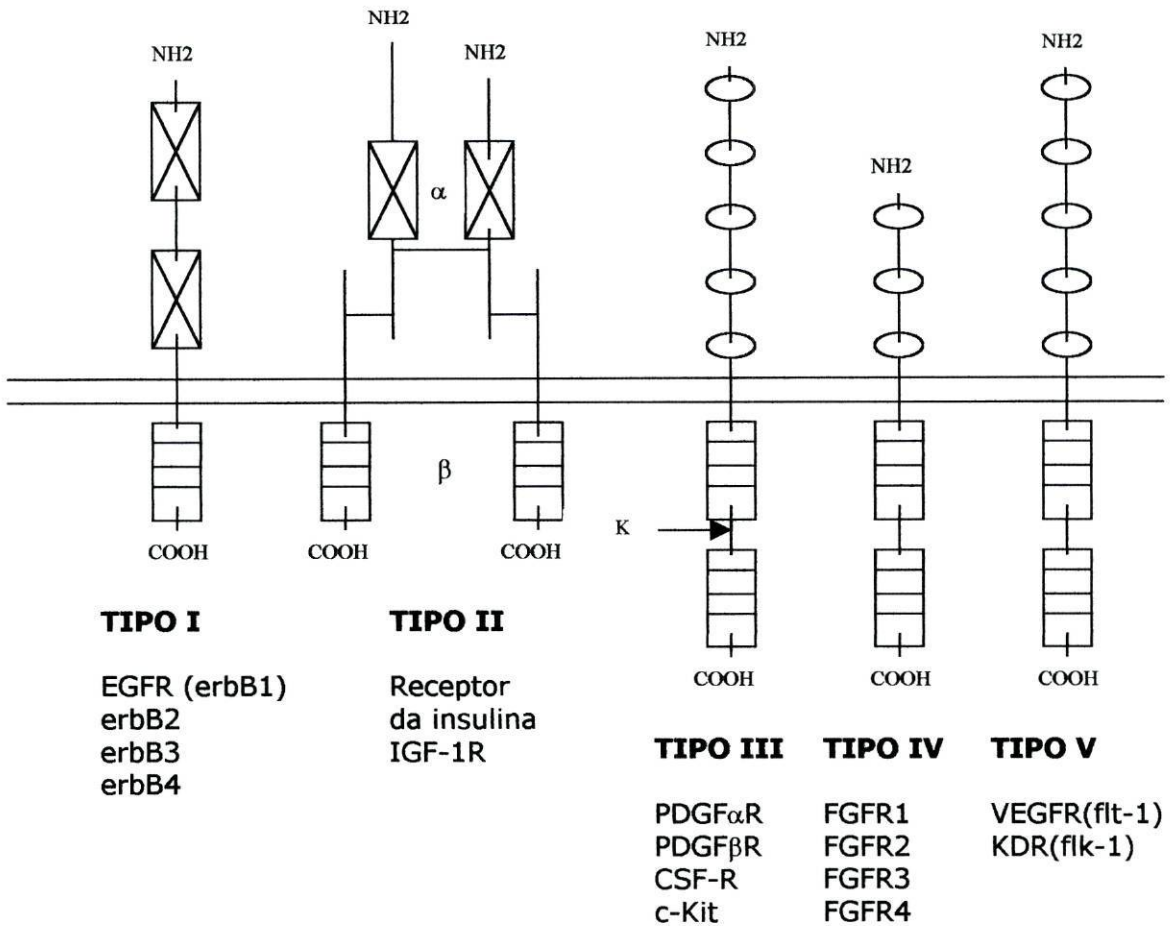


Figura 1. Tipos de receptores tirosina-cínase (RTK) (8)

Em 1997 foi descoberta a presença e importância funcional do ligando do c-Kit (inicialmente denominado Steel factor - SF- e, posteriormente, stem cell factor - SCF), sugerindo-se a existência de um mecanismo autócrino de crescimento celular promovido pela ligação do SCF ao RTK c-Kit.^{26,27,28} No mesmo ano, demonstrou-se que nas células de carcinoma colo-rectal se observa uma sobreexpressão de c-Kit e do seu ligando SCF, por comparação com as células da mucosa colo-rectal normal, contribuindo para o postulado do referido mecanismo autócrino.²⁹ O SCF é necessário para o crescimento, sobrevivência e potencial invasor da linha celular de carcinoma cólico DLD-1, funcionando, igualmente, como um factor de crescimento estimulador da sobrevivência, proliferação e diferenciação das células hematopoiéticas.^{30,31,32} No que se refere às neoplasias hematopoiéticas, sabe-se que a expressão de c-Kit (CD 117) e CD 11b na medula óssea permite distinguir a leucemia promielocítica aguda (em 77% dos casos CD 117 (+) e em apenas 6% dos casos CD 11b (+)) da fase de recuperação da agranulocitose aguda (um tipo de proliferação mielóide benigna).³³ O SCF comporta-se como uma citocina homodimérica não-covalente, sendo indispensável para a produção e função dos mastócitos e desempenhando, ainda, um papel importante no desenvolvimento dos

melanócitos, das células germinativas e das células "pacemaker" intestinais.^{34,35,36} No que respeita ao mecanismo de acção do dímero SCF-c-Kit, a dimerização do receptor tirosina-cínase (induzida pelo SCF) e consequente activação do c-Kit é seguida por uma internalização do c-kit e translocação deste para vesículas citoplasmáticas.³⁷ Importa referir que este processo de formação de vesículas é estritamente dependente da actividade tirosina-cínase do c-Kit. Essas mesmas vesículas, entretanto constituídas na periferia celular, dirigem-se para o centro através da chamada via endossómica num processo dependente do recrutamento de src e sem necessidade de recrutamento da PI3-cínase. O tratamento das células com óxido fenilarsínico (bloqueador da internalização do receptor) impede a translocação do c-kit para as referidas vesículas citoplasmáticas. Já o tratamento das células com inibidores proteassómicos conduziria, pelo contrário, à acumulação de vesículas. Finalmente e como corolário de todo este processo, observa-se (após a referida internalização do c-Kit) uma autofosforilação intermolecular do domínio intra-citoplasmático tirosina-cínase, no qual se encontra localizada uma enzima cinásica.

De um modo geral, no tecido mamário normal a presença da proteína do c-Kit correlaciona-se com o controlo do crescimento celular e a diferenciação do epitélio mamário normal.³⁸ A interacção do c-Kit com o seu ligando SCF activa duas vias de transdução do sinal, nomeadamente a via do Ras-MAP cínase (Figura 2) e a via do fosfatidil-inositol-3-cínase (PI3 cínase), o que condiciona, em última instância, um aumento de resposta a dois outros factores de crescimento: o factor de crescimento epidérmico (EGF) e a alfa-herregulina (α -HER).³⁹

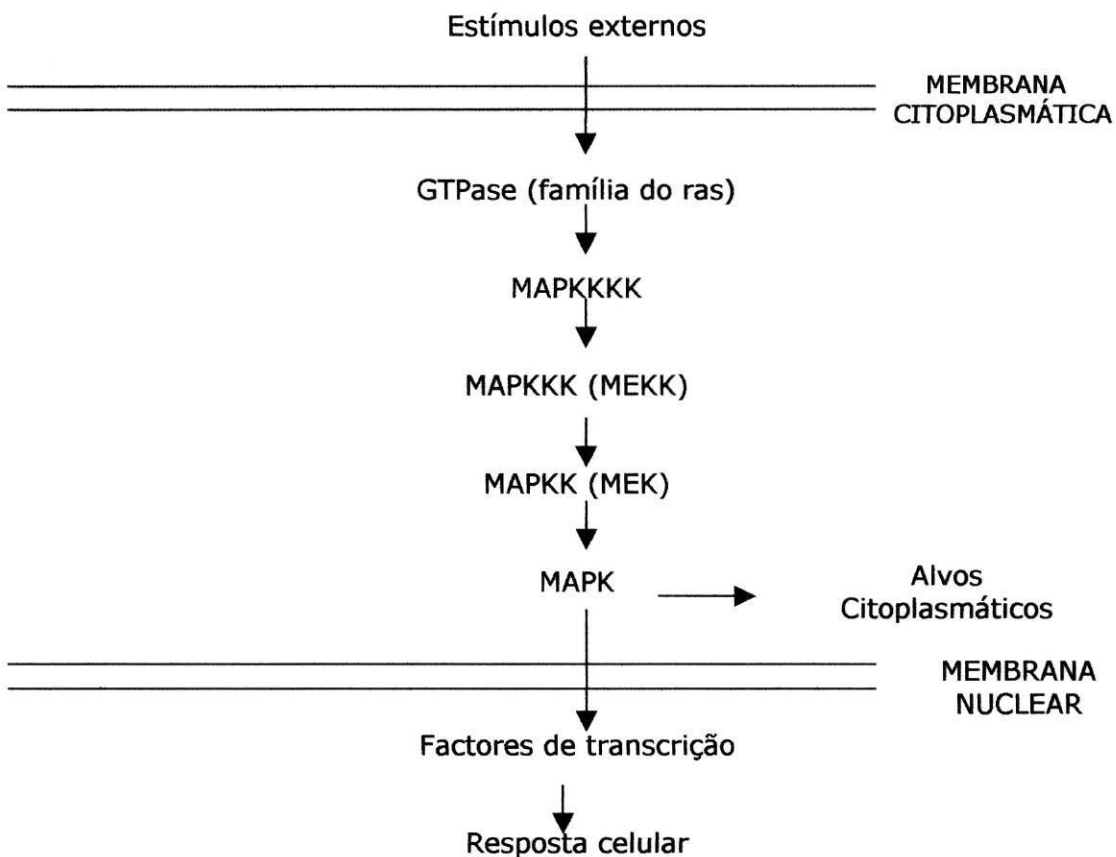


Figura 2. MAP cínase (a cascata de tradução de sinal da MAP cínase liga a activação do ras com o núcleo; uma série de acontecimentos sequenciais baseados nas cínases serina/treonina resulta na activação da MAP cínase que possui alvos citoplasmáticos e nucleares; estes alvos nucleares funcionam como factores de transcrição que se ligam aos seus locais de reconhecimento do DNA, obrigando à sua fosforilação para a indução das suas funções activadoras)²⁰

A activação do c-Kit poderá também ocorrer na ausência do factor de crescimento, desde que se verifique a degradação do SHP-1, uma tirosina-fosfatase que regula negativamente a sinalização do c-Kit.^{40,41} A ligação c-Kit-SCF permite a criação neste receptor de locais de ligação ("ancoragem") para inúmeras proteínas de transdução de sinal, contendo todas elas domínios SH2 (Figura 3) Estas incluem a fosfatidilinositol 3'-cínase (PI3K) e a fosfolípase C (PLC) gama-I, a Stat1, a família de cínases Src (Src, Lyn e Fyn), e, por último, a GAP (proteína activadora da GTPase).^{42,43} A ligação do SCF ao c-Kit activa, de igual forma, a proteína cínase C, o Rac1, o JNK e o Raf-1, promove, ainda, a fosforilação da tirosina do JAK2 e, finalmente, a associação da proteína adaptadora CRKL e da p120. Sempre que a anteriormente referida SHP-1 (uma tirosina-fosfatase que contém, igualmente, um domínio SH2) se conjuga com uma tirosina da região justamembranar do c-Kit, inframesa a transdução de sinal deste último.⁴⁴

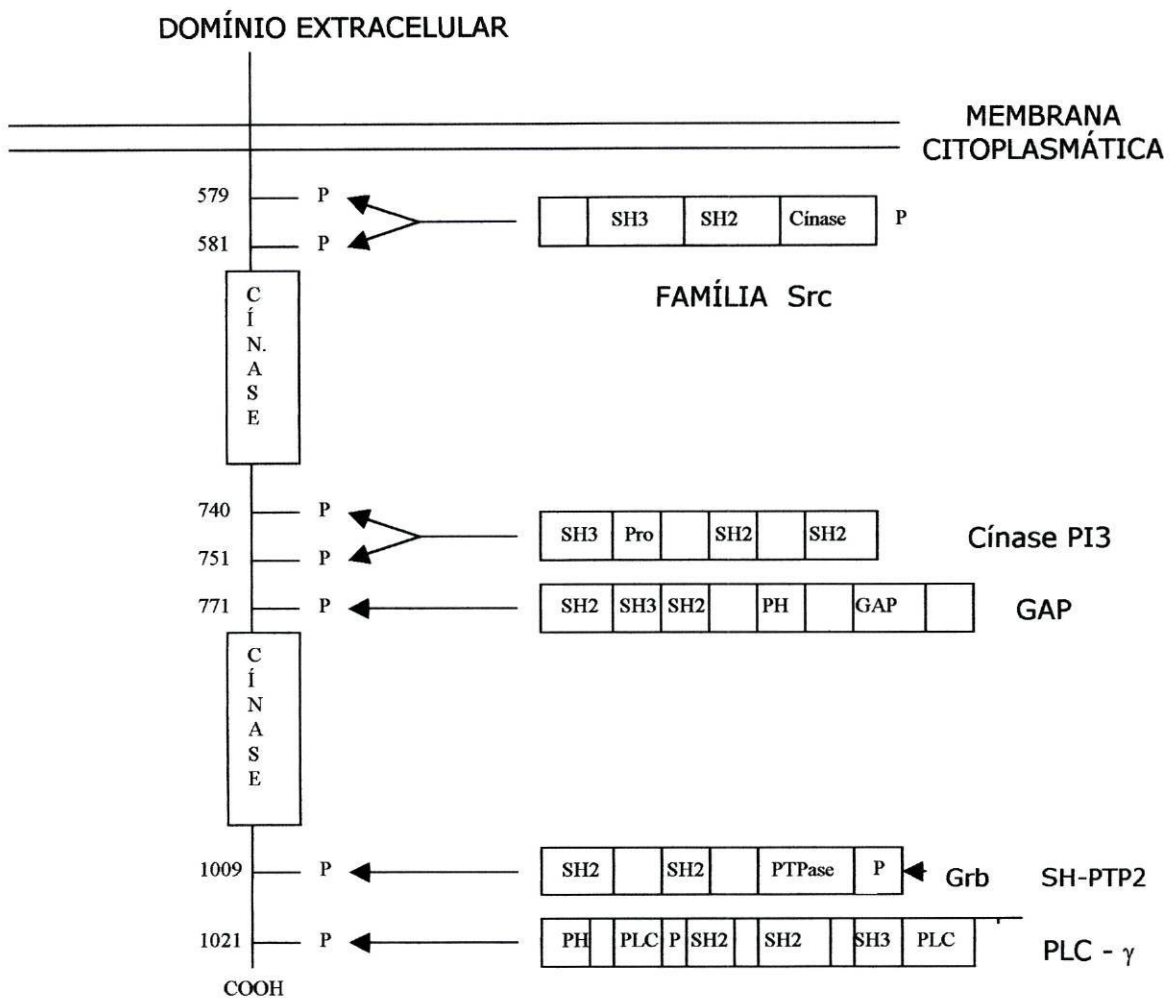


Figura 3. Locais de ligação nos RTK do tipo III das moléculas de transdução de sinal (os locais tirosínicos de ligação sofrem autofosforilação aquando da ligação de moléculas de transdução de sinal que contenham domínios SH2)⁴²

Deste modo, verifica-se, sucessiva e sequencialmente, um recrutamento de proteínas sinalizadoras (caso do Dok-1,^{52,53} regulador negativo da proliferação celular) uma fosforilação da tirosina dos substratos e, posteriormente, uma activação de múltiplas vias de sinalização, etapas dependentes da afinidade de ligação SCF-c-Kit.⁴⁵ A um outro nível de funcionamento, a activação do c-Kit (induzida pelo SCF) condiciona de forma específica a expressão de Slug.^{46,47,48,49,50,51} O Slug, sendo um membro da família Snail de factores de transcrição, funciona como um factor de transcrição *zinc-finger* interdependente do binómio SCF-c-Kit.

A *downregulation* dos receptores activados de tirosina-cínase (nomeadamente, c-Kit, EGF ou PDGF) pode, ainda, ser promovida pela família Cbl de lígases da ubiquitina (família que contém 3 membros: Cbl; Cbl-b e Cbl-3, através da ubiquitinação e degradação dos referidos receptores.^{54,55,56,57,58,59} Por último, alguns membros da superfamília transmembranar 4 (TM4SF) modulam, de igual modo, negativamente a função do c-Kit e, como tal, regulam a sensibilidade do c-Kit ao SCF em células progenitoras hematopoiéticas.⁶⁰ São os seguintes os efeitos do TM4SF sobre o c-Kit:

- menor internalização e degradação do c-Kit;
- menor fosforilação da tirosina-cínase e menor actividade cinásica em resposta ao SCF.^{61,62,63}

Em todo este processo, a tirosina-cínase nunca é "criada" nem destruída, mas sim constantemente reciclada.^{64,65,66,67}

3.2 REGULAÇÃO DA EXPRESSÃO DE C-KIT

A regulação transcricional da expressão do c-Kit tem sido descrita em diversos estudos.^{68,69,70} O proto-oncogene c-Kit compreende 21 exões (com uma extensão genómica de 80 Kb de DNA) ao nível do cromossoma 4q12.^{71,72} A maioria destes exões possui entre 100 e 200 pares de bases. A extremidade 3' da região codificante deste gene (correspondendo ao exão 1) possui 2300 pares de bases (2,3 Kb) e é flanqueada por sinais de poliadenilação. Este proto-oncogene apresenta, ainda, uma estrutura e organização similares aos genes que codificam outros RTK de tipo III, como é o caso de: receptor do factor estimulador de colónias de tipo 1 (CSF1-R); os receptores A e B do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGFRA e PDGFRB); o FLT1 e, ainda, o FLT3/FLK2. O c-Kit e o PDGFRA formam um primeiro *cluster* genético, localizando-se ambos no cromossoma 4 banda q11-13. O CSF1-R o PDGFRB agregam-se, igualmente, num segundo *cluster*, ao nível do cromossoma 5 banda q31-33. Por último, o FLT1 e o FLT3/FLK2 formam um terceiro *cluster*, desta feita no cromossoma 13 banda q12.

O protooncogene c-Kit codifica a síntese da proteína monomérica KIT, a qual possui três domínios (Figura 4)⁷³:

- 1- o domínio extracelular (exões 1-9), constituído por cinco domínios em ansa *immunoglobulin-like* (IL), local de ligação do SCF;
- 2- o domínio transmembranar (exão 10);
- 3- o domínio intracelular (exões 11-21), constituído por:

- uma hélice inibidora justamembranar (hélice anfipática de tipo alfa codificada pelo exão 11), que, ao suprimir a fosforilação e actividade cinásica no KIT não-ligado ao SCF, inibe a actividade do KIT;
- uma cínase intracelular (codificada pelo exão 17) constituída pelas duas sub-unidades que compõem a cínase do KIT e pelo *pocket* enzimático (que funciona como uma ansa de activação) em localização intermédia.

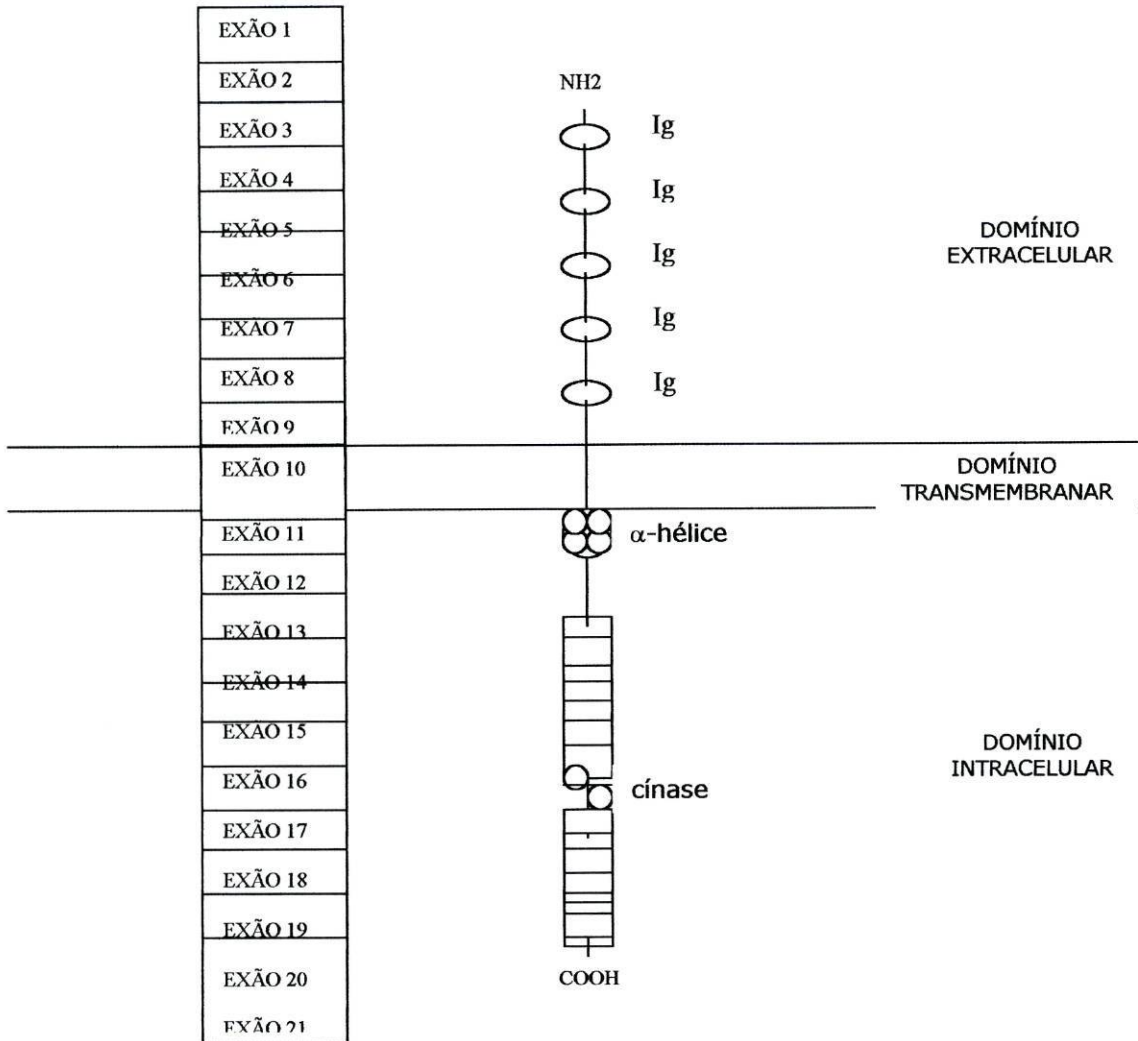


Figura 4. Estrutura molecular do c-Kit ⁷⁴

Estudos recentes atribuem funções diversas aos diferentes domínios extracelulares *immunoglobulin-like* (IL) da proteína KIT:

- os três primeiros domínios IL estão implicados na ligação ao SCF;
- o quarto domínio IL promove a dimerização do receptor;
- o quinto domínio IL parece estar envolvido na clivagem proteolítica do KIT da superfície celular, por forma a gerar a forma solúvel de KIT.⁷⁴

A região promotora do gene c-Kit, embora não possua nem o *TATA box* nem o *CCAAT box*, apresenta locais de ligação *consensus* para múltiplos factores de transcrição, incluindo Sp1, SCL, AP-2, Ets, Myb e GATA-1.^{75,76} Quer o SCL quer o Sp1 funcionam como reguladores positivos do promotor do gene c-Kit.^{77,78} A interacção do Sp1 com o promotor é considerada indispensável para a actividade máxima dessa mesma região promotora.

A região proximal do promotor do c-Kit localiza-se numa posição situada entre -124 e -83 do local de iniciação de transcrição. É possível encontrar reguladores positivos e negativos deste promotor num intervalo de 5,5 Kb a jusante do local de iniciação de transcrição. Importa referir, neste contexto, que no melanoma humano o

potencial metastático se correlaciona com a perda de expressão quer do factor de transcrição AP-2 quer do c-Kit (facto, igualmente, verificado nos carcinomas).⁷⁹ Verificou-se, ainda, a existência na região promotora do c-Kit de locais de ligação funcionais para o AP-2, pelo que a re-expressão de AP-2 nas células de melanoma restabeleceria a expressão endógena de c-Kit e suprimiria nestes casos a tumorigenicidade e potencial metastático dos melanomas.

Num outro plano de funcionamento, para além de uma regulação celular do c-Kit específica para cada tipo de células, os níveis de RNAm e de proteína do c-Kit são modulados por outras citocinas. O GM-CSF, apesar de promover sinergisticamente com o SCF o crescimento de células mielóides, promove *per se* uma perda de expressão do c-Kit nas referidas células mielóides. Também a IL-4 (nos mastócitos), o TGF-beta e o TNF-alfa (nas células hematopoiéticas precursoras), o interferão-gama (nas células eritróides progenitoras) e a IL-1 (nas células endoteliais) promovem uma *down-regulation* do RNAm do c-Kit.⁸⁰ O aumento da expressão do SCF nas células endoteliais por acção da IL-1 sugere, ainda neste contexto, a importância da relação entre c-Kit e SCF na inflamação da parede vascular.

A regulação da expressão do c-kit também ocorre ao nível do turnover da proteína do c-kit.⁸¹ A ligação do SCF ao C-kit condiciona uma endocitose do receptor (dependente da actividade enzimática do domínio cínase), ubiquitinação e degradação. A activação do receptor resulta na sua clivagem, com subsequente libertação do domínio extracelular solúvel.

3.3 ISOFORMAS DE SCF

O SCF existe na forma solúvel e na forma ligada a membrana (Figura 5), como resultado de um *splicing* diferencial e de uma clivagem proteolítica.^{82,83,84,85} O *splicing* alternativo do RNAm (resultando em deleção ou inclusão do exão 6) leva à produção de duas isoformas transmembranares de SCF, nomeada e respectivamente o SCF 220 e o SCF 248. Uma proteólise rápida do SCF 248 origina SCF solúvel que pode formar dímeros em solução. Um segundo local de clivagem, codificado pelo exão 7, conduz a uma proteólise lenta do SCF 220, originando, de igual forma, SCF solúvel. A forma de SCF ligada a membrana forma dímeros que parecem ser importantes para a função do c-Kit.

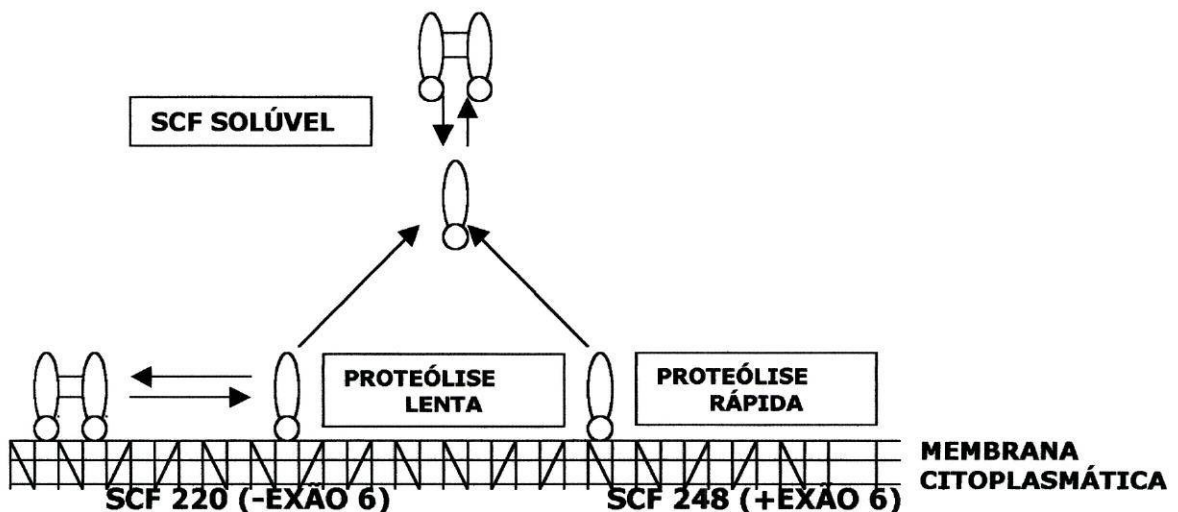


Figura 5. Isoformas transmembranares do SCF ⁷³

3.4 ISOFORMAS DE C-KIT

Sete isoformas do c-Kit foram já identificadas (Figura 6).^{86,87,88} Quatro delas resultam de *splicing* alternativo do RNAm e caracterizam-se pela presença ou ausência de uma sequência tetrapeptídica – GNNK – na região justamembranar do domínio extracelular e, ainda, pela presença ou ausência de um resíduo de serina na região intercinásica do domínio citoplasmático.^{89,90,91} Estudos posteriores indicam que as isoformas GNNK+ e GNNK- são coexpressas na maioria dos tecidos, com um predomínio desta última, embora não tenha sido observada qualquer correlação entre a expressão de uma determinada isoforma e os diferentes parâmetros clínico-biológicos estudados.^{43,92} Noutro estudo que analisou a saturação da ligação c-Kit-SCF não se demonstrou qualquer divergência na afinidade das diferentes isoformas para o SCF, sendo que nenhuma delas evidenciou fosforilação da sua tirosina sem ligação prévia ao SCF.⁹³ Após ligação ao SCF, a isoforma GNNK- sofreu um nível mais elevado de fosforilação da sua tirosina, foi mais rapidamente internalizada e activou de modo mais intenso a cascata MAP-cínase, comparativamente à isoforma GNNK+. De forma contrastante, as duas isoformas demonstraram um nível idêntico de recrutamento da PI3-cínase e um nível idêntico de activação do c-Akt, effector a jusante (*downstream*) da PI3-cínase. Estes dados indicam que as isoformas do c-Kit diferem na sinalização e na função. Desconhecem-se, no presente, as consequências funcionais da presença ou ausência do resíduo S na região intercinásica do receptor.

A isoforma solúvel do receptor – Kits – pensa-se ser criada por clivagem proteolítica do receptor e encontra-se presente em circulação sanguínea.^{94,95} O seu significado funcional, bem como a sua proveniência (isoforma GNNK+ e/ou isoforma GNNK-) encontra-se, ainda, por esclarecer.

Por último, duas isoformas truncadas do c-Kit (tr-Kit) foram descritas em células neoplásicas de carcinoma de cólon e em espermátides murinas mediante o uso de promotores crípticos, respectivamente, nos intrões 15 e 16.

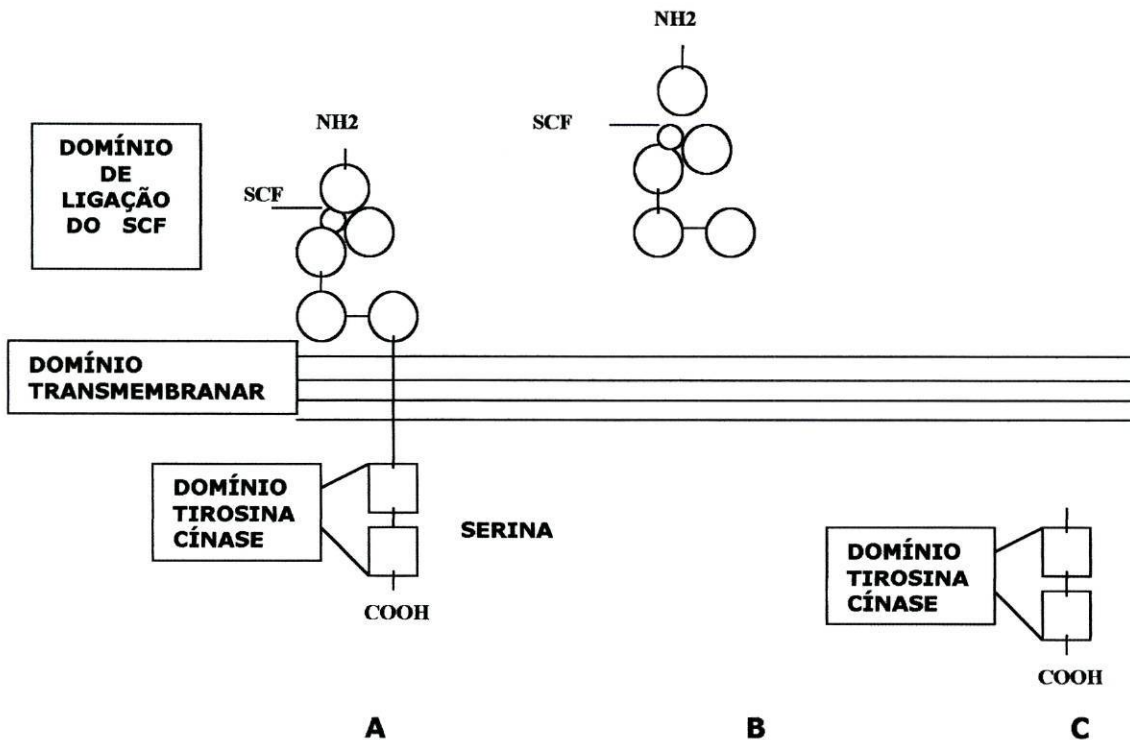


Figura 6. Isoformas do c-Kit⁷³

[A- c-Kit GNNK+/GNNK- / B- c-Kit solúvel / C- c-Kit truncado (tr-Kit)]

3.5 MUTAÇÕES DE C-KIT

A proteína KIT é expressa e é indispensável para o crescimento e desenvolvimento dos mastócitos, melanócitos, células estaminais hematopoiéticas e células intersticiais de Cajal.⁴⁰ A proteína KIT que não se encontra ligada ao SCF existe predominantemente como um monómero enzimaticamente inactivo ao nível da membrana citoplasmática da célula. O SCF existe, sobretudo, como um dímero bivalente, podendo ser expresso na superfície das células estromais ou libertado como uma molécula solúvel por clivagem proteásica. A ligação do SCF induz uma dimerização do KIT e uma auto-fosforilação da tirosina no domínio intracelular do receptor.⁹⁶ Esta auto-fosforilação de resíduos específicos de tirosina cria locais de ancoragem para moléculas de transdução de sinal e induz ligação do substrato e fosforilação. Algumas vias de transdução de sinal como a via PI3K/AKT e a via JNK foram implicadas na mediação da mitogénese induzida pelo KIT.²⁰

Mutações que provoquem fosforilação constitutiva independente do ligando e activação do KIT transformam, *in vitro*, linhas celulares dependentes de factores de crescimento em linhas celulares que não se encontram estritamente dependentes de factores de crescimento e, para além disso, convertem, *in vivo*, tumores indolentes em tumores agressivos.⁹⁷ Mutações somáticas causando activação constitutiva do KIT foram associadas a certas neoplasias como a mastocitose adulta ou pediátrica atípica e a maioria dos GIST.^{98,99} Estas mutações activadoras do KIT dividem-se em dois tipos (Figura 7):

1- Mutações de tipo *pocket* enzimático, que alteram a sequência de aminoácidos que constituem directamente o local enzimático.

2- Mutações do tipo regulador, que afectam a regulação da molécula de cínase.

O primeiro tipo de mutações tem como exemplo a substituição D816V, característica da mastocitose adulta, que afecta a ansa de activação à entrada do *pocket* enzimático localizado no domínio cinásico do KIT. As mutações do tipo regulador (que ocorrem, por exemplo, nos GIST), pelo contrário, não afectam a sequência de aminoácidos do local enzimático, mas sim a hélice inibitória justamembranar (cuja função é a inibição da molécula de cínase).^{100,101,102} Desta forma, inibindo esse papel inibidor de cínase promovido pela referida hélice, obtém-se uma activação constitutiva do KIT.

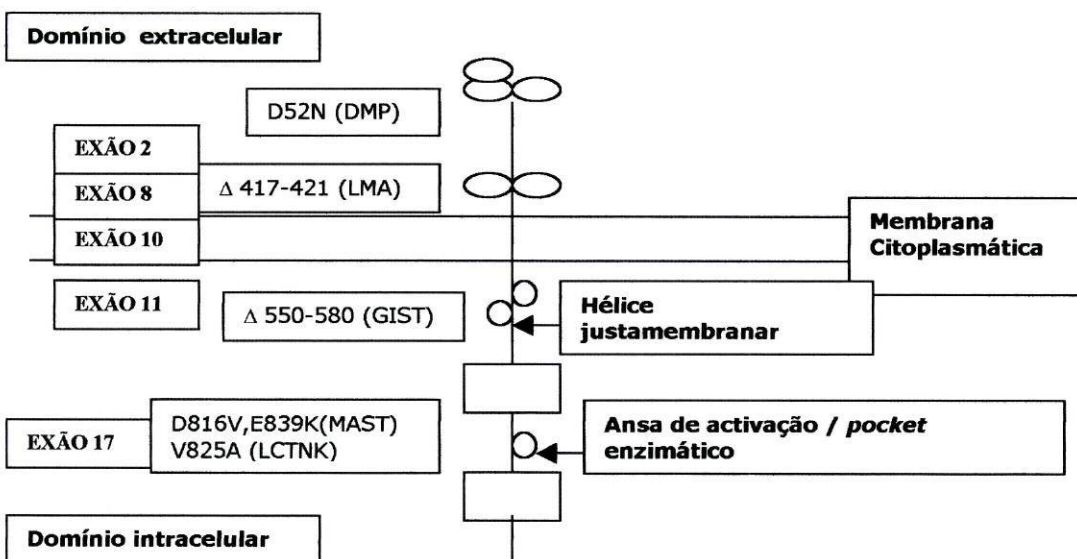


Figura 7. Mutações do c-Kit ⁷³

[DMP- Doença mieloproliferativa / LMA- Leucemia mielóide aguda / MAST- Mastocitose / LCTNK- Linfoma células T / NK]

Outros potenciais mecanismos de acção das mutações de tipo regulador correspondem a:

- efeitos do acesso do substrato ao local enzimático;
- efeitos na ligação ao KIT de moléculas reguladoras ou de transdução de sinal;
- indução de dimerização independente do ligando, com subsequente autofosforilação e activação.

No que se refere aos GIST, neste tipo de neoplasias as mutações envolvem o domínio justamembranar (exão 11) do c-Kit.⁶⁶ As mutações pontuais oncogénicas somáticas deste mesmo c-Kit ao atingirem o domínio extracelular ou o domínio citoplasmático deste RTK activam-no constitutivamente, constituindo um acontecimento patogénico central em até 92% dos GIST. Estas mutações possibilitam que o receptor do c-Kit (SCF) fosforile vários substratos proteicos, activando as cascatas de tradução de sinal que regulam a proliferação celular, a apoptose, a quimiotaxia e a adesão celular. Importa, ainda, mencionar que as mutações mais comuns no GIST consistem em deleções *in frame* de vários codões e, menos usualmente, mutações pontuais e inserções. Sabe-se já, igualmente, que os dois tipos de mutações activadoras do c-Kit (mutações do “tipo regulador” que afectam a regulação da molécula tirosina-cínase e mutações do “tipo locus enzimático” que alteram directamente a sequência de aminoácidos que codificam o referido locus enzimático) respondem de forma diferente aos inibidores do c-Kit, pelo que se torna necessária, por forma a orientar a terapêutica, a classificação dos doentes com base nas mutações específicas de cada indivíduo.⁶⁷

A distinção entre estes tipos de mutações tem implicações terapêuticas.¹⁰³ Alguns autores sugerem que as mutações somáticas do c-Kit são mais comuns em GIST malignos do que em GIST benignos, tendo sido proposto que as mutações no exão 11 do c-Kit sejam consideradas como um factor de mau prognóstico.¹⁰⁴ Outros, ainda, são da opinião que as mutações do c-Kit *per se* apresentam pouco significado prognóstico por dois motivos:

- as mutações em GIST com menos de 1 cm (GIST acidentalmente detectados) diferem das mutações em GIST com mais de 1 cm (GIST detectados clinicamente)¹⁰⁵
- as mutações nos GIST não se correlacionam com determinados parâmetros clinico-patológicos.

Os inibidores da cínase do KIT que inibam inicialmente o local enzimático *wild-type* do KIT deixam de o fazer se, entretanto, ocorrer uma mutação (de tipo *pocket* enzimático) que altere molecularmente o dito *locus* enzimático. Pensa-se que esses inibidores de cínase do KIT que se ligam ao *pocket* enzimático *wild-type* também poderão bloquear a activação da região reguladora justamembranar (hélice inibitória) por mutações activadoras de tipo regulador. Estes dois tipos de mutações activadoras respondem de modo diferente aos inibidores da cínase do KIT, pelo que a determinação do tipo de mutação especificamente desenvolvida por cada indivíduo afigura-se como indispensável para melhor conduzir a terapêutica individual dos doentes.¹⁰⁶

3.6 ACTIVAÇÃO CONSTITUTIVA DE C-KIT

A activação da tirosina-cínase do c-Kit dá-se de duas formas¹⁰⁷:

- A activação da tirosina-cínase à qual se liga o c-Kit por mutação somática encontra-se bem documentada em determinadas neoplasias humanas: GIST; mastocitose; seminoma e em leucemia mielóide aguda (LMA)¹⁰⁸;
- A activação da tirosina cínase do c-Kit pode dar-se, pelo contrário, por activação parácrina ou autócrina, secundária à ligação do SCF ao c-Kit, o

- 2- Numa percentagem de casos, as doenças mieloproliferativas crónicas têm uma activação constitutiva do gene para o receptor beta do factor de crescimento das plaquetas (PDGFRbeta), gene localizado no cromossoma 5q33 que codifica um RTK. A activação constitutiva desse gene é devida a uma translocação t (5;12)(q33;p13), associada com o gene de fusão ETVG-PDGFRbeta. Nos doentes com doenças mieloproliferativas (policitemia vera / trombocitose essencial / mielofibrose idiopática) associadas a activação do PDGFRbeta o MI induz respostas terapêuticas duradouras.¹²⁶
- 3- Mutações activadoras com envolvimento do domínio transmembranar (exão 11) de outro RTK de tipo III – o c-Kit – foram demonstradas nos GIST. O MI é, desta forma, igualmente utilizado para o tratamento dos GIST malignos irrecorríveis e/ou metastáticos (resistentes à quimioterapia convencional)^{127,128} Nestes casos o MI induz em 53,7% dos doentes uma resposta parcial. Este fármaco provoca, como principais efeitos laterais, edema moderado, diarreia e fadiga (em 5% dos casos provoca hemorragia gastro-intestinal ou abdominal). Estudos *in vitro* sugerem que os GIST com mutações do “tipo regulador” do c-Kit respondem melhor ao MI que os GIST com mutação do “tipo locus enzimático”. Uma minoria de GIST (10%) não apresenta mutações do c-Kit, sendo que 35% desses casos (desprovidos de mutações de c-Kit) apresentam mutações activadoras do PDGFR de tipo alfa (RTK de tipo III, à semelhança do c-Kit).). Nos restantes 65 % de casos deste tipo de patologia nos quais não se detectam mutações do c-Kit este é, com probabilidade, fortemente activado por possíveis mecanismos não-mutacionais, tal como por processos autócrinos de interacção c-Kit - . Outra hipótese mais remota aventada consiste em, estes mesmos GIST, possuírem mutações do c-Kit que ainda não consigam ser detectadas pelos métodos convencionais de rastreio de mutações (PCR e/ou SSCP).⁵⁸

Em resumo, os inibidores tirosina-cinase, ao inibirem as actividades bioquímicas que resultam de mutações oncogénicas com ganho de função, funcionam como anti-neoplásicos moleculares de primeira linha. Os avanços na genética das células somáticas e da bioquímica possibilitarão o desenvolvimento de anti-neoplásicos de segunda geração que inibirão selectivamente proteínas cuja presença dependa da ocorrência de mutações oncogénicas com ganho de função ou com perda de função.^{129,130}

Neste contexto, a inibição selectiva das tirosina-cinases pode ser actualmente considerada uma abordagem promissora na concepção de novos fármacos no domínio da Oncologia e já vem sendo utilizada em diferentes tipos de cancro.^{131,132,133,134} Em carcinomas mamários está já descrita perda de expressão do c-Kit, tanto por técnicas imunohistoquímicas como moleculares.^{135,136,137} Encontra-se, igualmente, em estudo a pesquisa de mutações com ganho de função na patologia mamária.³⁹

3.8 TUMORES MAMÁRIOS MESENQUIMATOSOS E EXPRESSÃO DE C-KIT

À semelhança do protooncogene c-Kit, também o PDGF é um receptor tirosina-cinase de tipo III e, como tal, apresentam um comportamento análogo. Foi demonstrada recentemente nos tumores filóides da mama (TF) a coexpressão do PDGF e do receptor beta do PDGF nos dois componentes tecidulares (epitélio e estroma) dos TF, apontando para uma clara interacção epitélio-estromal neste tipo de neoplasias.

O PDGF é um potente mitogénio para células mesenquimatosas e, ao induzir a libertação macrofágica de TGF- β , estimula indirectamente a diferenciação de fibroblastos em miofibroblastos. *In vitro*, células da linha celular MCF-7 transfectadas com Ras oncogénico estimulam, através do PDGF, a proliferação de

miofibroblastos mamários, pelo que Shao *et al.* consideram o PDGF como o principal factor responsável pela iniciação da desmoplasia no cancro mamário e, ainda, um co-factor na iniciação de outras neoplasias mamárias, nomeadamente mesenquimatosas.

O TF é uma neoplasia rara, constituindo 0,5% da totalidade das neoplasias mamárias, de natureza fibroepitelial, que se origina do estroma periductal do parênquima mamário. Caracteriza-se, essencialmente, por uma expansão e aumento da celularidade do componente estromal da mama, tendo sido recentemente descrita por Tavassoli *et al.* uma neoplasia análoga - o tumor estromal periductal mamário - uma lesão rara com comportamento sarcomatoso de baixo grau, anteriormente incluída no subtipo histológico dos TF.^{143,144} Manifesta-se clinicamente como um tumor solitário unilateral facilmente detectado pela imagiologia (mamografia ou ecografia mamária), sendo a média etária das doentes atingidas de 45 anos de idade e a sua dimensão média estimada de 4,5 cm. Este tipo de lesão subclassifica-se histologicamente (com base na celularidade do estroma, na actividade mitótica e no padrão de crescimento) em TF benigno, TF maligno de baixo grau e TF maligno de alto grau. Esta subclassificação é altamente preditiva da evolução clínica esperada, pelo que o TF benigno apresenta uma probabilidade quase nula de metastização e, após excisão, recidiva localmente em apenas 21% dos casos.¹⁴⁵ Já o maligno de baixo grau metastiza em menos de 5% dos casos, com uma recidiva local de 46% dos casos. Finalmente, o maligno de alto grau metastiza em 25% dos casos, apresentando em 65% dos casos uma recidiva local. A recidiva local dos TF é particularmente deletéria dada a sua tendência, quando recidivam, em malignizar e, ainda, em invadir a parede torácica.^{146,147} O TF maligno que metastize não responde satisfatoriamente a quimioterapia nem a radioterapia.¹⁴⁸

O papel da transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) vem sendo referido quer nas neoplasias mesenquimatosas, quer nas neoplasias epiteliais.

No parênquima mamário normal a transição epitélio-mesenquimatosa (EMT) compreende os seguintes elementos:

- camada epitelial-mioepitelial ductal;
- lâmina basal;
- zona envolvente, constituída por fibroblastos e por capilares;
- zona periférica, constituída por fibras elásticas (presentes no estroma periductal e ausentes no estroma intralobular) e, ainda, (no estroma periductal) por escassos linfócitos, plasmócitos e histiócitos (incluindo alguns histiócitos periductais - ocrócitos- que acumulam intracitoplasmaticamente pigmento lipofuscínico).

Por mecanismos associados com a perda dos receptores de estrogénio e de progesterona e, ainda, com defeitos primários na organização das proteínas desmossómicas e citosqueléticas, a EMT sofre alterações profundas durante o processo de invasão estromal pelo carcinoma mamário.¹⁴⁰ A produção estromal da protease estromelina III enquanto factor de degradação da EMT foi, aliás, proposta como um dos marcadores iniciais de carcinoma invasor da mama, embora mais recentemente se tenha sugerido que toda a síntese de proteases produzida por uma determinada neoplasia pareça constituir, na verdade, uma reacção do hospedeiro contra o próprio tumor.¹⁴¹ Ainda assim, não deixa de ser curioso verificar uma disparidade no subtipo de factor de crescimento insulínico (IGF) produzido pelos fibroblastos do cancro de mama (IGF-2), por comparação com o subtipo de IGF produzido pelas células fibroblásticas do tecido mamário normal (IGF-1).¹⁴² Esta EMT, cuja ligação e interdependência com a expressão de c-Kit começa a ser esclarecida, é sede, como já referido, de múltiplas neoplasias mamárias, entre as quais se incluem os tumores filóides da mama.⁵⁰

Dada a progressão para sarcoma em alguns casos, o estroma dos TF vem sendo geralmente considerado como o elemento neoplásico e o epitélio como não-neoplásico. Estudos de clonalidade inicialmente efectuados para cinco TF sugeriram que o estroma seria monoclonal e o epitélio policlonal.^{149,150} Apesar disso pode ser

encontrado epitélio hiperplásico em alguns destes tumores e foi já descrita a associação com CLIS e CDISOE da mama.¹⁵¹ A hibridização genómica comparativa realizada em 18 tumores filóides revelou que as deleções em 3p e as inserções em 1q constituíam as anomalias cromossómicas mais comuns neste tipo de tumores, podendo, igualmente, ser detectadas com frequência no carcinoma mamário.^{152,153,154,155} Tal sugere que os mesmos genes poderão estar envolvidos nestes dois tipos de patologia mamária. Existe, ainda assim, a possibilidade de que este tipo de tumores sejam, do ponto de vista genético, menos heterogéneos e, como tal, mais passíveis de mapeamento genético.

Um estudo mais recente de *imbalance* alélico (AI) em TF, recorrendo ao estudo por microssatélites nos cromossomas 1q e 3p, concluiu que o AI no epitélio destas neoplasias é tão comum como no estroma, pelo que, pelo menos em alguns deles, quer o estroma quer o epitélio são neoplásicos.¹⁵⁶ Os dados deste mesmo estudo sugerem que, por vezes, as alterações genéticas no estroma e epitélio são discordantes. As duas teorias explicativas deste fenómeno são:

1. os dois componentes do tumor apresentam origens clonais independentes;
2. o estroma e o epitélio originam-se do mesmo clone e adquirem diferentes mutações durante a progressão tumoral.

A baixa probabilidade de existência de mutações independentes no estroma normal adjacente e no epitélio, e por outro lado, a concordância de AI em alguns TF apontam a segunda teoria explicativa como sendo mais provável.

Estudos recentes demonstraram que os TF malignos apresentam áreas focais de celularidade estromal aumentada, de preferência de localização subepitelial, que correspondem a áreas de imunorreactividade estromal de p53.^{157,158,159}

4. OBJETIVOS

OBJECTIVO PRINCIPAL

O objectivo principal deste trabalho foi o de estudar a expressão do proto-oncogene c-Kit (CD117) em lesões benignas e malignas de mama.

OBJECTIVOS SECUNDÁRIOS

Os objectivos secundários deste trabalho foram os seguintes:

1. estudar as diferenças de expressão de c-Kit entre patologias benigna e maligna de mama;
2. analisar o local de expressão celular de c-Kit (membranar/citoplasmática/nuclear);
3. avaliar o papel desempenhado pelo c-Kit nos diferentes subtipos de carcinoma de mama (*in situ*/invasor);
4. correlacionar a expressão de c-Kit com os parâmetros clínico-patológicos de carcinoma invasor de mama;
5. identificar na patologia mamária potenciais alvos terapêuticos dos inibidores tirosina-cínase.

5. MATERIAL E MÉTODOS

MÉTODOS:**Casos**

Foram estudados retrospectivamente 55 casos representativos de patologias mamárias benignas (n=20) e malignas (n=35) diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S.João (Porto). Os casos encontravam-se arquivados sob a forma de blocos de parafina (previamente fixados em formol) e foram revistos em cortes corados por hematoxilina-eosina (HE) e estudados do ponto de vista imuno-histoquímico.

A Classificação histopatológica utilizada baseou-se na empregue por Grupos Internacionais de Consenso em patologia mamária^{21,160,161,162}:

1. Patologia benigna [nº de casos]:
 - Adenose [3]
 - Tumor adenóscico [3]
 - Papilomas múltiplos [2]
 - Fibroadenoma [2]
 - Tumor filóide benigno [10]

2. Patologia maligna [nº de casos]:
 - Tumor filóide maligno [5]
 - Carcinoma ductal *in situ* (CDIS) [10]
 - Carcinoma ductal invasor sem outra especificação (CDISOE) [10]
 - Carcinoma ductal invasor outro tipo histológico (CDIO) [10]

No que respeita à gradação das neoplasias malignas, esta foi realizada de acordo com o sistema de Nottingham.^{163,164,165}

O Índice prognóstico de Nottingham determina-se da seguinte forma:

IPN = 0,2 x Diâmetro + Estadio + Grau

Diâmetro: em cm

Estadio:

Estadio A = 1 sem metástases ganglionares
 Estadio B = 2 três ou menos gânglios axilares do nível inferior ou um gânglio na mamária interna
 Estadio C = 3 quatro ou mais gânglios de nível inferior ou um gânglio apical ou um gânglio na mamária interna e do nível inferior simultaneamente

Grau:

Grau 1,2,3 da classificação de Bloom-Richardson modificada:

A- Formação de túbulos

Grau 1- mais de 75 % de formação de túbulos

Grau 2- 10 a 75 % de formação de túbulos

Grau 3 – menos de 10 % de formação de túbulos

B- Tamanho nuclear

Grau 1- tamanho normal (duas a três vezes o dos eritrócitos)

Grau 2- núcleos de tamanho intermédio

Grau 3- núcleos muito grandes, vesiculares, com nucléolos proeminentes

C- Índice mitótico (área de campo de 0,196 mm²)

Grau 1- 0-7 mitoses por 10 c.g.a
Grau 2- 8-14 mitoses por 10 c.g.a
Grau 3- 15 ou mais mitoses por 10 c.g.a

Grau 1(Total): se A+B+C de 3, 4 ou 5
Grau 2 (Total): se A+B+C de 6 ou de 7
Grau 3 (Total): se A+B+C de 8 ou de 9]

Anticorpo

O anticorpo utilizado foi o anti-c-Kit IgG (imunoglobulina do tipo IgG), comercialmente disponibilizado pela *Novocastra Immunohistochemistry* (Newcastle, U.K.), clone T-595, na concentração de 1:60.

Existem três anticorpos dirigidos "contra" o c-Kit, nomeadamente o Ab-1 (Anticorpo monoclonal IgG1), o Ab-2 (Anticorpo monoclonal IgG1) e o Ab-3 (Anticorpo monoclonal de rato IgG2a).²³ O determinante antigénico dos três anticorpos apresenta como peso molecular 145kDa. O Ab-1 tem como epítopo o quarto terminal azotado do domínio extracelular *immunoglobulin-like* (IL) do c-Kit, inibindo a dimerização do c-Kit induzida pelo SCF, sem condicionar inibição da ligação do SCF ao c-Kit. Este Ab-1 precipita, dessa forma, apenas o c-Kit monomérico. Quer a IgG intacta quer o fragmento Fab inibem de modo eficiente a autofosforilação tirosínica do c-Kit. Já o Ab-2 tem como epítopo o primeiro e segundo terminais azotados do domínio extracelular IL do c-Kit, inibindo a proliferação dos megacariócitos humanos dependentes do SCF (células M07e) e, ainda, inibindo a ligação do SCF ao c-Kit. Não afecta a indução da síntese de DNA condicionada pelo GM-CSF ou pela IL-3. Por último, o Ab-3 tem como epítopo o segundo terminal azotado do domínio extracelular IL do c-Kit, não inibindo, à semelhança do Ab-1, a ligação do SCF ao c-Kit. O Ab-3 precipita quer a forma "ocupada" quer a forma "não-ocupada" deste proto-oncogene. Qualquer um destes três anticorpos do c-Kit apresenta como localização celular o citoplasma ou a membrana citoplasmática, apresentando como controlo interno positivo os mastócitos do parênquima mamário, os mastócitos da derme da pele normal, ou os melanócitos da camada basal da epiderme, e como controlo externo positivo são usualmente utilizadas as células neoplásicas dos tumores germinativos testiculares. Os três, Ab-1, Ab-2 e Ab-3, encontram aplicações na Imuno-histoquímica (cortes de congelação ou blocos de parafina) e na Imunofluorescência. O Ab-2 pode, ainda, utilizar-se em Imunoprecipitação (apenas na forma livre do c-Kit). Nenhum dos três anticorpos pode ser utilizado em *Western Blotting*. O anticorpo utilizado no presente estudo pertence à classe Ab-1, pelo que inibe a dimerização do c-Kit induzida pelo SCF (sem inibir a ligação do SCF ao c-Kit), precipitando, deste modo, apenas o c-Kit monomérico.

Imuno-histoquímica

O estudo imuno-histoquímico dos cortes seriados correspondentes aos casos em estudo foi efectuado utilizando métodos padronizados. Os cortes efectuados com 4 µm de espessura foram montados em gelatina (Merck, Darmstadt, Alemanha) e em 12-hidrossulfato de potássio crómico (III), secos a 37°C e desparafinizados com xileno. A peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogénio em metanol durante 10 minutos. Previamente à incubação com o anticorpo primário, os cortes foram submetidos a recuperação antigénica com a utilização de solução *retrieval* com EDTA (EDTA Buffer, Lab Vision Corp., Fremont, USA) durante 30 minutos em banho-maria a 98°C. De seguida, os cortes seriados foram submetidos a um bloqueio proteico com um soro específico (*Ultravision block*; Lab Vision Corp., Fremont, USA) e incubados com o anticorpo primário (c-Kit, anticorpo monoclonal, *Novocastra Immunohistochemistry*, Newcastle, U.K., T-595, 1:60). As restantes etapas do estudo imuno-histoquímico foram realizadas utilizando um sistema de

detecção antigénico imunoenzimático baseado no método da estreptavidina – biotina (*Kit UltraVision Large Volume Detection System Anti-Polyvalent HRP*, Lab Vision Corp., Fremont, EUA). Finalmente, após lavagem em PBS, procedeu-se a uma coloração dos referidos cortes seriados com hematoxilina de Harris, desidratação, limpeza e, por último, montagem em resina sintética. Como controlo interno positivo da referida técnica imuno-histoquímica foram utilizados os mastócitos do tecido mamário normal e como controlo externo positivo foi utilizada uma lâmina correspondente a um caso de tumor estromal gastrointestinal (GIST) positivo para o c-Kit.

Gradação da imunoreactividade do c-Kit

A avaliação em termos gradativos da imunoreactividade das células mamárias “para” o c-Kit foi efectuada com base na gradação proposta por Makhoulouf *et al.*¹⁶⁶ Atendendo à percentagem de células epiteliais e/ou estromais com marcação para o c-Kit:

- 0% de células imunorreativas – score 0
- 0-25% de células imunorreativas – score 1+
- 25-50% de células imunorreativas – score 2+
- 50-100% de células imunorreativas – score 3+

Os scores 0 e 1+ foram considerados como negatividade “para” c-Kit e os scores 2+ e 3+ foram considerados como positividade “para” c-Kit.

De seguida, determinou-se, quer para os casos negativos (score 0 e 1+), quer para os casos positivos (score 2+ e 3+), a média do grau de imunoreactividade epitelial e/ou estromal “para” o c-Kit, à semelhança do estudo efectuado por Chui X *et al.* no âmbito da expressão de c-Kit em neoplasias mamárias.¹³⁵ Para tal, determinou-se a média aritmética dos scores (0,1+,2+ ou 3+) observados em cada tipo de patologia mamária estudada, determinando-se, igualmente, o desvio-padrão correspondente à média aritmética obtida. Esta média calculou-se, para cada tipo de patologia mamária estudada, através do somatório de todos os scores parcelares obtidos, dividido pelo número de casos estudados (referentes a cada um dos diferentes tipos de patologia).

Análise estatística

Os dados obtidos foram avaliados da seguinte forma:

- a diferença entre as médias de variáveis contínuas (como a gradação da imunoreactividade do c-Kit) foi calculada pelo teste-t de Student. O nível de probabilidade inferior a 0,05 (*P*) foi considerado como o limite de significância estatística.
- o teste do χ^2 foi utilizado para avaliar uma possível associação entre a expressão do c-Kit e os parâmetros clínico-patológicos dos 55 casos de patologia mamária. Neste teste foi adoptado um intervalo de 95% de confiança e os resultados foram considerados estatisticamente significativos para valores de *P* inferior a 0,05.

A informação colhida e registada foi processada segundo as normas éticas em vigor no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de São João.

6. RESULTADOS

DADOS CLÍNICO-PATOLÓGICOS

A média etária das doentes às quais correspondiam os referidos 55 casos foi na patologia benigna de 40,5 anos (intervalo 28-70 anos), nos tumores filóides malignos de 49,3 anos (intervalo 36-62 anos), no CDIS de 57,7 anos (intervalo 28-77 anos), no CDISOE de 58,9 anos (intervalo 42-74 anos) e no CDIO de 60,1 anos (intervalo 41-85 anos). A média etária global das doentes foi de 54,3 anos (intervalo 28-85 anos).

Nos 30 casos de carcinoma mamário estudados, a gradação nuclear e de diferenciação (respectivamente para o carcinoma *in situ* e para o carcinoma invasor) encontrou-se assim distribuída:

- CDIS: 80% [8/10] de alto grau nuclear; 20% [2/10] de grau nuclear intermédio e 0% [0/10] de baixo grau nuclear.
- CDISOE: 20% [2/10] de grau I de diferenciação, 30% [3/10] de grau II de diferenciação, 50% [5/10] de grau III de diferenciação.
- CDIO: 40% [4/10] de grau I de diferenciação, 20% [2/10] de grau II de diferenciação, 40% [4/10] de grau II de diferenciação.

Em média, o índice prognóstico de Nottingham (IPN) nos carcinoma invasores estudados foi no CDISOE de 5,3 e no CDIO de 3,9. Globalmente, o IPN foi de 4,6.

EXPRESSÃO DO C-KIT

Em 48 dos 55 casos estudados observam-se mastócitos no tecido mamário como controlo interno positivo (Figura 15). Desses 48 casos, em 66% (32/48) observa-se epitélio mamário normal adjacente à lesão (Anexo 1).

Na tabela 5 podemos demonstrar que 17 dos 55 casos estudados (31%) demonstraram positividade "para" c-Kit, sendo 14 de 20 lesões benignas (70%) e 3 de 35 lesões malignas (8,6%). No Anexo 1 encontram-se pormenorizados todos os casos estudados.

Tabela 5: Resultados globais da imunorreactividade epitelial "para" c-Kit das 20 lesões benignas e 35 lesões malignas estudadas

Lesão	Número de casos	Positividade "para" c-Kit	Negatividade "para" c-Kit
Patologia benigna	20	70%	30%
Patologia maligna	35	8,6%	91,4%
TOTAL	55	31%	69%

Em relação à gradação da imunorreactividade "para" o c-Kit e sua localização, observámos que nos tumores filóides a marcação era essencialmente estromal, com maior imunorreactividade nos casos malignos. Nas demais patologias verificamos que a marcação era epitelial com predomínio nas lesões benignas (exceptuando-se os casos de tumores filóides (Tabela 6).

Tabela 6: Resultados globais da imunoreactividade "para" c-Kit das 55 lesões mamárias segundo a localização epitelial ou estromal da marcação

Lesão	Imunoreactividade epitelial do c-Kit	Imunoreactividade estromal do c-Kit	Positividade "para" c-Kit	Negatividade "para" c-Kit
Benigno	2,3±0,7	0,7±0,3	80%	20%
Tumor filóide benigno	2,1±0,9	1,1±0,9	40%	60%
Tumor filóide maligno	0,4±0,6	2,6±0,4	100%	0%
CDIS	0,6±0,4	0	20%	80%
CDISOE	0,4±0,3	0	10%	90%
CDIO	0,5±0,5	0,1±0,1	0%	100%

Tecido mamário normal

No que respeita aos 55 casos cuja imunoreactividade para o c-Kit foi estudada, 7 (12%) não apresentavam tecido mamário normal e 48 (88%) tinham representação de parênquima mamário sem alterações histológicas (Figura 16). Desses 48 casos, 29 (60%) apresentavam positividade nas células epiteliais "para" o c-Kit, 16 (34%) eram negativos. No que se refere à positividade "para" o c-Kit no estroma do tecido mamário normal, nenhum dos 48 casos observados apresentou imunolocalização estromal. Em termos comparativos, no que importa às diferenças de imunoreactividade epitelial do tecido mamário normal adjacente às diferentes patologias estudadas: na patologia benigna essa imunoreactividade foi positiva em 60% dos casos e negativa em 40% dos casos; nos tumores filóides malignos de baixo grau houve positividade em 25% dos casos e negatividade em 75% dos casos; no CDIS a imunoreactividade foi positiva em 100% dos casos; no CDISOE houve positividade em 55% dos casos e negatividade em 45% dos casos; no CDIO essa percentagem foi, respectivamente, de 40% de casos positivos e 60% de casos negativos.

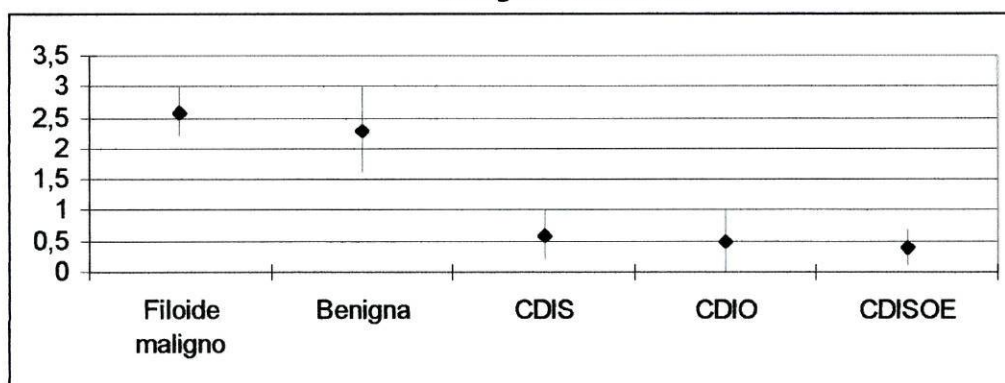
Patologia benigna

O estudo imuno-histoquímico das lesões mamárias benignas permitiu detectar uma gradação global da imunoreactividade estromal do c-Kit de 2,3±0,7 (Tabela 7 e Figura 9). Excluindo os tumores filóides, 80% dos casos (8/10) evidenciaram positividade "para" o c-Kit, nos quais se incluíam todos os 5 casos de adenose/tumor adenósico (Figura 17). Foi, de igual forma, neste último tipo de patologia benigna que se observou uma ausência completa de imunoreactividade para o c-Kit nas células estromais. Dos 20 casos de patologia benigna estudados em três tumores filóides observámos positividade "para" o c-Kit no estroma subepitelial.

Tabela 7: ESTUDO COMPARATIVO ENTRE IMUNORREACTIVIDADE (EPITELIAL E/OU ESTROMAL) DO C-KIT EM LESÕES BENIGNAS E MALIGNAS DE MAMA

Patologia Mamária	Número de casos	Gradação da imunoreactividade do c-Kit (média ± desvio-padrão)
Benigna	20	2,3+0,7*
Filóide maligno	5	2,6+0,4*
CDIS	10	0,6+0,4*
CDISOE	10	0,4+0,3*
CDIO	10	0,5+0,5*

*P = 0,01

Figura 9: Imunoreactividade epitelial e estromal do c-Kit em lesões benignas e malignas de mama

Tumores filóides

No que respeita aos 15 casos de tumores filóides estudados, 10 (66% dos casos) haviam sido previamente diagnosticados como benignos e 5 (34% dos casos) como malignos de baixo grau (Figura 18). Nenhum dos 15 casos foi classificado como maligno de alto grau. Em todos os filóides malignos de baixo grau o padrão de crescimento foi, pelo menos, focalmente infiltrativo, a celularidade estromal foi em todos de moderada a elevada, o número médio de mitoses observadas nas células estromais foi de 7/10 c.g.a. e, por último, o número médio de mitoses evidenciadas nas células epiteliais foi de 3/10 c.g.a (Tabela 8).

Tabela 8: Classificação histológica dos tumores filóides e expressão de c-Kit

CASO	TIPO	PC	CS	MS	ME	C-KIT	LOCAL
11	B	0	0	0	0	3+	N+C
12	B	0	1	0	0	3+	N+C (S)
13	B	0	0	1	0	3+	N+C
14	B	0	0	0	0	0	
15	B	0	1	0	0	0	
16	B	0	0	0	0	0	
17	MBG	1	1	2	1	3+	N+C (S)
18	B	0	0	0	0	2+	N
19	MBG	2	1	1	0	2+	N
20	MBG	1	2	1	1	3+	N (S)
21	B	0	0	0	0	0	
22	B	0	0	0	0	0	
23	B	0	0	0	0	0	
24	MBG	1	1	1	0	3+	N
25	MBG	1	1	2	1	2+	N (S)

LEGENDA: S- subepitelial

Tipo histológico: benigno (B) Padrão de crescimento: expansivo (0)
(TIPO) maligno baixo grau (MBG) (PC) infiltrativo focal (1)
infiltrativo (2)

Celularidade estromal: moderada (0) Mitoses estromais: 0 mitoses/10 c.g.a (0)
(CS) elevada (1) (MS) 0-5 mitoses/10 c.g.a (1)
muito elevada (2) 5-10 mitoses/10 c.g.a (2)
>10 mitoses/10 c.g.a (3)

Mitoses epiteliais: 0 mitoses/10 c.g.a (0) Gradação da imunoreactividade do c-Kit):
(ME) 0-5 mitoses/10 c.g.a (1) 0% células tumorais com marcação (0)
5-10 mitoses/10 c.g.a (2) <25% células tumorais com marcação (1+)
>10 mitoses/10 c.g.a (3) 25-50% células tumorais com marcação (2+)
>50% células tumorais com marcação (3+)

Relativamente aos 15 casos de tumores filóides estudados, demonstrámos uma positividade "para" o c-kit em 60% dos casos (9/15). Dos 9 casos positivos "para" o c-Kit 55% (5/9) eram tumores filóides malignos de baixo grau e 45% (4/9) eram tumores filóides benignos. Dos 6 casos negativos "para" o c-Kit todos eles correspondiam a tumores filóides benignos (Figuras 19 e 20). Um outro dado a acrescentar consistiu no facto de 60% (3/5) dos 5 casos de tumores filóides malignos de baixo grau apresentarem uma positividade forte "para" o c-Kit de localização preferencialmente subepitelial (Tabela 9) (Figuras 21,22,23 e 24).

Tabela 9: ESTUDO COMPARATIVO DE IMUNORREACTIVIDADE ESTROMAL DO C-Kit ENTRE TUMORES FILÓIDES BENIGNOS E MALIGNOS DE MAMA

Patologia Mamária	Número de casos	Gradação da imunoreactividade do c-Kit (média ± desvio-padrão)
Tumor filóide benigno	10	1,1±0,9*
Tumor filóide maligno baixo grau	5	2,6±0,4*
Tumor filóide (geral)	15	1,6±0,6*

• $P = 0,01$

Patologia maligna

No que se refere à patologia mamária maligna observa-se que, no caso de exceptuarmos os 5 casos de tumores filóides malignos de baixo grau, na restante patologia maligna de mama só em um caso (1/35) se evidencia imunoreactividade "para" as células estromais (posta em evidência no único caso de carcinoma metaplásico mamário do presente estudo).

Um segundo resultado obtido relativamente aos casos de patologia maligna estudados refere-se ao CDIS, no qual em 20% dos casos se observa positividade "para" o c-Kit (Figura 25). Em CDISOE em 10% (1/10) dos casos há evidência de positividade "para" o c-Kit (Figura 26). Pelo contrário, em nenhum dos casos de CDIO estudados se encontrou evidência de imunoreactividade "para" o c-Kit. Outro resultado obtido neste estudo consistiu na observação de que no CDIS há perda contínua de expressão do c-kit quando transitamos do grau nuclear intermédio (imunoreactividade média de 1,0±0,8) para o alto grau nuclear (imunoreactividade média de 0,3±0,7). A Tabela 10 e a Figura 10 mostram que tanto no CDIS como no CDISOE há um contínuo de perda de expressão do c-Kit, pois observamos que no CDIS puro a imunoreactividade média é de 0,6±0,4, no

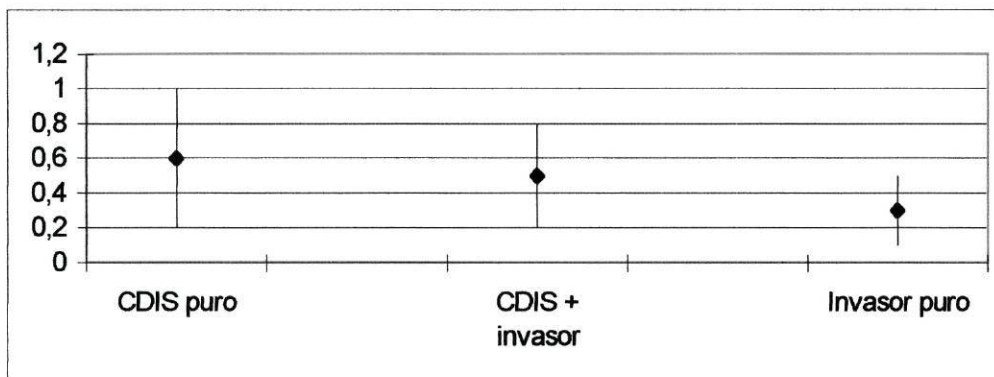
CDIS com componente invasor a imunorreactividade média é de $0,5 \pm 0,3$ e no carcinoma invasor puro essa média corresponde a $0,3 \pm 0,2$.

Tabela 10: ESTUDO COMPARATIVO DE IMUNORREACTIVIDADE EPITELIAL DO C-KIT ENTRE LESÕES MALIGNAS DE MAMA (exceptuando tumores filóides malignos)

Patologia Mamária	Número de casos	Gradação da imunorreactividade do c-Kit (média \pm desvio-padrão)
CDIS puro	10	$0,6 \pm 0,4^*$
CDIS + invasor	9	$0,5 \pm 0,3^*$
Invasor puro	11	$0,3 \pm 0,2^*$

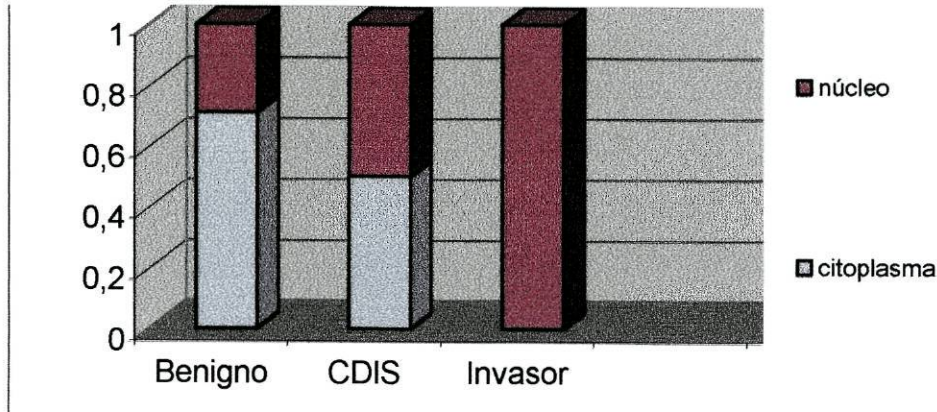
• $P = 0,01$

Figura 10: Imunorreactividade epitelial do c-Kit em lesões malignas de mama



Imunolocalização celular de c-Kit

Outro dado obtido consiste na diferença de localização celular da expressão dos casos positivos "para" o c-Kit (Figura 11). Em termos globais, 64% dos 17 casos positivos para c-Kit apresentavam imunorreactividade predominantemente citoplasmática, enquanto que em 36% desses casos a imunorreactividade foi predominantemente nuclear. De modo particular, na patologia benigna, em 14 casos com imunorreactividade "para" o c-Kit 10 (71% dos casos) apresentavam localização predominantemente citoplasmática e 4 (29% dos casos) evidenciavam localização predominantemente nuclear. Já no CDIS observaram-se 50% (1/2) de casos citoplasmáticos e 50% (1/2) de casos nucleares; enquanto que no carcinoma invasor o único caso positivo "para" c-Kit apresentava imunolocalização nuclear. Não se observou marcação membranar "para" o c-Kit em nenhum dos 55 casos estudados do ponto de vista imuno-histoquímico.

Figura 11: Imunolocalização celular de c-Kit

Correlação da expressão de c-Kit e parâmetros clínico-patológicos

Posteriormente, e recorrendo ao teste do χ^2 , avaliou-se uma possível associação entre a expressão do c-kit e os parâmetros clínico-patológicos dos 20 casos de carcinoma invasor mamário. Há parâmetros que funcionam como factores de agressividade tumoral (caso do tamanho tumoral, do grau de diferenciação, da expressão de receptores de estrogénio ou do subtipo histológico) e outros que funcionam como índices relacionados com a capacidade de metastização (caso da invasão ganglionar). Nos 10 casos de CDSOE e nos 10 casos de CDIO estudados e correlacionados do ponto de vista clínico-patológico não se observou associação estatisticamente significativa entre a expressão imuno-histoquímica do c-Kit e os parâmetros clínico-patológicos estudados. Em particular, não se observou associação entre a expressão de c-Kit e a expressão de c-erb-B2 (subunidade de receptor de factor de crescimento), o grau de diferenciação e o "status" hormonal. De igual modo, não foi possível estabelecer uma correlação entre a expressão epitelial de c-Kit e o IPN do carcinoma invasor (Tabela 11).

Tabela 11: Correlação entre a expressão de c-Kit e os parâmetros clínico-patológicos do carcinoma invasor mamário

Parâmetros	Número de casos	GIRE (média)	P-value
Estatuto menopáusico			
• Pré-menopáusico (< 50 anos)	4	1,3 ± 0,3	NS
• Pós-menopáusico (≥ 50 anos)	16	0,4 ± 0,4	NS
RE			
• (-)	10	1,1 ± 0,4	NS
• (+)	10	0,5 ± 0,5	NS
c-erb B2			
• (-)	14	0,6 ± 0,2	NS
• (+)	6	0,2 ± 0,1	NS
Imagiologia			
• sem calcificações	11	0,2 ± 0,2	NS
• com calcificações	9	0,3 ± 0,3	NS
Subtipo histológico			
• CDISOE	10	1,1 ± 0,4	NS
• CDIO	10	0,5 ± 0,4	NS
Grau de diferenciação			
• I	6	0,3 ± 0,2	NS
• II	5	1,0 ± 0,8	NS
• III	9	1,0 ± 0,7	NS
Tamanho tumoral			
• T1	8	0,9 ± 0,1	NS
• T2	9	0,7 ± 0,2	NS
• T3	0	0,0 ± 0,0	NS
• T4	1	1,0 ± 1,0	NS
Invasão ganglionar			
• (-)	11	0,6 ± 0,4	NS
• (+)	9	1,1 ± 0,9	NS
Invasão venosa e/ou linfática			
• (-)	10	0,7 ± 0,3	NS
• (+)	10	0,9 ± 1,1	NS
IPN (Índice prognóstico de Nottingham)			
• < 3,4 (bom prognóstico)	4	0,9 ± 0,2	NS
• 3,4 – 5,4 (prognóstico intermédio)	9	0,6 ± 0,4	NS
• > 5,4 (mau prognóstico)	5	1,1 ± 0,5	NS

NS – sem significância estatística

Fotografias de casos seleccionados

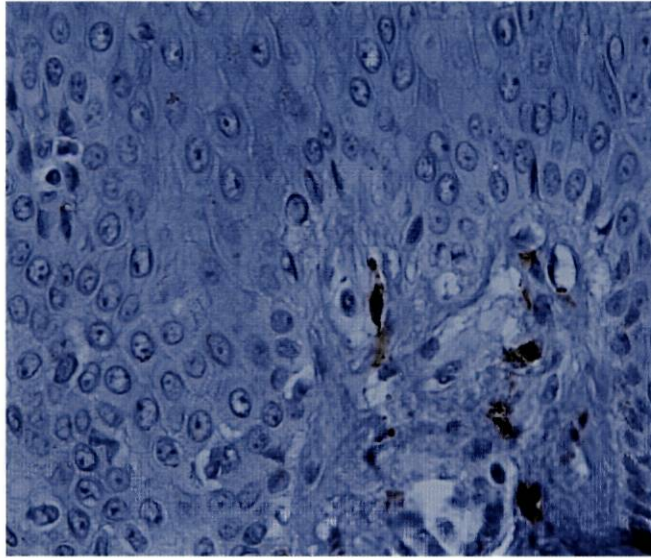


Figura 15. Mastócitos do mamilo - controlo interno (400x)

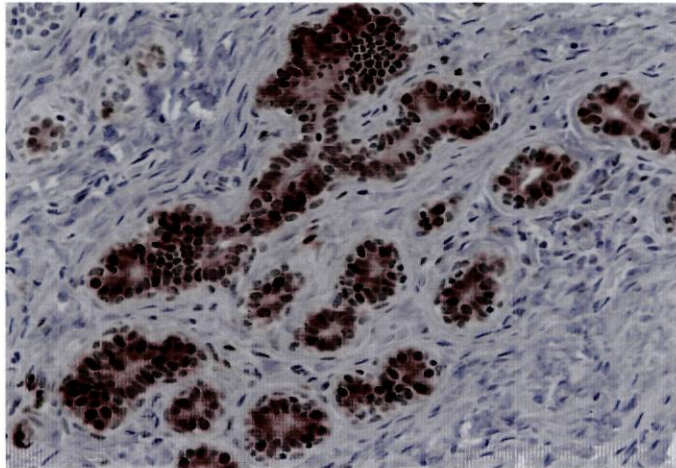


Figura 16. Epitélio mamário normal (400x)

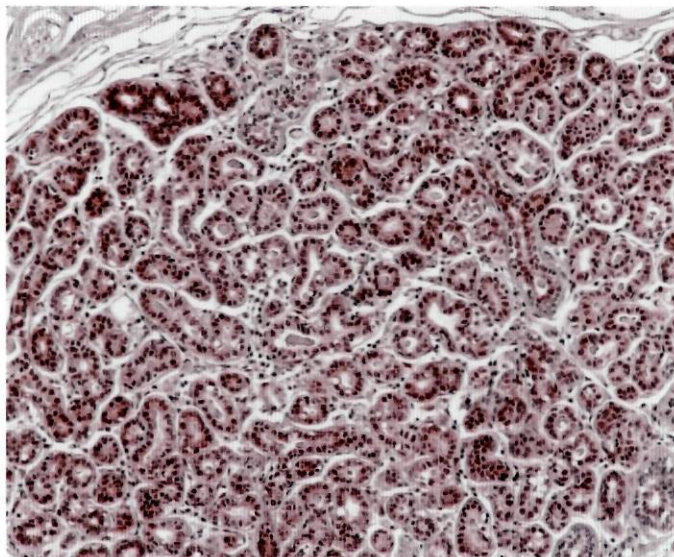


Figura 17. Adenose (200x)

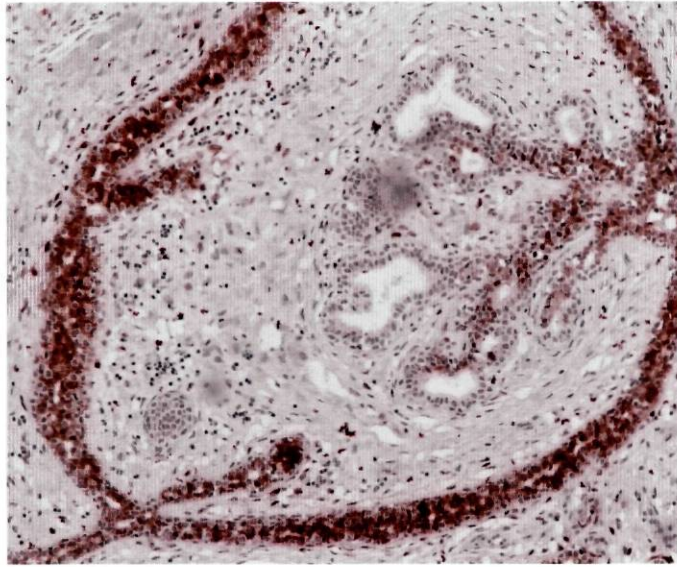


Figura 18. TF benigno com marcação epitelial predominante (200x)

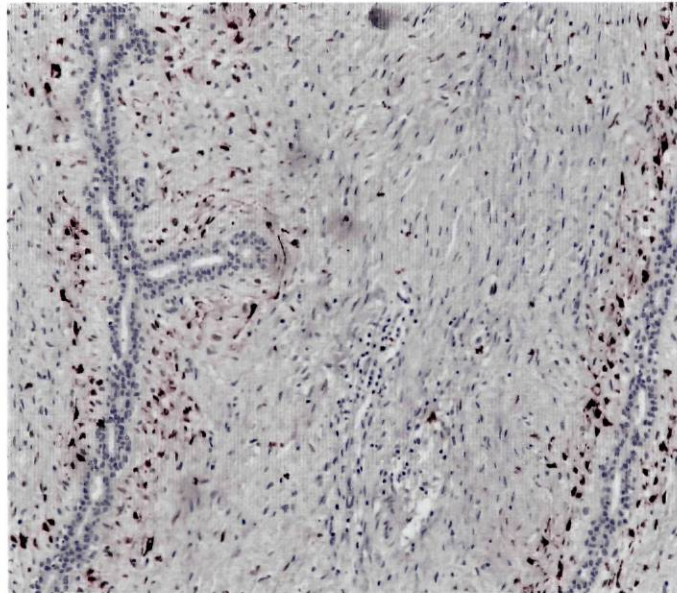


Figura 19. TF benigno com marcação subepitelial (200x)

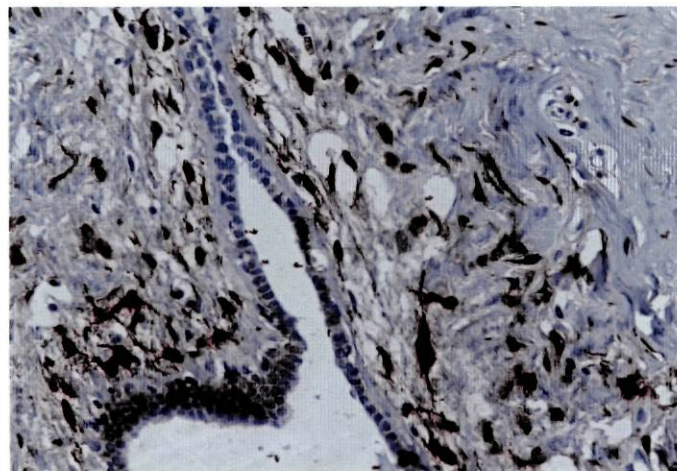


Figura 20. TF benigno com marcação subepitelial (400x)



Figura 21. Tumor filóide maligno de baixo grau (200x)

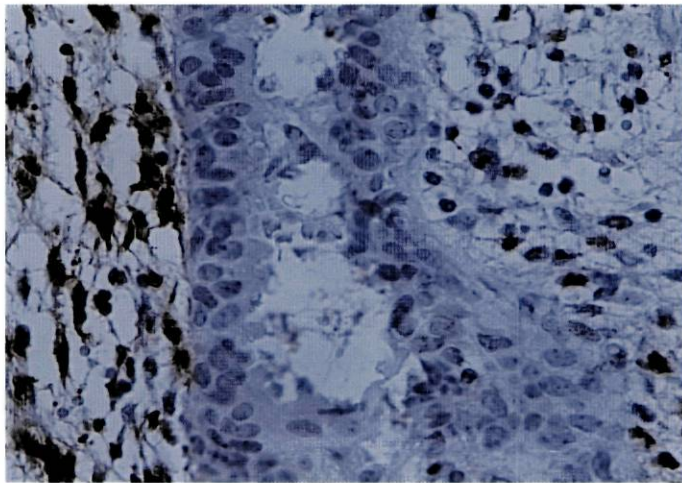


Figura 22. Tumor filóide maligno de baixo grau (400x)

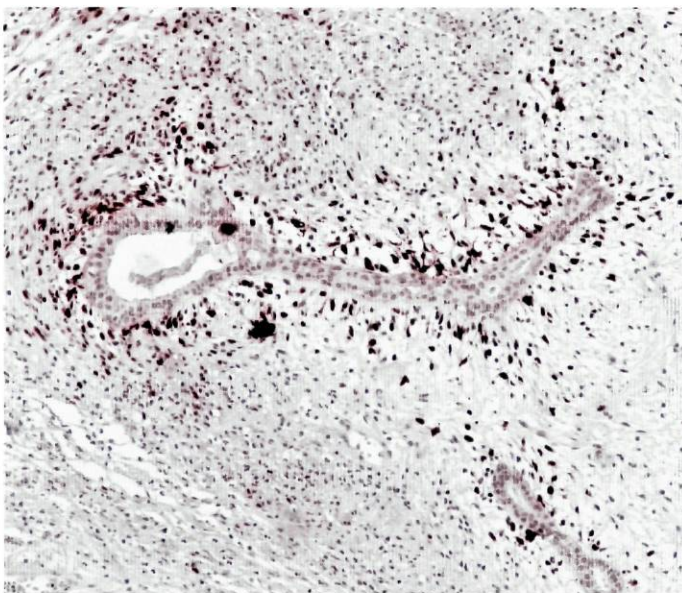


Figura 23. TF maligno bx grau com marcação subepitelial (200x)

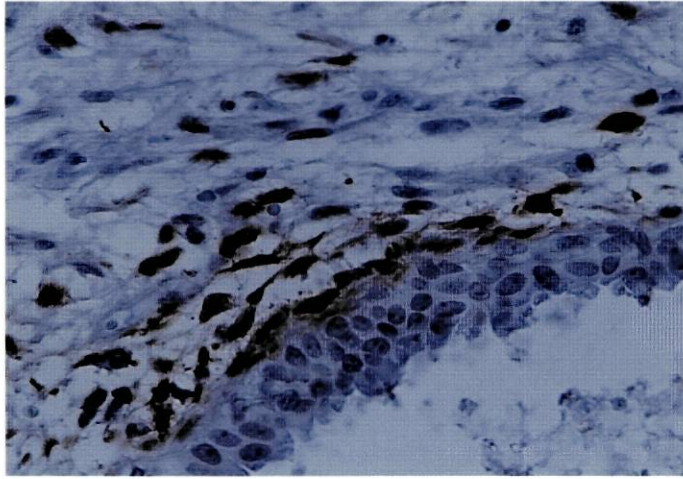


Figura 24. TF maligno bx grau com marcação subepitelial (400x)

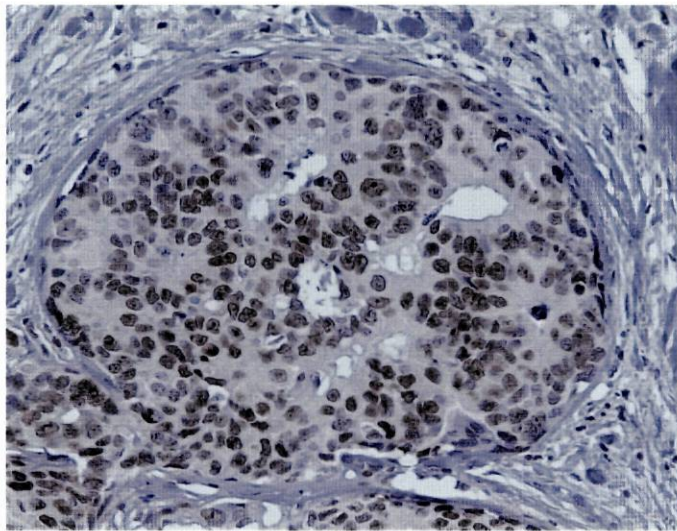


Figura 25. CDIS de alto grau nuclear (400x)

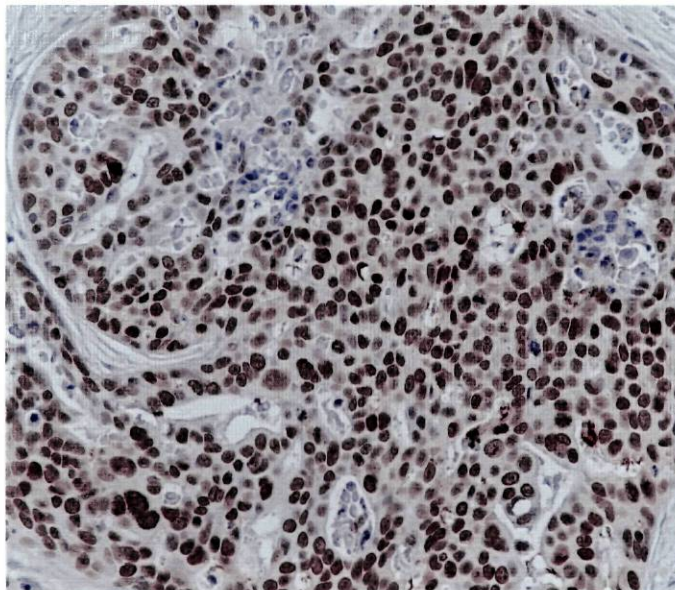


Figura 26. CDISOE (400x)

7. DISCUSSÃO

A perda de expressão do c-Kit observada para o carcinoma mamário neste trabalho (a corroborar resultados publicados anteriormente ^{158,159,167,168}) é comparável à perda de expressão de c-Kit no carcinoma tireoideu observada em 1995 por Natali *et al.* De acordo com esse estudo, o SCF não é mitogénico, *per se* ou em conjugação com a TSH, em culturas primárias de tirócitos, o que indica que na carcinogénese tireoideia a interacção SCF – c-Kit poderá controlar a diferenciação do tirócito e não a sua divisão celular. Este facto explicaria a perda de expressão de c-kit na transformação neoplásica do epitélio da glândula tireóide e pode ajudar na compreensão dos resultados obtidos no presente trabalho. Tal deve-se ao facto de a patologia molecular do cancro de mama, também no que respeita à expressão do c-Kit, se enquadrar num conceito-chave da Biologia Molecular ⁸:

- de acordo com este conceito, um mesmo RTK pode, em diferentes células, desencadear respostas biológicas contrárias, o que explica que as tirosina cínases *fms* ou *src* controlem a mitogénese ou a diferenciação, dependendo do tipo de célula em que se expressam. ^{169,170} Dito de outra forma, segundo uma perspectiva que mais interessa ao presente estudo, tal explicaria o facto de o c-Kit poder controlar a divisão celular no seminoma, na mastocitose, no GIST, no glioma ou no carcinoma pulmonar de pequenas células (nos quais se observa um aumento da expressão do c-Kit ^{56,109,171,172}), e, pelo contrário, no carcinoma mamário (no qual se constata uma diminuição dessa expressão de c-Kit) poder controlar não a divisão celular mas sim, eventualmente, a diferenciação celular.

No tecido mamário normal a activação do c-Kit pode efectuar-se através de uma de duas formas:

1. por ligação ao SCF (que funciona como um factor de crescimento)
2. na ausência do seu ligando (SCF), por degradação da SHP-1, tirosina-fosfatase que regula negativamente a sinalização do c-Kit. ^{40,41}

Daqui resulta que, no carcinoma mamário, a diminuição da expressão do c-Kit poderá atribuir-se a um de dois mecanismos:

1. deleção, por mutação, do c-Kit ou do seu ligando SCF;
2. inibição do c-Kit, por sobreexpressão de tirosinas-fosfatases como a SHP-1. ⁴²

Apesar de ser possível considerar que, nalguns casos de carcinoma mamário agora estudados, a ausência de imunorreactividade do c-Kit possa ter sido devida à presença de proteína resultante de c-Kit mutado não detectada pelo anticorpo monoclonal utilizado, a diminuição da expressão do c-Kit no carcinoma mamário pode indicar que durante a transformação maligna do epitélio mamário outros factores de crescimento concorrem para a diminuição de expressão do c-Kit.

Ainda se encontra por esclarecer de que modo a interacção do c-Kit com RTK para outros factores de crescimento influencia o grau e tipo de resposta ao SCF. As recentes aproximações feitas em relação a esta questão apontam para uma sinergia do binómio SCF – c-Kit especificamente com os factores de crescimento IL-1, IL-3, IL-4 e IL-7 e, ainda mais recentemente, com o factor de crescimento derivado das células estromais mamárias de tipo 1-alfa (SDF-1 α), uma α -quimiocina liganda do CXCR4 que é, ele próprio, um potente agente de quimiotaxia de células progenitoras. ^{32,173} Partindo da premissa de que 60-70% dos cancros de mama apresentam sobreexpressão do receptor de estrogénio (RE), descobriu-se em 2002 que o SDF-1 α é um mediador do efeito mitogénico do estradiol no carcinoma mamário e que o CXCR4 é um importante regulador de migração e metastização nos cancros de mama e ovário. ¹⁷⁴ Uma abordagem promissora no tratamento do carcinoma mamário consistiria no desenvolvimento de um inibidor do CXCR4 (receptor do SDF-1 α). Já a outra citocina cuja interacção com o SCF – c-Kit mais vem sendo estudada, a IL-4 (produzida nos linfócitos e nos mastócitos do

tecido mamário), julga-se que possa inibir a proliferação estrogénio-dependente do carcinoma de mama.¹⁷⁵ Será que a interacção destas duas citocinas com o binómio SCF – c-Kit poderia no cancro mamário, por diminuição da expressão da IL-4 conjugada com um aumento da expressão do SDF-1 α , conduzir à perda de expressão de c-Kit evidenciada neste tipo de neoplasia? Coloca-se, de momento, esta hipótese que carece de fundamentação por um estudo a efectuar posteriormente.

Em 1996, Nishida *et al.* demonstraram supressão do crescimento da linha celular MCF-7 após introdução de c-kit no meio de cultura, o que estava de acordo com a ausência de expressão desta proteína nos carcinomas mamários, conforme observámos neste estudo.¹⁷⁶ Entretanto, outros estudos têm demonstrado, contrariamente ao observado *in vivo*, aumento da expressão do c-Kit em linhas celulares mamárias neoplásicas. Um desses estudos *in vitro* demonstrou, de igual forma, a necessidade de estradiol e/ou de IGF-1 (factor de crescimento da família do EGF) para o crescimento de certas linhas celulares de carcinoma mamário.¹⁷⁷ Neste estudo, linhas celulares de MCF-7 (que expressa naturalmente SCF) transfectadas com um vector de expressão de c-Kit, na presença de IGF-1, não precisaram da activação do c-Kit pelo SCF para o seu crescimento. Daqui resulta que, não havendo ligação do SCF ao c-Kit, aumentam os níveis da forma livre (não-ligada ao SCF) de c-Kit, o que traduz um aumento da expressão de c-Kit. Num ambiente pobre em factores de crescimento, e, nomeadamente, desprovido de IGF-1, linhas celulares de carcinoma de mama ZR75-1 (que coexpressa naturalmente SCF e c-Kit) precisam da activação do c-Kit pelo SCF para a sua proliferação. Daqui resulta que, através da ligação do SCF ao c-Kit, diminuem os níveis da forma livre de c-Kit, o que traduz uma diminuição da expressão de c-Kit. *In vitro* a presença simultânea de SCF, de c-Kit e de estrogénio é indispensável para o crescimento do carcinoma mamário, como comprovado pelo efeito descrito para o anticorpo anti-c-Kit. Este anticorpo inibe o crescimento do cancro de mama pois, na presença de SCF e estrogénio, mesmo que o estrogénio active o SCF, este último deixa de poder ligar-se ao c-Kit, seu receptor. Este anticorpo monoclonal contra o SCF ao ligar-se ao SCF, impede a ligação deste ao c-Kit e, de seguida, a formação da ansa autócrina SCF- c-Kit, evitando, assim, a activação das vias da MAP cínase e da PI3 cínase e, finalmente, impedindo a activação (por amplificação e sobreexpressão) da família de ligandos dos EGFR. Assim sendo, para a proliferação de uma linha celular MCF-7 torna-se necessária a interacção em simultâneo de três mediadores: o SCF, interagindo com o c-Kit, e, ainda, o estrogénio (usualmente do subtipo estradiol). Para uma melhor compreensão dessa interacção será necessário aprofundar o conhecimento actual da regulação do *splicing* alternativo do SCF e da proteólise do SCF solúvel/ SCF ligado à membrana.^{85,90}

Outro resultado obtido neste estudo consistiu na observação de que no CDIS há perda de expressão do c-kit quando transitamos do grau nuclear intermédio para o alto grau nuclear, tal como evidenciado em estudos prévios para outros oncogenes.^{178,179,180,181,182,183,184,185} Quer no CDIS puro, quer no CDIS com componente invasor, quer no carcinoma invasor puro há um contínuo de perda de expressão do c-Kit, pois observamos que no CDIS puro a imunoreactividade epitelial é de $0,6 \pm 0,4$, no CDIS com componente invasor associado é de $0,5 \pm 0,3$ e, finalmente, no carcinoma invasor puro é de $0,3 \pm 0,2$.

No nosso estudo dos CDISOE com CDIS concomitante observou-se (contrariamente ao observado para o CDIO sem CDIS) uma elevada concordância na expressão de c-Kit no componente *in situ* (imunoreactividade epitelial de $0,5 \pm 0,3$) e no componente invasor deste tipo de neoplasia mamária (imunoreactividade epitelial de $0,5 \pm 0,3$). Estes resultados permitem afirmar que, com probabilidade, não se observa conversão de cancros mamários c-Kit positivos em cancros mamários c-Kit negativos quando estas neoplasias se tornam invasoras. Já no que respeita ao estudo comparativo entre os CDIS puros, os CDIS com componente invasor e os

carcinomas invasores, verifica-se, à semelhança do previamente observado por Schmitt *et al* para o c-erbB2, uma perda contínua de expressão de c-Kit quando “transitamos” do carcinoma intraductal para o carcinoma invasor. Tal poderá significar que:

1. uma proporção dos carcinomas mamários invasores estudados pelo nosso grupo evoluem sem passagem por uma fase intraductal ou, em alternativa, não se relacionam com alterações da expressão génica no *locus* do c-Kit;
2. alguns dos carcinomas mamários intraductais do presente estudo representam, com probabilidade, um estadio final de evolução da carcinogénese mamária, sem que se verifique, posteriormente, a aquisição de propriedades invasoras.

No presente trabalho foi notória a perda de expressão de c-Kit quando transitámos do estudo imuno-histoquímico dos 10 casos de CDIS para o padrão de expressão evidenciado para o referido RTK pelos 20 casos de carcinoma invasor estudados. Este mesmo diferencial de comportamento entre o CDIS e o carcinoma invasor havia já sido posto experimentalmente em evidência por Sternlicht *et al.* que, na altura, explicara tal resultado baseando-se, igualmente, num mecanismo de acção parácrino, atribuído no CDIS à retenção ocasional de células mioepiteliais (facto nunca observado para o carcinoma invasor). Os estudos conduzidos por este grupo sugerem que, nesta circunstância, as escassas células mioepiteliais remanescentes apresentam um efeito supressor tumoral parácrino sobre as próprias células do carcinoma intraductal, inibindo, deste modo, a invasão do estroma mamário. Este efeito oncossupressor das células mioepiteliais parece, assim, centrar-se na sua capacidade de elaborar inibidores proteásicos que, deste modo, contrariam a invasibilidade das metaloproteinases (enzimas produzidas pelas referidas células do carcinoma intraductal). Também este último facto permite explicar, em primeiro lugar, a perda de expressão evidenciada neste estudo quando transitamos do CDIS puro para o CDIS com componente invasor e, ainda, quando transitamos deste último para o carcinoma invasor puro. Por último, tal permite, igualmente, explicar no estudo conduzido pelo nosso grupo a ausência de diferença de comportamento (estatisticamente significativa) entre a perda de expressão de c-Kit observada no CDIO e a perda de expressão deste mesmo RTK denotada no CDISOE, uma vez que ambas as neoplasias, apesar de distintamente subclassificadas do ponto de vista histológico, apresentam um comportamento invasor semelhante.

No que se refere à localização da imunorreactividade do c-Kit esta foi, predominantemente, citoplasmática, em detrimento da localização nuclear ou membranar. A imunorreactividade citoplasmática predominante do c-Kit observada na generalidade dos casos estudados fica, com probabilidade, a dever-se a excesso de internalização da proteína KIT ou, em alternativa, a síntese anómala da proteína KIT que, impedida de alcançar a sua localização transmembranar, sofre acumulação no citoplasma.

No nosso estudo foi igualmente observada imunorreactividade nuclear para o c-Kit numa minoria dos casos estudados. Num estudo anterior que procurava avaliar a expressão de c-Kit no mesotelioma maligno apesar de os 37 casos estudados demonstrarem por imuno-histoquímica positividade para o c-Kit em localização exclusivamente nuclear, o estudo por RT-PCR desses casos não permitiu detectar RNAm do c-Kit. Como tal, concluiu-se que a imunorreactividade nuclear para c-Kit no mesotelioma maligno não corresponde a expressão do gene c-Kit e, pelo contrário, representa, com probabilidade, reacção cruzada do anticorpo utilizado contra determinadas proteínas nucleares. Um outro estudo recentemente efectuado demonstrou expressão nuclear de c-Kit em 25% dos casos de GIST estudados, dos quais 60% evidenciaram igualmente expressão de NSE (enolase específica de neurónio). Estes dados, acrescidos da previamente descrita imunolocalização nuclear de c-Kit em células normais de medula de supra-renal, sugerem que a expressão nuclear de c-Kit nos GIST é consistente com uma diferenciação neural.

Não sendo de admitir este tipo de diferenciação nos 18 casos de patologia mamária estudados com imunolocalização nuclear de c-Kit, resta-nos considerar a possibilidade de estarmos perante uma reacção cruzada do anticorpo anti-c-Kit IgG utilizado contra determinadas proteínas nucleares.

No que se refere a um outra possível correlação estudada, não se observou no presente trabalho pelo teste do χ^2 uma associação estatisticamente significativa entre a expressão imuno-histoquímica do c-Kit e os parâmetros clínico-patológicos estudados. Estes encontram-se já devidamente estabelecidos como factores de prognóstico de carcinoma mamário em diversos estudos.^{186,187,188,189,190} Em particular, não se observou associação entre a expressão do c-Kit com a expressão de c-erb-B2 (subunidade de receptor de factor de crescimento), o grau de diferenciação e o "status" hormonal, tal como descrito em dois estudos anteriormente efectuados.^{191,192} Também não houve correlação entre a expressão de c-Kit e o IPN dos carcinomas invasores. Num outro estudo recentemente publicado que investigava a expressão do c-kit e do c-erb-B2 em cancros da mama com mau prognóstico não foi possível correlacionar a expressão do c-Kit com a expressão de c-erb-B2, o grau de diferenciação, o "status" hormonal, a expressão de bcl-2 ou de p53 (marcadores histopatológicos de apoptose) ou a expressão de Ki-67 (MIB-1) (marcador histopatológico de proliferação celular).¹⁹³

No presente estudo não foram incluídos casos de patologia mamária em mama masculina por forma a confirmar ou infirmar os dados descritos na literatura que apontam para uma conservação da expressão de c-Kit na malignização da mama masculina, (contrariamente à perda de expressão de c-Kit verificada na mama feminina) como concluído, quer por imuno-histoquímica (IH), quer por hibridização *in situ* cromogénica (CISH).¹⁹⁴ De um modo geral, a expressão de c-Kit em neoplasias de mama masculina acompanha-se, quase sempre, por positividade para a fosfotirosina no tecido mamário, o que sugere uma possível fosforilação dos resíduos de tirosina deste RTK.

Relativamente aos 15 casos de tumores filóides (TF) estudados, demonstrámos uma positividade "para" o c-Kit numa maioria dos casos observados, positividade essa observada, sobretudo, em TF malignos de baixo grau e, em menor número, em TF benignos. Dos 6 casos negativos "para" o c-Kit todos eles correspondiam a TF benignos. Um outro dado a acrescentar consistiu no facto de a maioria dos casos de TF malignos de baixo grau estudados que foram positivos no estroma apresentar uma positividade forte, em localização preferencialmente subepitelial. Este achado confirma os dados da literatura que apontam para a presença de um índice mitótico mais elevado (um dos três critérios de malignidade do tumor filóide) no estroma subepitelial (ou, dito de outra forma, periductal) comparativamente ao estroma intralobular.^{21,195} Os resultados do nosso estudo demonstram a associação da expressão do c-kit com o potencial maligno dos tumores filóides da mama. Os achados obtidos neste trabalho permitem, ainda, corroborar dados muito recentes obtidos por Sawyer *et al.* que apontam, nestes TF malignos, para uma sobreexpressão estromal de c-Kit e de c-myc.¹⁹⁶

Dado o facto de, apenas como exemplo, também os mastócitos localizados no parênquima mamário apresentarem uma positividade forte "para" o c-kit (razão pela qual são utilizados como controlo interno do estudo imuno-histoquímico com o c-Kit), torna-se necessário, por forma a eliminar este e outros *bias* da correlação da expressão do c-Kit nos TF com o seu potencial maligno, recorrer, através de técnicas de biologia molecular, ao estudo de mutações (do tipo deleções *in frame* e outras) do c-Kit em tumores filóides mamários.

Pelo que resulta da observação dos resultados do presente estudo pode, em relação à expressão de c-Kit em neoplasias malignas da mama, constatar-se:

- perda de expressão de c-Kit em neoplasias epiteliais malignas;

- aumento de expressão de c-Kit em neoplasias epitélio-mesenquimatosas malignas (nomeadamente, TF malignos de baixo grau).

Tal diferença no padrão de expressão de c-Kit em neoplasias malignas de mama poderá dever-se ao facto de nos TF malignos se verificarem possivelmente mutações activadoras da expressão do c-Kit, enquanto que no carcinoma mamário, com probabilidade, se observam mutações activadoras da expressão de inibidores do c-Kit (caso do SHP-1, tirosina-fosfatase que inibe a tradução do sinal do c-Kit). Se assim se vier a comprovar, o envolvimento do c-Kit na carcinogénese dos TF malignos será primário e, pelo contrário, o envolvimento do c-Kit na carcinogénese dos carcinomas mamários será secundário (dependendo, primeiro, da acção de factores de crescimento como o IGF-1, e, só numa segunda fase, da desregulação da junção epitélio-estromal induzida pelo c-Kit, acontecimento que promoveria a degradação da lâmina basal e conduziria, por fim, à invasão do estroma adjacente).

Esta diferença no padrão de expressão de c-Kit nas neoplasias epiteliais malignas e nas neoplasias epitélio-mesenquimatosas da mama pode ser corroborada pela observação do comportamento da 5-laminina, proteína de adesão célula-célula localizada na transição epitélio-mesenquimatoso (EMT) e com interligação molecular com a generalidade dos RTK (incluindo o c-Kit).¹⁹⁷ Esta glicoproteína apresenta por estudo imunohistoquímico, à semelhança do c-Kit, uma perda de expressão nos carcinomas mamários e um aumento de expressão nos TF malignos. Igualmente por IH, um outro trabalho detectou a presença de endotelina-1 (peptídeo vasoconstritor que estimula a síntese de DNA em células musculares lisas vasculares e em células estromais mamárias) no epitélio dos TF e a sua ausência nas células estromais.¹⁹⁸ Esta observação sugere que a endotelina-1 produzida pelo componente epitelial dos TF pode exercer uma acção parácrina no sentido de estimular a proliferação das células estromais.¹⁹⁹ Estudos morfológicos e histológicos posteriores apontam, de igual modo, para essa função parácrina do epitélio dos TF, tendo permitido evidenciar neste subtipo de tumores mesenquimatosos mamários um maior número de mitoses no estroma peri-epitelial (por comparação com o estroma localizado a maior distância do epitélio mamário).²¹

Embora no presente estudo não tenha sido possível estudar o comportamento das proteínas estromais nas neoplasias mamárias e a sua relação com a expressão de c-Kit, existe já há algum tempo uma clara evidência de que alterações das proteínas do estroma mamário podem acompanhar lesões proliferativas da mama e, nomeadamente, a transformação carcinomatosa do epitélio mamário.^{118,119,200} A tenascina, uma glicoproteína de matriz, é uma dessas proteínas, sendo produzida pelas células estromais sob duas isoformas : baixo (190 kDa) e alto (330 kDa) peso molecular. Esta última isoforma tem propriedades de anti-adesão, sendo o tipo predominantemente observado no estroma activado de alguns fibroadenomas, tumores filóides malignos e carcinomas invasores. A isoforma 190 kDa, pelo contrário, associa-se frequentemente à maioria das lesões benignas de mama e a hiperplasias atípicas. No mesmo sentido, Jones *et al.* descreveram uma relação inversa entre a expressão de integrina e de tenascina em carcinoma mamários, enquanto que o grupo de Kaczmarek *et al.* correlacionou determinadas isoformas oncofetais de fibronectina com a carcinogénese mamária.^{201,202}

Um outro dado que interessa particularmente na compreensão dos resultados obtidos no presente estudo consiste na descrição recente de expressão de receptor do PDGFB no estroma subepitelial do carcinoma mamário.²⁰³ Por imunohistoquímica observou-se no CDIS positividade ocasional do receptor do PDGFB nas células estromais subepiteliais em localização adjacente à membrana basal.²⁰⁴ Pelo contrário, nas regiões de CDISOE que apresentavam degradação da membrana basal observou-se uma positividade menos intensa das referidas células estromais. Os autores concluíram, nesse sentido, que a ausência de receptor de PDGFB nas

células de carcinoma e a sua presença no estroma adjacente sugere uma estimulação parácrina do tecido estromal induzida pelas células epiteliais malignas do cancro da mama. Tal como observado para o PDGRB (RTK de tipo III , à semelhança do c-Kit), a ausência de expressão de c-Kit verificada neste trabalho nas células de carcinoma e a sua expressão no estroma justaposto sugere, igualmente, uma estimulação parácrina desse estroma pelas células do cancro de mama.

8. CONCLUSÕES

Em face da discussão dos resultados obtidos no presente estudo, é possível delinear as seguintes conclusões:

1. A perda de expressão de c-Kit observada neste estudo nos casos de carcinoma mamário corrobora estudos anteriores e indica que, com probabilidade, durante a transformação maligna do epitélio mamário outros factores de crescimento concorrem para a diminuição de expressão do c-Kit; a ausência de imunorreactividade do c-Kit observada nos carcinomas estudados pode, com igual probabilidade, ter sido devida nalguns casos à presença de proteína resultante de c-Kit mutado não detectada pelo anticorpo monoclonal utilizado.

2. A perda contínua de expressão de c-Kit evidenciada neste trabalho quando "transitamos" do carcinoma intraductal para o carcinoma invasor poderá significar que uma proporção dos carcinomas mamários invasores estudados pelo nosso grupo evoluem sem passagem por uma fase intraductal ou, em alternativa, não se relacionam com alterações da expressão génica no *locus* do c-Kit. Outra possibilidade explicativa consiste em alguns dos carcinomas mamários intraductais do presente estudo representarem, com probabilidade, um estadio final de evolução da carcinogénese mamária, sem que se verifique, posteriormente, a aquisição de propriedades invasoras.

3. A imunorreactividade citoplasmática predominante do c-Kit observada na generalidade dos casos estudados fica, com probabilidade, a dever-se a excesso de internalização da proteína KIT ou, em alternativa, a síntese anómala da proteína KIT que, impedida de alcançar a sua localização transmembranar, sofre acumulação no citoplasma. A imunolocalização nuclear do c-Kit observada em alguns dos casos estudados poderá não corresponder a expressão do gene c-Kit mas, pelo contrário, representar, nalguns casos, reacção cruzada do anticorpo anti-c-Kit IgG utilizado contra determinadas proteínas nucleares.

4. O estudo efectuado não demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre a expressão imuno-histoquímica de c-Kit e os parâmetros clínico-patológicos estudados.

5. O aumento de expressão estromal de c-Kit observada neste estudo nos tumores filóides malignos de baixo grau, ao permitir uma associação da expressão do c-kit com o potencial maligno dos tumores filóides da mama, corrobora dados muito recentemente obtidos noutra estudo que apontam, nestas neoplasias, para uma sobreexpressão estromal de c-Kit.

No sentido de aprofundar a relação da expressão de c-Kit com a transformação maligna do tecido mamário neoplásico, colocam-se as seguintes perspectivas futuras de prossecução do presente estudo:

1. A descoberta de um análogo do SCF poderia impedir a ligação do SCF ao c-Kit, o que inviabilizaria a constituição da ansa autócrina SCF-c-Kit. Desta forma, a activação das vias da MAP cínase e da PI3 cínase seria impedida, o que, finalmente, impediria a activação da família de ligandos dos EGFR (que compreende o c-erb-B2 – EGFR do tipo 2).^{191,192,193} Uma primeira perspectiva de continuação do trabalho descrito consiste em:

- estudar, através de um modelo experimental, as possíveis vias de inibição da ansa autócrina SCF-c-Kit, no sentido de esclarecer os possíveis mecanismos de interacção dos diferentes ligandos do c-Kit.

2. Visto que o SDF-1 α é um mediador do efeito mitogénico do estradiol no carcinoma mamário¹⁷⁴ e a IL-4 (produzida nos linfócitos e nos mastócitos do tecido mamário), cuja interacção com o binómio SCF-c-Kit pode inibir a proliferação estrogénio-dependente do carcinoma de mama,^{175,207,208} uma segunda perspectiva futura deste estudo consiste em:

- estudar, numa linha celular de carcinoma mamário ZR75-1 (linha celular com coexpressão natural de c-Kit e de SCF), a interacção entre a IL-4 e o SDF-1 α , no sentido de saber se, neste tipo de neoplasia, a IL-4 (inibidora do efeito mitogénico do estradiol no cancro de mama) diminui os níveis de SDF-1 α (mediador do efeito mitogénico do estradiol).

3. Sabendo-se da necessidade de presença simultânea *in vitro* do SCF, do c-Kit e do estrogénio, seria igualmente interessante avaliar a importância relativa do IGF-1, reconhecido factor de crescimento do carcinoma mamário, na interacção entre esses três factores promotores de cancro de mama. Assim sendo, uma terceira perspectiva futura consiste em:

- comparar, numa linha celular de cancro de mama ZR75-1 os efeitos da interacção de SCF, de c-Kit, de estrogénio e de tamoxifeno (anti-estrogénico), respectivamente, na presença e na ausência de IGF-1, por forma a comparar o efeito sobre o binómio SCF-c-Kit do estrogénio e do IGF-1.

4.

a) O tumor filóide (TF) apresenta semelhanças com o GIST (tumor estromal gastrointestinal): são ambos tumores mesenquimatosos raros que atingem essencialmente doentes de meia-idade.^{209,210} Sendo ambos tratados por excisão completa, frequentemente recidivam, obrigando a re-intervenções cirúrgicas e, mesmo quando histologicamente benignos, comportam-se não raras as vezes como clinicamente malignos.¹²⁵ Para além disso, os dois tipos de tumores respondem mal à quimioterapia convencional. Em termos biológicos possuem afinidades: são ambos tumores com origem no estroma, com uma clara evidência de interacção parácrina entre o componente estromal e o componente epitelial.⁵⁰ No caso do TF, essa interacção epitélio-estromal foi demonstrada recentemente pela coexpressão do PDGF e do receptor beta do PDGF nos dois componentes tecidulares.^{3,4} Na oncogénese dos GIST encontram-se envolvidas as células intersticiais de Cajal, células "pacemaker" do estroma gastrointestinal.^{211,212} Encontra-se por descobrir no estroma mamário algum subtipo celular que funcione como possível homólogo das referidas células estromais de Cajal. É importante referir que se observa uma hiperplasia destas mesmas células intersticiais de Cajal

nos tumores estromais gastrointestinais familiares (FGIST).²¹³ Os FGIST são tumores estromais gastrointestinais múltiplos e hereditários, com um padrão de transmissão autossómico dominante, tendo sido recentemente revelado o tipo de mutação germinativa que se verifica num dos dois alelos do protooncogene c-Kit e que condiciona o seu aparecimento: uma deleção *in-frame* do domínio justamembranar do c-Kit.^{66,214,215} Outra questão a equacionar do ponto de vista epidemiológico, e que permitiria estreitar a afinidade biológica verificada entre os GIST e os TF malignos, consiste em, como perspectiva futura do presente trabalho:

- estudar a incidência de tumores mamários em doentes com tumores estromais gastrointestinais familiares (FGIST), para determinar um possível aumento da probabilidade de desenvolvimento de neoplasias epitélio-mesenquimatosas mamárias em doentes com este tipo de patologia.

b) Sabendo-se que, por estudos imunohistoquímicos, ambos os tumores (Filóide e GIST) são positivos "para" a vimentina, "para" o CD34 e "para" a actina, (sendo, por outro lado, os GIST quase na sua totalidade positivos "para" o c-Kit⁵⁷) e que há uma associação da expressão de c-Kit com o potencial maligno destes tumores estromais mamários, pretendemos estudar as mutações activadoras do c-Kit nestas neoplasias. A maioria das mutações recentemente descritas nos GIST envolvem o domínio justamembranar do c-Kit ao nível do exão 11, entre os aminoácidos 550 e 560, e resultam numa activação constitutiva deste protooncogene. As mutações mais comuns no GIST consistem em deleções *in frame* de vários codões e, menos usualmente, mutações pontuais e inserções. Estando estas mutações do c-Kit envolvidas na progressão tumoral, julga-se que a caracterização do tipo de mutação específica verificada num determinado GIST poderá vir a constituir um marcador prognóstico deste e doutros tipos de tumores biologicamente afins.^{97,218} Sabe-se já, igualmente, que os dois tipos de mutações activadoras do c-Kit estudadas no GIST (mutações do "tipo regulador" que afectam a regulação da molécula cínase e mutações do "tipo *locus* enzimático" que alteram directamente a sequência de aminoácidos que codificam o referido *locus* enzimático) respondem de forma diferente aos inibidores do c-Kit (inibidores selectivos das tirosina-cínases), pelo que se torna necessária, por forma a orientar a terapêutica, a classificação dos doentes com base nas mutações específicas de cada indivíduo.¹⁵⁴

Actualmente, a inibição selectiva das tirosina-cínases pode ser considerada uma abordagem promissora na concepção de novos fármacos no domínio da Oncologia e já vem sendo utilizado em diferentes tipos de cancro.^{138,155} Os nossos resultados preliminares apontam para que o TF possa ser uma das neoplasias candidatas ao tratamento com estes fármacos. Os objectivos do futuro trabalho (já em curso) consistem em estudar as mutações específicas de doentes com TF de mama, no sentido de verificar qual a sua relação com o potencial maligno destes tumores. Procurará, deste modo, identificar-se a potencial população-alvo para os inibidores selectivos da tirosina-cínase. Em resumo, outra perspectiva futura de estudo consiste em:

-estudar nos tumores filóides mamários as mutações activadoras no domínio inibidor justamembranar codificado pelo exão 11 do gene do c-Kit.

- 1- Sakorafas GH, Tsiotou AG. Genetic predisposition to breast cancer: a surgical perspective. *Br J Surg* 2001;87:149-62
- 2- Berg JW, Hutter RV. Breast Cancer. *Cancer* 1995;75:257-69
- 3- Harris J. Breast cancer: Recent trends and progress and future prospects. Parts I,II, III *N Eng J Med* 1992;327:319;390;473
- 4- Shapiro S. Screening: Assessment of current studies. *Cancer* 1994;4:231-8
- 5- Kelsey JL, Gammon MD. The epidemiology of breast cancer. *CA Cancer J Clin* 1991;41:146-65
- 6- Garfinkel L, Boring CC, Heath CW Jr. Changing trends. An overview of breast cancer incidence and mortality. *Cancer* 1994;74:222-7
- 7- Dickson RB, Lippman ME. Growth factors in breast cancer. *Endocr Rev* 1995;16:559-95
- 8- Mendelsohn J, Howley PM, Israel MA, Liotta LA (Editors). *The Molecular Basis of Cancer. W.B. Saunders* 2nd Edition 2001:313-42
- 9- Barnes DM, Dublin EA, Fisher CJ *et al.* Immunohistochemical detection of p53 protein in mammary carcinoma. An important new independent indicator of prognosis? *Hum Pathol* 1993;24:469-76
- 10- Anastassiades O, Iakovou E, Stavridou N *et al.* Multicentricity in breast cancer. A study of 366 cases. *Am J Clin Pathol* 1993;99:238-43
- 11- Dawson PJ. What is new in our understanding of multifocal breast cancer. *Pathol Res Pract* 1993;189:111-6
- 12- Dawson PJ, Baekey PA, Clark RA. Mechanisms of multifocal breast cancers. An immunohistochemical study. *Hum Pathol* 1995;26:965-9
- 13- Noguchi S, Aihara T, Koyama H *et al.* Discrimination between multicentric and multifocal carcinomas of the breast through clonal analysis. *Cancer* 1994;74:872-7
- 14- The Centers for Disease Control Cancer and Steroid Hormone Study. Long-term oral contraceptive use and the risk of breast cancer. *JAMA* 1983;249:1591-5
- 15- Byers T. Nutritional risk factors for breast cancer. *Cancer* 1994;74:288-93
- 16- Early Breast Cancer Trialists` Collaborative Group. Systemic treatment of early breast cancer by hormonal, cytotoxic, or immune therapy. *Lancet* 1992;1:71-9
- 17- Santen RJ. Endocrine treatment of breast cancer in women. *Endocr Ver* 1990;11:221-31
- 18- Futreal PA, Liu Q, Shattuck-Eidens D *et al.* BRCA 1 mutations in primary breast and ovarian carcinomas. *Science* 1994;266:120-2
- 19- Wooster R, Neuhausen SL, Mangion J *et al.* Localization of a breast cancer susceptibility gene, BRCA2, to chromosome 13q12-13. *Science* 1994;265:2088-90
- 20- Vivanco I, Sawyers CL. The phosphatidylinositol 3-kinase-AKT pathway in human cancer. *Nat Rev Cancer* 2002;2:489-501
- 21- Rosen PP (Editor). *Rosen´s Breast Pathology*. Lippincott Williams & Wilkins. 2nd Edition 2001:192-9;243-8;301-23
- 22- Suo Z, Emilsen K, Tveit KM *et al.* Type 1 protein tyrosine kinases in benign and malignant breast lesions. *Histopathology* 1998;33:514-21
- 23- Canonico B, Felici C, Papa S. CD117. 2001 *J Biol Regul Homeost Agents* 2001;15:90-4
- 24- Qiu FH, Ray P, Brown K *et al.* Primary structure of c-kit: relationship with the CSF-1/PDGF receptor kinase family- oncogenic activation of v-kit involves deletion of extracellular domain and C terminus. *EMBO J* 1988;7:1003-11
- 25- Gibson PC, Cooper K. CD117(KIT) : a diverse protein with selective applications in surgical pathology. *Adv Anat Pathol* 2002;9:65-9
- 26- Carson WE, Haldar S, Baiocchi RA *et al.* The c-Kit ligand supresses apoptosis of human natural killer cells through the upregulation of bcl-2. *Proc Nat Acad Sci* 1994;91:7553-7
- 27- Blume-Jensen P, Janknecht R, Hunter T *et al.* The Kit receptor promotes cell survival via activation of PI3-kinase and subsequent Akt-mediated phosphorylation of bad on Ser 136. *Current Biology* 1998;8:779-82
- 28- Bellone G, Carbone A, Sibona N *et al.* Aberrant activation of c-kit protects colon carcinoma cells against apoptosis and enhances their invasive potential. *Cancer Res* 2001;61:2200-6
- 29- Bellone G, Silvestri S, Artusio E *et al.* Growth stimulation of colorectal carcinoma cells via the c-kit receptor is inhibited by TGF-beta 1. *J Cell Physiol* 1997;172:1-11
- 30- Roberts MM, Swart BW, Simmons PJ *et al.* Prolonged release and c-kit expression of haemopoietic precursor cells mobilized by stem cell factor and granulocyte colony stimulating factor. *Br J Haematol* 1999;104:778-84
- 31- Hoffman R, Tong J, Brandt J *et al.* The in vitro and in vivo effects of stem cell factor on human hematopoiesis. *Stem Cells* 1993;11:76-82
- 32- Daley T, Metcalfe DD, Akin C. Association of the Q576R polymorphism in the interleukin-4 receptor alpha chain with indolent mastocytosis limited to the skin. *Blood* 2001; 98:880-2

- 33- Rizzatti EG, Garcia AB, Portieres FL *et al.* Expression of CD117 and CD11b in bone marrow can differentiate acute promyelocytic leukemia from recovering benign myeloid proliferation. *Am J Clin Pathol* 2002;118:31-7
- 34- Nishida K, Wang L, Morii E *et al.* Requirement of Gab2 for mast cell development and KitL/c-Kit signaling. *Blood* 2002;99:1866-9
- 35- Rygaard K, Nakamura T, Spang-Thomsen M. Expression of the proto-oncogenes c-met and c-kit and their ligands, hepatocyte growth factor/scatter factor and stem cell factor in SCLC cell lines and xenografts. *Br J Cancer* 1993;67:37-46
- 36- Nakagawa S, Kitoh T. Measurement of KIT ligand/stem cell factor: clinical and biochemical significance. *Curr Opin Hematol* 2000;7:133-42
- 37- Jahn T, Seipel P, Coutinho S *et al.* Analysing c-kit internalization using a functional c-kit EGFP chimera containing the fluorochrome within the extracellular domain. *Oncogene* 2002;21:4508-20
- 38- Lammie A, Drobnjak M, Gerald W *et al.* Expression of c-Kit and Kit ligands proteins in normal human tissues. *J Histochem Cytochem* 1999;150:286-9
- 39- Hines SJ, Organ C, Kornstein J *et al.* Coexpression of the c-Kit and stem-cell factor genes in breast carcinomas. *Cell Growth Differ* 1995; 6:769-79
- 40- Smith Ma, Pallister CJ, Smith JG. Stem cell factor: biology and relevance to clinical practice. *Acta Haematol* 2001;105:143-50
- 41- Broudy VC, Lin NL, Liles WC *et al.* Signaling via src family kinases is required for normal internalization of the receptor c-Kit. *Blood* 1999;94:1979-86
- 42- Yee NS, Hsiao CWM, Serve H *et al.* Mechanism of down regulation of c-Kit receptor: roles of receptor tyrosine kinase, phosphatidylinositol 3'-kinase, and protein kinase C. *Journal of Biological Chemistry* 1994;269:991-8
- 43- Serve H, Yee NS, Stella G *et al.* Differential roles of PI3-kinase and Kit tyrosine 821 in Kit receptor mediated proliferation, survival and cell adhesion in mast cell. *EMBO Journal* 1995;14:473-83
- 44- Taylor ML, Metcalfe DD. Kit signal transduction. *Hematol Oncol Clin North Am* 2000;14:517-35
- 45- Keshet E, Lyman SD, Williams DE *et al.* Embryonic RNA expression patterns of the c-Kit receptor and its cognate ligand suggest multiple functional roles in mouse development. *EMBO J* 1991;10:2425-35
- 46- Perez-Losada J, Sanchez-Martin M, Rodriguez-Garcia A *et al.* Zinc-finger transcription factor Slug contributes to the function of the stem cell factor c-kit signaling pathway. *Blood* 2002;100:1274-86
- 47-Tsuura Y, Hiraki H, Watanabe K *et al.* Preferential localization of c-kit product in tissue mast cells, basal cells of skin, epithelial cells of breast, small cell lung carcinoma and seminoma/dysgerminoma in human: immunohistochemical study on formalin-fixed, paraffin-embedded tissues. *Virchows Arch* 1994;424:134-41
- 48- Matsuda R, Takahashi T, Nakamura S *et al.* Expression of the c-kit protein in human solid tumors and in corresponding fetal and adult normal tissues. *Am J Pathol* 1993;142: 339-46
- 49- Majumader S, Brown K, Qiu FH *et al.* C-Kit protein, a transmembrane kinase: identification in tissues and characterization. *Mol Cell Biol* 1988;8:4896-903
- 50- Sawhney N, Garrahan N, Douglas-Jones AG *et al.* Epithelial-stromal interactions in tumors. *Cancer* 1992;70:2115-20
- 51- Konig A, Corbacioglu S, Ballmaier M *et al.* Downregulation of c-Kit expression in human endothelial cells by inflammatory stimuli. *Blood* 1997;90:148-55
- 52- Liang X, Wisniewski D, Strife A *et al.* Phosphatidyl inositol 3-kinase and Src family kinases are required for phosphorylation and membrane recruitment of Dok-1 in c-kit signaling. *J Biol Chem* 2002;277:13732-8
- 53- Linnekin D, Deberry CS, Mou S *et al.* Lyn associates with the juxtamembrane region of c-Kit and is activated by stem cell factor in hematopoietic cell lines and normal progenitor cells. *Jour Biol Chem* 1997;272:450-5
- 54- Szymkiewicz I, Kowanetz K, Soubeyran P *et al.* CIN 85 participates in Cbl-b-mediated downregulation of receptor tyrosine kinases. *J Biol Chem* 2002;12:204-7
- 55- Anzai N, Lee Y, Youn BS *et al.* C-kit associated with the transmembrane 4 superfamily proteins constitutes a functionally distinct subunit in human hematopoietic progenitors. *Blood* 2002;99:4413-21
- 56- Tian Q, Frierson HF, Krystal GW *et al.* Activating c-kit gene mutations in human germ cell tumors. *Am J Pathol* 1999;154:1643-7
- 57- Miettinen M, Sobin LH, Sarlomo-Rikala M. Immunohistochemical spectrum of GISTs at different sites and their differential diagnosis with a reference to CD117 (KIT). *Modern Pathology* 2000;13:1134-42

- 58- Heinrich MC, Rubin BP, Longley BJ *et al.* Biology and genetic aspects of gastrointestinal stromal tumors: KIT activation and cytogenetic alterations. *Hum Pathol* 2002;33:484-95
- 59- Lux ML, Rubin BP, Biase TL *et al.* KIT extracellular and kinase domain mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;156:791-5
- 60- Mauduit C, Hamamah S, Benahmed M. Stem cell factor/c-Kit system in spermatogenesis. *Hum Reprod Update* 1999;5:535-45
- 61- Strohmeyer T, Peter S, Hartmann M *et al.* Expression of the hst-1 and c-kit proto-oncogenes in human testicular germ cell tumors. *Cancer Res* 1991;51:1811-6
- 62- Driancourt MA, Reynaud K, Cortvrindt *et al.* Roles of KIT and KIT LIGAND in ovarian function. *Rev Reprod* 2000;4:143-52
- 63- Leroy X, Augusto D, Leteurtre E *et al.* CD 30 and CD 117 (c-kit) used in combination are useful for distinguishing embryonal carcinoma from seminoma. *J Histochem Cytochem* 1999;150:283-5
- 64- Palumbo C, van Roozendaal K, Gillis AJ *et al.* Expression of the PDGF alpha-receptor 1.5 kb transcript, OCT-4, and c-KIT in human normal and malignant tissues. Implications for the early diagnosis of testicular germ cell tumours and for our understanding of regulatory mechanisms. *J Pathol* 2002;196:467-7
- 65- Shibamura K, Tong ZB, Vanderhoof V *et al.* Investigation of KIT gene mutations in women with 46, XX spontaneous premature ovarian failure. *BMC Womens Health* 2002;2:8
- 66- Isozaki K, Terris B, Belghiti J *et al.* Germline-activating mutation in the kinase domain of KIT gene in familial gastrointestinal stromal tumors. *Am J Pathol* 2000;157:1581-5
- 67- Taniguchi M, Nishida T, Hirota S *et al.* Effect of c-Kit mutation on prognosis of gastrointestinal stromal tumors. *Cancer Res* 1999;59:4297-300
- 68- Gokkel E, Grossman Z, Ramot B *et al.* Structural organization of the murine c-kit proto-oncogene. *Oncogene* 1992;7:1423-9
- 69- Andre C, Hampe A, Lachaume *et al.* Sequence analysis of two genomic regions containing the KIT and the FMS receptor tyrosine kinase genes. *Genomics* 39:216-26, 1997
- 70- Vandembark GR, deCastro CM, Taylor H *et al.* Cloning and structural analysis of the human c-kit gene. *Oncogene* 1992;7:1259-66
- 71- Andre C, Martin E, Cornu F *et al.* Genomic organization of the human c-kit gene: evolution of the receptor tyrosine kinase subclass III. *Oncogene* 1992;7:685-91
- 72- Giebel LB, Strunk KM, Holmes SA *et al.* Organization and nucleotide sequence of the human KIT (mast/stem cell growth factor receptor) proto-oncogene. *Oncogene* 1992;7:2207-17
- 73- Ashman LK. The biology of stem cell factor and its receptor C-kit. *Int J Biochem Cell Biol* 1999;31:1037-51
- 74- Broudy VC, Lin NL, Sabath DF. The fifth immunoglobulin-like domain of the Kit receptor is required for proteolytic cleavage from the cell surface. *Cytokine* 2001;15:188-95
- 75- Ratajczak MZ, Perrotti D, Melotti P *et al.* Myb and ets proteins are candidate regulators of c-Kit expression in human hematopoietic cells. *Blood* 2001;91:1934-46
- 76- Jacobsen FW, Dubois CM, Rusten LS *et al.* Inhibition of stem cell factor-induced proliferation of primitive murine hematopoietic progenitor cells signaled through the 75-kilodalton tumor necrosis factor receptor: regulation of c-Kit and p53 expression. *Journal of Immunology* 1995;154:3732-41
- 77- Park GH, Plummer HK, Krystal GW. Selective Sp-1 binding is critical for maximal activity of the human c-Kit promoter. *Blood* 2001;92:4138-49
- 78- Kros G, He G, Lefrancois M *et al.* Transcription factor SCL is required for c-Kit expression and C-Kit function in hemopoietic cells. *J Exper Med* 1998;188:439-50
- 79- Huang S, Jean D, Luca M *et al.* Loss of AP-2 results in downregulation of c-Kit and enhancement of melanoma tumorigenicity and metastasis. *EMBO J* 1998;17:4358-69
- 80- Dubois CM, Ruscetti FW, Stankova J *et al.* Transforming growth factor-beta regulates c-Kit message stability and cell-surface protein expression in hematopoietic progenitors. *Blood* 1994;83:3138-45
- 81- Vandembark GR, Chen E, Friday K *et al.* Complex regulation of human c-Kit transcription by promoter repressors, activators, and specific myb elements. *Cell Growth Differ* 7 1997;24:1383-92
- 82- Flanagan JG, Leder P. The Kit ligand: a cell-surface molecule altered in Steel mutant fibroblasts. *Cell* 1991;63:185-94
- 83- Galli SJ, Zsebo KM, Geissler EN *et al.* The Kit ligand, stem cell factor. *Advances in Immunology* 1990;55:1-96
- 84- Broudy VC. Stem cell factor and hematopoiesis. *Blood* 1992;90:1345-64
- 85- Tajima Y, Moore MA, Soares V *et al.* Consequences of exclusive expression in vivo of Kit-ligand lacking the major proteolytic cleavage site. *Proc Nat Acad Sci* 1998;95:903-8

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 86- Wypych J, Bennett LG, Schwartz MG *et al.* Soluble kit receptor in human serum. *Blood* 1995;85:7386-95
- 87- Reith AD, Ellis C, Lyman SD *et al.* Signal transduction by normal isoforms and W mutant variants of the Kit receptor tyrosine kinase. *EMBO Journal* 1991;10:2451-9
- 88- Crosier PS, Ricciardi ST, Hall LR *et al.* Expression of isoforms of the human receptor tyrosine kinase c-kit in leukemic cell lines and acute myeloid leukemia. *Blood* 1993;82:1151-58
- 89- Hayashi S-I, Kunisada T, Ogawa M *et al.* Exon skipping by mutation of an authentic splice site of c-kit gene in W/W mouse. *Nucleic Acids Research* 1991;19:1267-71
- 90- Zhu WM, Dong WF, Minden M. Alternate splicing creates two forms of the human kit protein. *Leukemia and Lymphoma* 1994;12:441-7
- 91- Flanagan JG, Chan DC, Leder P. Transmembrane form of the kit ligand growth factor is determined by alternative splicing and is missing in the Sld mutant. *Cell* 1991;64:1025-35
- 92- Piao X, Curtis JE, Minkin S *et al.* Expression of the Kit and KitA receptor isoforms in human acute myelogenous leukemia. *Blood* 1994;83:476-81
- 93- Caruara G, Cambareri AC, Ashman LK. Isoforms of c-KIT differ in activation of signalling pathways and transformation of NIH3T3 fibroblasts. *Oncogene* 1999;16:3508-12
- 94- Turner AM, Bennett LG, Lin NL *et al.* Identification and characterization of a soluble c-Kit receptor produced by human hematopoietic cell lines. *Blood* 1995;95:2052-8
- 95- Wypich J, Bennett LG, Schwartz *et al.* Soluble kit receptor in human serum. *Blood* 1995;85:66-73
- 96- Zhang Z, Zhang R, Joachimiak A *et al.* Crystal structure of human stem cell factor: implication for stem cell factor receptor dimerization and activation. *Proc Nat Acad Sci* 2000;97:7732-7
- 97- Longley BJ; Reguera MJ; Ma Y. Classes of c-kit activating mutations: proposed mechanisms of action and implications for disease classification and therapy. *Leuk Res* 2001;25:571-6
- 98- Allander SV, Nupponen NN, Ringnér M *et al.* Gastrointestinal stromal tumors with KIT mutations exhibit a remarkably homogeneous gene expression profile. *Cancer Res* 1999;61:8624-8
- 99- Hirota S, Isozaki K, Nishida T *et al.* Effects of loss-of-function and gain-of-function mutations of c-Kit on the gastrointestinal tract. *J Gastroenterology* 2000;12:75-9
- 100- Moskaluk CA, Tian Q, Marshall CR *et al.* Mutation of c-kit JM domain are found in a minority of human gastrointestinal stromal tumors. *Oncogene* 1999;18:897-902
- 101- Morey AL, Wanigesekera GD, Hawkins NJ *et al.* C-Kit mutations in gastrointestinal stromal tumours. *Pathology* 2002;34:315-9
- 102- Hirota S, Nishida T, Isokazi K *et al.* Gain-of-function mutation at the extracellular domain of KIT in gastrointestinal stromal tumours. *J Pathol* 2001 ;193:505-10
- 103- Hirota S, Isokazi K, Moriyama Y *et al.* Gain-of-function mutations of c-Kit in human gastrointestinal stromal tumors. *Science* 1998;279:577-80
- 104- Ernst SI, Hubbs AE, Przygodzki Rm *et al.* KIT mutation portends poor prognosis in gastrointestinal stromal/smooth muscle tumors. *Lab Invest* 1998;78:1633-6
- 105- Corless CL, McGreevey L, Haley A *et al.* KIT mutations are common in incidental gastrointestinal stromal tumors one centimeter or less in size. *Am J Pathol* 2002;160:1567-72
- 106- Yongsheng MA, Zeng S, Metcalfe DD *et al.* The c-KIT mutation causing human mastocytosis is resistant to STI571 and other KIT kinase inhibitors; kinases with enzymatic site mutations show different inhibitor sensitivity profiles than wild-type kinases and those with regulatory-type mutations. *Blood* 2002;99:1741-4
- 107- Liao AT, Chien MB, Shenoy N *et al.* Inhibition of constitutively active forms of mutant kit by multitargeted indolinone tyrosine kinase inhibitors. *Blood* 2002;100:585-93
- 108- Costa JJ, Demetri GD, Harrist TJ *et al.* Recombinant human stem cell factor (kit ligand) promotes human mast cell and melanocyte hyperplasia and functional activation in vivo. *J Exp Med* 1996;183:2681-6
- 109- Krystal GW, Honsawek S, Kiewlich D *et al.* Indolinone Tyrosine kinase inhibitors block kit activation and growth of small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 1999;61:3360-8
- 110- Arber DA, Tamayo R, Weiss LM *et al.* Paraffin section detection of the c-Kit gene product (CD117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 1998;29:498-504
- 111- DiPaola RS, Kuczynski WI, Onodera K *et al.* Evidence for a functional kit receptor in melanoma, breast, and lung carcinoma cells. *Cancer Gene Ther* 1997;4:176-82
- 112- Natali PG, Nicotra MR, Winler AB *et al.* Progression of human cutaneous melanoma is associated with loss of expression of c-Kit proto-oncogene receptor. *Int Journ Cancer* 1992; 52:197-201

- 113- Lassam N, Bickford S. Loss of c-kit expression in cultured melanoma cells. *Oncogene* 1992;7:51-6
- 114- Plummer H III, Catlett J, Leftwich J *et al.* c-myc expression correlates with suppression of the c-kit proto-oncogene expression in small cell lung cancer lines. *Cancer Res* 1993;53:4337-42
- 115- O Dyer ME, Druker BJ. The role of the tyrosine kinase inhibitor STI571 in the treatment of cancer. *Current Cancer Drug Targets* 2001;1:49-57
- 116- Baker DE. Imatinib mesylate. *Rev Gastroenterol Disord* 2002;2:75-86
- 117- Radford IR. Imatinib. Novartis. *Curr Opin Investig Drugs* 2002;3:492-9
- 118- Heinrich MC, Blanke CD, Druker BJ *et al.* Inhibition of KIT tyrosine kinase activity: a novel molecular approach to the treatment of KIT-positive malignancies. *J Clin Oncol* 2002;20:1692-703
- 119- Nagar B, Bornmann WG, Pellicena P *et al.* Crystal Structures of the Kinase Domain of c-Abl in Complex with the Small Molecule Inhibitors PD173955 and Imatinib (STI-571). *Cancer Res* 2002;62:4236-43
- 120- Mauro MJ, Druker BJ. STI571: targeting BCR-ABL as therapy for CML. *Oncologist* 2001;6:230-2
- 121- Weisberg E, Griffin JD. Mechanisms of resistance imatinib (STI571) in preclinical models and in leukemia patients. *Drug resistance Update* 2001;4:22-8
- 122- Moore T, Lee AH. Expression of CD34 and bcl-2 in phyllodes tumors, fibroadenomas and spindle lesions of the breast. *Histopathology* 2001;38:62-7
- 123- Hoover RR, Mahon FX, Melo JV *et al.* Overcoming STI571 resistance with the farnesyl transferase inhibitor SCH66336. *Blood* 2002;100:1068-71
- 124- Kantarjian HM, O'Brien S, Cortes JE *et al.* Imatinib mesylate therapy for relapse after allogeneic stem cell transplantation for chronic myelogenous leukemia. *Blood* 2002;100:1590-5
- 125- Wang L, Pearson K, Pillitteri L *et al.* Serial monitoring of BCR-ABL by peripheral blood real-time polymerase chain reaction predicts the marrow cytogenetic response to imatinib mesylate in chronic myeloid leukaemia. *Br J Haematol* 2002;118:771-7
- 126- Apperley JF, Gardembas M, Melo JV *et al.* Response to imatinib mesylate in patients with chronic myeloproliferative diseases with rearrangements of the platelet-derived growth factor receptor beta. *N Engl J Med* 2002;347:481-7
- 127- Demetri GD, von Mehren M, Blanke CD *et al.* Efficacy and safety of imatinib mesylate in advanced gastrointestinal stromal tumors. *N Engl J Med* 2002;347:472-80
- 128- Tuveson DA, Willis NA, Jacks T *et al.* STI571 inactivation of the gastrointestinal stromal tumor c-KIT oncoprotein : biological and clinical implications. *Oncogene* 2001;20:5054-8
- 129- Reddy A, Kaelin WG. Using cancer genetics to guide the selection of anticancer drug targets. *Curr Opin Pharmacol* 2002;2:366-73
- 130- Dachs GU, Dougherty GJ, Stratford IJ *et al.* Targeting gene therapy to cancer: a review. *Oncol Res* 1997;9:313-25
- 131- Hochhaus A, Lahaye T, Kreil S *et al.* Selective inhibition of tyrosine kinases - a new therapeutic principle in oncology. *Onkologie* 2001;24:65-71
- 132- Traxler P, Bold G, Buchdunger E *et al.* Tyrosine kinase inhibitors: From rational design to clinical trials. *Med Res Rev* 2001;21:499-512
- 133- Sawyers CL. Rational therapeutic intervention in cancer: kinases as drug targets. *Curr Opin Genet Dev.* 2002;12:111-5
- 134- Alton G, Schwamborn K, Satoh Y *et al.* Therapeutic modulation of inflammatory gene transcription by kinase inhibitors. *Expert Opin Biol Ther* 2002;2:621-32
- 135- Chui X, Egami H, Yamashita J *et al.* Immunohistochemical expression of the c-kit proto-oncogene product in human malignant and non-malignant breast tissues. *Br J Cancer* 1996;73:1233-6
- 136- Natali PG, Nicotra MR, Sures I *et al.* Breast cancer is associated with loss of the c-kit oncogene product. *Int J Cancer* 1992;52:713-7
- 137- Feakins RM, Wells CA, Young KA *et al.* Platelet-derived growth factor expression in phyllodes tumors and fibroadenomas of the breast. *Hum Pathol* 2000;31:1214-22
- 138- Farahmand S, Cowan DF. Elastosis in the normal aging breast. *Arch Pathol Lab Med* 1991;115:1241-6
- 139- Davies JD. Pigmented periductal cells (ochrocytes) in mammary dysplasias: their nature and significance. *J Pathol* 1974;114:205-16
- 140- Rao Br, Meyer JS, Fry CG *et al.* Most cystosarcoma phyllodes and fibroadenomas have progesterone receptor but lack estrogen receptor: a stromal localization of progesterone receptor. *Cancer* 1981;47:2016-21
- 141- Basset P, Bellocq JP, Wolf C *et al.* A novel metalloproteinase gene specifically expressed in stromal cells of breast carcinomas. *Nature* 1990;348: 699-703

- 142- Cullen KJ, Smith HS, Hills *et al.* Growth factor mRNA expression by human breast fibroblasts from benign and malignant lesions. *Cancer Res* 1991;51:4978-81
- 143- Auger M, Hanna W, Kahn HJ. Cystosarcoma phyllodes of the breast and its mimics. An immunohistochemical and ultrastructural study. *Arch Pathol Lab Med* 1989;113:1231-5
- 144- Tavassoli FA, Burga AM. Periductal stromal tumor: a rare lesion with low-grade sarcomatous behavior. *Am J Surg Pathol* 2003 27:343-8
- 145- Kleer CG, Giordano TJ, Braun T *et al.* Pathologic, immunohistochemical, and molecular features of benign and malignant phyllodes tumors of the breast. *Mod Pathol* 2001;14:185-90
- 146- Kim WH, Kim CW, Noh D-Y *et al.* Differential pattern of perivascular type IV collagen deposits in phyllodes tumors of the breast. *J Korean Med Sci* 1992;7:360-3
- 147- Kocová L, Skálová A, Fakan F *et al.* Phyllodes tumour of the breast: immunohistochemical study of 37 tumours using MIB1 antibody. *Pathol Res Pract* 1998;194:97-104
- 148- Reinfuss M, Mitus J, Duda K *et al.* The treatment and prognosis of patients with phyllodes tumor of the breast: an analysis of 170 cases. *Cancer* 1996;77: 910-6
- 149- Noguchi S, Motomura K, Inaji H *et al.* Clonal analysis of fibroadenoma and phyllodes tumor of the breast. *Cancer Res* 1993;53:4071-4
- 150- Kuijper A, Buerger H, Simon R *et al.* Analysis of the progression of fibroepithelial tumours of the breast by PCR-based clonality assay. *J Pathol* 2002;197:575-81
- 151- Christensen L, Nielsen M, Madsen PM. Cystosarcoma Phyllodes: a review of 19 cases with emphasis on the occurrence of associated breast carcinoma. *Acta Path Microbiol Immunol Scand SectA* 1983;94:35-41
- 152- Lu Y-J, Birdsall S, Osin P *et al.* Phyllodes tumours of the breast analysed by comparative genomic hybridization and association of increased 1q copy number with stromal overgrowth and recurrence. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:275-81
- 153- Dietrich CU, Pandis N, Rizou H *et al.* Cytogenetic findings in phyllodes tumors of the breast: Karyotypic Complexity differentiates between malignant and benign tumours. *Hum Pathol* 1997;28:1370-82
- 154- Tirkkonen M, Tanner M, Karhu R *et al.* Molecular cytogenetics of primary breast cancer by CGH. *Genes Chromosomes Cancer* 1998;21:177-84
- 155- Pandis N, Bardi G, Mitelman F *et al.* Deletion of the short arm of chromosome 3 in breast tumors. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;18:241-5
- 156- Sawyer EJ, Hanby AM, Ellis P *et al.* Molecular analysis of phyllodes tumors reveals distinct changes in the epithelial and stromal components. *Am J Pathol* 2000;156:1093-8
- 157- Millar EKA, Beretou J, Marr P *et al.* Malignant phyllodes tumours of the breast display increased stromal p53 protein expression. *Histopathology* 1999;34:491-6
- 158- Gatalica Z, Finkelstein S, Lucio E *et al.* p53 protein expression and gene mutation in phyllodes tumors of the breast. *Pathol Res Pract* 2001;197:183-7
- 159- Kuenen-Boumeester V, Henzen-Logmans SC, Timmermans MM *et al.* Altered expression of p53 and its regulated proteins in phyllodes tumours of the breast. *J Pathol* 1999;189:169-75
- 160- The Consensus Conference Committee. Consensus Conference on the classification of ductal carcinoma in situ. *Cancer* 1997;80:1798-802
- 161- Douglas-Jones AG, Gupta SK, Attanoos RL *et al.* A critical appraisal of six modern classifications of ductal carcinoma in situ of the breast (DCIS): correlation with grade of associated invasive carcinoma. *Histopathology* 1996;29:397-409
- 162- Sloane JP, Amendoeira I, Apostolikas N *et al.* Consistency achieved by 23 European pathologists in categorizing ductal carcinoma in situ of the breast using five classifications. European Commission Working Group on Breast Screening Pathology. *Hum Pathol* 1998;29:1056-62
- 163- Bellamy CD, McDonald C, Salter DM *et al.* Noninvasive ductal carcinoma of the breast. The relevance of histologic categorization. *Hum Pathol* 1993;24:16-23
- 164- Schmitt FC, Leal CB, Bento MJ *et al.* Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer* 1995;75:2123-31
- 165- Robbins P, Pinder S, de Klerk N *et al.* Histological grading of breast carcinomas. A study of interobserver agreement. *Hum Pathol* 1995;26:873-9
- 166- Makhlof HR, Remotti HE, Ishak KG *et al.* Expression of KIT (CD117) in angiomyolipoma. *Am J Surg Pathol* 2002;26:493-7
- 167- Yared MA, Middleton LP, Meric F *et al.* C-Kit proto-oncogene product expression in breast tissue. *Annual Meeting Abstracts of the American Society of Pathology* 2001;57A: 229
- 168- Natali PG, Berlingieri MT, Nicotra MR *et al.* Transformation of thyroid epithelium is associated with loss of c-Kit receptor. *Cancer Res* 1995;55:1787-91

- 169- Rosen PP, Lesser ML, Arroyo CD *et al.* Immunohistochemical detection of HER2/neu in patients with axillary lymph-node negative breast carcinoma. A study of epidemiologic risk factors, histologic features, and prognosis. *Cancer* 1995;75:1320-6
- 170- Battifora H, Gaffey M, Esteban J *et al.* Immunohistochemical assay of neu/c-erbB-2 oncogene product in paraffin-embedded tissues in early breast cancer. Retrospective follow-up study of 245 stage I and stage II cases. *Mod Pathol* 1991;4:466-74
- 171- Berdel WE, de Vos S, Maurer J *et al.* Recombinant human stem cell factor stimulates growth of a human glioblastoma cell line expressing c-kit protooncogene. *Cancer Res* 1992;52: 3498-502
- 172- Krystal GW, Hines SJ, Organ CP. Autocrine growth of small cell lung cancer mediated by coexpression of c-Kit and stem cell factor. *Cancer Res* 1996;56:370-6
- 173- Kijima T, Maulik G, Ma PC *et al.* Regulation of cellular proliferation, cytoskeletal function and signal transduction through CXCR4 and c-Kit in small cell lung cancer cells. *Cancer Res* 2002;62:6304-11
- 174- Hall Jm, Korach KS. Stromal cell-derived factor 1, a novel target of estrogen receptor action, mediates the mitogenic effects of estradiol in ovarian and breast cancer cells. *Mol Endocrinol* 2003;17:792-803
- 175- Gooch JL, Lee AV, Yee D. Interleukin 4 inhibits growth and induces apoptosis in human breast cancer lines. *Cancer Res* 1998 58:4199-205
- 176- Nishida K, Tsukamoto T, Uchida K *et al.* Introduction of the c-Kit gene leads to growth suppression of a breast cancer cell line, MCF-7. *Anticancer Res* 1996 16:3397-402
- 177- Hines SJ, Litz JS, Krystal GW. Coexpression of c-kit and stem cell factor in breast cancer results in enhanced sensitivity to members of the EGF family of growth factors. *Breast Cancer Res Treat* 1999;58:1-10
- 178- Barsky SH, Siegal GP, Jannotta F *et al.* Loss of basement membrane components by invasive tumors but not by their benign counterparts. *Lab Invest* 1983;49:140-7
- 179- Cowen PN, Bates C. The significance of intraductal appearances in breast cancer. *Clin Oncol* 1984;10:67-72
- 180- Bose S, Lesser ML, Norton L *et al.* Immunophenotype of intraductal carcinoma. *Arch Pathol Lab Med* 1996;100:81-5
- 181- Ottinetti A, Sapino A . Morphometric evaluation of microvessels surrounding hyperplastic and neoplastic mammary lesions. *Breast Cancer Res Treat* 1988;11:241-8
- 182- Weidner N, Semple JP, Welch WR *et al.* Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast cancer. *N Eng J Med* 1991;324:1-8
- 183- Guidi AJ, Fisher L, Harris JR *et al.* Microvessel density and distribution in ductal carcinoma in situ of the breast. *J Natl Cancer Inst* 1994;86: 614-9
- 184- Vartanian RK, Weidner N. Correlation of intratumoral endothelial cell proliferation with microvessel density (tumor angiogenesis) and tumor cell proliferation in breast carcinoma. *Am J Pathol* 1994;144:1188-94
- 185- Jing X, Kakudo K, Murakami M *et al.* Intraductal spread of invasive breast carcinoma has a positive correlation with c-erb b2 overexpression and vascular invasion. *Cancer* 1999; 86:439-48.
- 186- Wold LE, Ingle JN, Pisansky TM *et al.* Prognostic factors for patients with carcinoma of the breast. *Mayo Clin Proc* 1995;70:678-9
- 187- Rosen PP, Saigo PE, Braun DW, *et al.* Axillary micro- and macrometastases in breast cancer. Prognostic significance of tumor size. *Ann Surg* 1981;196:585-91
- 188- Carter CL, Allen C, Henson DE *et al.* Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24740 breast cancer cases. *Cancer* 1989;63:181-7
- 189- Rosen PP, Groshen S, Kinne DW *et al.* Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma. *J Clin Oncol* 1993;11:2090-100
- 190- Broet P, de la Rochefordière A, Scholl SM *et al.* Contralateral breast cancer. Annual incidence and risk parameters. *J Clin Oncol* 1995;13:1578-83
- 191- Bacus S, Zelnick C, Plowman G *et al.* Expression of the erbB-2 family of growth factor receptors and their ligands in breast cancers: implication for tumor biology and clinical behavior. *Am J Clin Path* 1994;102:13-24
- 192- Earp Hs, Dawson TL, Li X *et al.* Heterodimerization and functional interaction between EGF receptor family members: a new signaling paradigm with implications for breast cancer research. *Breast Cancer Res Treat* 1995;35:115-32
- 193- Palmu S, Soderstrom KO, Quazi K *et al.* Expression of C-KIT and HER-2 tyrosine kinase receptors in poor-prognosis breast cancer. *Anticancer Res* 2002;22:411-4
- 194- Tsuura Y, Suzuki T, Honma K *et al.* Expression of c-kit protein in proliferative lesions of human breast: sexual difference and close association with phosphotyrosine status. *J Cancer Res Clin Oncol* 2002;128:239-46

- 195- Sawyer EJ, Hanby AM, Rowan AJ *et al.* The Wnt pathway, epithelial-stromal interactions, and malignant progression in phyllodes tumours. *J Pathol* 2002;196:437-44
- 196- Sawyer EJ, Poulson R, Hunt FT *et al.* Malignant phyllodes tumours show stromal overexpression of c-myc and c-kit. *J Pathol* 2003;200:59-64
- 197- Henning K, Berndt A, Katenkamp D *et al.* Loss of laminin-5 in the epithelium-stroma interface: an immunohistochemical marker of malignancy in epithelial lesions of the breast. *Histopathology* 1999;34:305-9
- 198- Yamashita J-I, Ogawa M, Egami H *et al.* Abundant expression of immunoreactive endothelin 1 in mammary phyllodes tumor: possible paracrine role of endothelin 1 in the growth of stromal cells in phyllodes tumor. *Cancer Res* 1992;52:4046-9
- 199- Schrey MP, Patel KV, Tezapsidis N. Bombesin and glucocorticoids stimulate human breast cancer cells to produce endothelin, a paracrine mitogen for breast stromal cells. *Cancer Res* 1992;52:1786-90
- 200- Borsi L, Carnemolla B, Nicolò G *et al.* Expression of different tenascin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 1994;58:11-6
- 201- Jones JL, Critchley DR, Walker RA. Alteration of stromal protein and integrin expression in breast - a marker of premalignant change? *J Pathol* 1992;167:399-406
- 202- Kaczmarek J, Castellani P, Nicolò G *et al.* Distribution of oncofetal fibronectin isoforms in normal, hyperplastic and neoplastic human breast tissues. *Int J Cancer* 1994;58:17-9
- 203- Bhardwaj B, Klassen J, Cossette N *et al.* Localization of platelet-derived growth factor beta receptor expression in the periepithelial stroma of human breast carcinoma. *Clin Cancer Res* 1996;2:773-82
- 204- Coltrera MD, Wang J, Porter PL. Expression of platelet-derived growth factor B-chain and the platelet-derived growth factor receptor beta subunit in human breast tissue and breast carcinoma. *Cancer Res* 1995;55:2703-8
- 205- Sternlicht MD, Safarians S, Rivera SP *et al.* Characterizations of the extracellular matrix and proteinase inhibitor content of human myoepithelial tumors. *Lab Invest* 1996;74:781-96
- 206- Sternlicht MD, Kedeshian P, Shao ZM *et al.* The human myoepithelial cell is a natural tumor suppressor. *Clin Cancer Res* 1997; 3:1949-58
- 207- Arber DA, Tamayo R, Weiss LM. Paraffin section detection of the c-kit gene product (CD 117) in human tissues: value in the diagnosis of mast cell disorders. *Hum Pathol* 1998;29:498-504
- 208- Natali PG, Nicotra MR, Sures I *et al.* Expression of c-Kit receptor in normal and transformed human nonlymphoid tissues. *Cancer Res* 1992 ;52:6139-43
- 209- Ciatto S, Bonardi R, Cataliotti L *et al.* Members of the Coordinating Center and Writing Committee of FONCAM. Phyllodes tumor of the breast: a multicenter series of 59 cases. *Eur J Surg Oncol* 1992;18:545-9
- 210- Dacic S, Kounelis S, Kouri E *et al.* Immunohistochemical profile of cystosarcoma phyllodes of the breast: a study of 23 cases. *Breast J* 2002;8:376-81
- 211- Maeda H, Yamagata A, Nishikawa S. Requirement of c-Kit for development of intestinal pacemaker system. *Development* 1992;116:369-75
- 212- Huizinga JD, Thuneberg L, Kluppel M *et al.* W/kit gene required for interstitial cells of Cajal and for intestinal pacemaker activity. *Nature* 1995;373:347-9
- 213- Hirota S, Okazaki T, Kitamura Y *et al.* Cause of familial and multiple gastrointestinal autonomic nerve tumors with hyperplasia of interstitial cells of Cajal is germline mutation of the c-Kit gene (letter). *Am J Surg Pathol* 2000;24:326-7
- 214- Nishida T, Hirota S, Taniguchi M. Familial gastrointestinal stromal tumours with germline mutation of the KIT gene. *Nat Genet* 1998;19:323-4
- 215- Miyaki M. Mechanism of carcinogenesis by germline mutations of protooncogene in hereditary tumors. *Nippon Rinsho* 2000 ;58:1225-30
- 216- Chen MC, Cheng JC, Chun LC *et al.* CD34, CD117, and actin expression in phyllodes tumor of the breast. *J Surg Res* 2000;94:84-91
- 217- Aranda FI, Laforfa JB, Lopez JI. Phyllodes tumor of the breast. An immunohistochemical study of 28 cases with special attention to the role of myofibroblasts. *Pathol Res Pract* 1994;190:474-81
- 218- Roberts MM, Swart BW, Simmons PJ *et al.* Prolonged release and c-Kit expression of haemopoietic precursor cells mobilized by stem cell factor and granulocyte colony stimulating factor. *Br J Haematol* 1999;104:778-84
- 219- Horvai AE, Li L, Xu Z *et al.* C-Kit is not expressed in malignant mesothelioma. *Mod Pathol* 2003;16:818-22
- 220- Di Matteo G, Pescarmona E, Peparini N *et al.* Histopathological features and clinical course of the gastrointestinal stromal tumors. *Hepatogastroenterology* 2002; 49:1013-6

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 221- Nishida T, Yasumasa K. Target-based therapy against gastrointestinal stromal tumors: from molecular diagnosis to molecular target therapy. *Gain to Kagaku Ryoho* 2003;30:1071-8
- 222- Heinrich MC, Corless CL, Duensing A *et al.* PDGFRA activating mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Science* 2003; 299:708-710
- 223- Hirota S, Ohashi A, Nishida T *et al.* Gain-of-function mutations of platelet-derived growth factor receptor alpha gene in gastrointestinal stromal tumors. *Gastroenterology* 2003;125:660-7
- 224- Shao ZM, Nguyen M, Barsky SH. Human breast carcinoma desmoplasia is PDGF initiated. *Oncogene* 2000;19:4337-45
- 225- Schmitt FC, Figueiredo P, Lacerda M. Expression of c-erbB2 protein and DNA ploidy in breast carcinogenesis. *Arch Pathol Lab Med* 1995;119:815-20

11. RESUMO EM PORTUGUÊS

O cancro de mama é um dos três tipos de cancro mais frequentes na população europeia, sendo responsável por uma incidência de 200000 novos casos oncológicos por ano. Tal como noutro tipo de neoplasias humanas, os receptores tirosina-cínase (RTK) assumem um papel chave na carcinogénese mamária através da constituição de complexos homo-ou heterodiméricos funcionais que apresentam três domínios fundamentais: domínio extracelular de ligação hormonal; domínio transmembranar hidrofóbico; e, finalmente, domínio citoplasmático. O proto-oncogene c-Kit (conhecido igualmente como CD 117) codifica o domínio tirosina-cínase duma proteína transmembranar que funciona como um RTK do tipo III estruturalmente similar ao receptor do factor de crescimento derivado das plaquetas (PDGFR) e ao receptor do factor estimulador de colónias de tipo 1 (CSF1-R). O gene do c-Kit compreende 21 exões localizados no cromossoma 4q12. As tirosina-cínases constituem o domínio intracitoplasmático dos receptores dos factores de crescimento. Nas formas normais destes receptores, a actividade cínase sofre uma activação transitória quando o receptor complexa com o seu factor de crescimento específico. Dá-se, então, uma dimerização do receptor seguida por uma fosforilação pela tirosina de vários substratos incluídos na cascata da indução do ciclo celular. Nas neoplasias humanas a activação persistente da tirosina-cínase do RTK torna desnecessária a ligação deste ao seu ligando correspondente, conduzindo a uma estimulação contínua do sinal proliferativo nas células neoplásicas. No tecido mamário normal, a interacção do c-Kit com o seu ligando SCF activa duas vias de transdução do sinal, nomeadamente a via do Ras-MAP cínase e a via do fosfatidil-inositol-3-cínase (PI3 cínase). Dessa forma, aumenta a resposta a dois factores de crescimento: o factor de crescimento epidérmico (EGF) e a alfa-herregulina (α -HER). Em carcinomas mamários está descrita perda de expressão do c-Kit, encontrando-se a alteração da transição epitélíomesenquimatosa (EMT) associada ao aparecimento de um comportamento invasor. Esta EMT, cuja ligação e interdependência com a expressão de c-Kit começa a ser esclarecida, é sede de múltiplas neoplasias mamárias, entre as quais se incluem os tumores filóides (TF) da mama. Mutações activadoras do c-Kit foram demonstradas na mastocitose, nos tumores estromais gastrointestinais (GIST) e mais recentemente no seminoma. Sabe-se já, ainda, que os dois tipos de mutações activadoras do c-Kit (mutações do "tipo regulador" e do "tipo *locus* enzimático") respondem de forma diferente aos inibidores do c-Kit, pelo que se torna necessária, por forma a orientar a terapêutica, a classificação dos doentes com base na mutações específicas de cada indivíduo. O estudo da expressão do c-Kit em neoplasias frequentes e com alta taxa de mortalidade como o cancro da mama pode indicar futuros caminhos terapêuticos para um grande número de doentes. O objectivo principal deste trabalho foi o de estudar a expressão do proto-oncogene c-Kit (CD117) em lesões benignas e malignas de mama. Os objectivos secundários foram: estudar as diferenças de expressão de c-Kit entre patologias benigna e maligna de mama; analisar o local de expressão celular de c-Kit; avaliar o papel desempenhado pelo c-Kit nos diferentes subtipos de carcinoma de mama (*in situ*/invasor); correlacionar a expressão de c-Kit com os parâmetros clínico-patológicos de carcinoma invasor de mama; identificar na patologia mamária potenciais alvos terapêuticos dos inibidores tirosina-cínase. Nesse sentido, procedemos a um estudo retrospectivo de 55 casos diagnosticados e arquivados no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital de S.João, compreendendo 20 lesões benignas e 35 lesões malignas de mama (incluindo 5 tumores filóides malignos de baixo grau, 10 carcinomas ductais *in situ*, 10 carcinomas ductais invasores sem outra especificação e, ainda, 10 carcinomas ductais invasores de outros tipos histológicos). O principal resultado obtido consistiu na observação de perda de expressão contínua de c-Kit quando "transitamos" da patologia benigna para o CDIS, deste para o carcinoma invasor com componente *in situ* e, ainda, finalmente, quando transitamos deste último para o carcinoma invasor sem componente *in situ*. A perda de expressão de c-Kit observada neste estudo nos casos de carcinoma mamário corrobora estudos anteriores e indica que, com probabilidade, durante a

transformação maligna do epitélio mamário outros factores de crescimento concorrem para a diminuição de expressão do c-Kit; a ausência de imunoreactividade do c-Kit observada nos carcinomas estudados pode, com igual probabilidade, nalguns casos ter sido devida à presença de proteína resultante de c-Kit mutado não detectada pelo anticorpo monoclonal utilizado. A perda contínua de expressão de c-Kit evidenciada neste trabalho quando "transitamos" do carcinoma intraductal para o carcinoma invasor poderá significar que uma proporção dos carcinomas mamários invasores estudados pelo nosso grupo evoluem sem passagem por uma fase intraductal ou, em alternativa, não se relacionam com alterações da expressão génica no *locus* do c-Kit. Outra possibilidade explicativa consiste em alguns dos carcinomas mamários intraductais do presente estudo representarem um estadio final de evolução da carcinogénese mamária, sem que se verifique, posteriormente, a aquisição de propriedades invasoras. O subtipo histológico de carcinoma invasor de mama não se correlacionou positivamente com o padrão de expressão observado no c-Kit. O estudo efectuado não demonstrou uma associação estatisticamente significativa entre a expressão imuno-histoquímica de c-Kit e os parâmetros clínico-patológicos estudados. A imunoreactividade citoplasmática predominante do c-Kit observada na generalidade dos casos estudados pode dever-se a excesso de internalização da proteína KIT ou, em alternativa, a síntese anómala da proteína KIT que, impedida de alcançar a sua localização transmembranar, sofre acumulação no citoplasma. A imunolocalização nuclear do c-Kit observada numa minoria dos casos estudados poderá não corresponder a expressão do gene c-Kit mas, pelo contrário, representar, nalguns casos, reacção cruzada do anticorpo anti-c-Kit IgG utilizado contra determinadas proteínas nucleares. O aumento de expressão estromal de c-Kit observada neste estudo nos tumores filóides malignos de baixo grau, ao permitir uma associação da expressão do c-kit com o potencial maligno dos tumores filóides da mama, corrobora dados muito recentemente obtidos noutro estudo que apontam, nestas neoplasias, para uma sobreexpressão estromal de c-Kit.

Breast cancer is one of the three most prevalent cancers in Europe, with an estimated incidence of 200000 new cases per year. As in other human cancers tyrosine-kinase receptors (RTK) play a major role on breast carcinogenesis through the constitution of homo- or heterodimeric functional complexes which have three essential components: extracellular hormone-binding domain; transmembrane hydrophobic domain; and, finally, cytoplasmatic domain. The proto-oncogene c-Kit (also known as CD 117) codifies the tyrosine-kinase domain of a transmembrane protein which represents a type III tyrosine-kinase similar in structure to platelet-derived growing factor receptor (PDGFR) and to colony stimulating factor type 1 (CSF1-R). This RTK includes 21 exons located in chromosome 4q12. The tyrosine-kinases constitute the intracytoplasmatic domain of the growing factor receptors. In the normal type of these receptors, kinase function is temporarily activated whenever the receptor complexes with its specific growing factor. As a result, there is a dimerization of the receptor followed by a phosphorylation promoted by the tyrosine of several substrates included in the cell cycle induction cascade. In human neoplasias the persistent activation of the tyrosine-kinase of RTK brings the binding of RTK with its ligand unnecessary and continuously stimulates proliferative signaling on neoplastic cells. In normal mammary tissue, interaction of c-Kit with its ligand SCF activates two transduction signaling pathways, namely the Ras-MAP kinase pathway and the PI3 kinase. In that way, the response to two growing factors - EGF and α -HER - increases. In breast carcinomas the loss of expression of c-Kit is described and the alteration of the epithelial-mesenchymatous transition (EMT) is associated with the acquisition of invasive features. Precisely this EMT, whose connection with the expression of c-Kit begins to be thoroughly studied, is the place of different kinds of breast neoplasias, including the entity known as phyllodes tumour (TF) of the breast. Activating mutations of c-Kit have been described in mastocytosis, in gastrointestinal stromal tumours (GIST) and, more recently, in seminoma. It is already understood that these two types of activating mutations (regulator type and enzymatic *locus* type) differently respond to c-Kit inhibitors, and, accordingly, a patients' classification based on the specific mutations of each individual is required, in order to give them appropriate therapy. Studying, as in the case of breast cancer, the expression of c-Kit in usual and highly lethal neoplasias can reveal new therapeutical pathways directed to a large number of patients. The main aim of the present study was to study the expression of c-Kit in benign and malignant lesions of the breast. The secondary goals were to study the differences of expression of c-Kit between benign and malignant lesions of the breast, analyse the immunolocalization of c-Kit, analyse the role played by c-Kit in different subtypes of breast carcinoma, correlate c-Kit expression with the clinico-pathological parameters of invasive carcinoma, and, finally, to identify a potential target-population to selective tyrosine-kinase inhibitors. To accomplish that task, we studied (in a retrospective way) 55 cases, which were diagnosed and archived in the Surgical Pathology Department of São João Hospital in Oporto and included 20 benign lesions and 35 malignant lesions (including 5 malignant phyllodes tumours, 10 *in situ* ductal carcinomas, 10 invasive ductal carcinomas non-other-specified, and, finally, 10 invasive ductal carcinomas of other histological types). The main result obtained during this study was the observation of a continuous loss of expression of c-Kit from benign pathology to *in situ* carcinoma, *in situ* carcinoma to invasive carcinoma with *in situ* component, and, finally, invasive carcinoma with *in situ* component to invasive carcinoma without *in situ* component. The loss of expression of c-Kit observed in this study corroborates previous studies and indicates that, in probability, during the malignant transformation of mammary epithelium other growing factors contribute to this reduction in c-Kit expression. The absence of immunoreactivity to c-Kit observed in studied carcinomas can also be attributed, in some cases, to the presence of protein codified by mutated c-Kit, which was undetected by the monoclonal antibody used. The continuous loss of expression of c-Kit observed in this study whenever intraductal carcinoma converts

into invasive carcinoma may well represent that a significant proportion of invasive carcinomas evolve without a previous intraductal phase or, alternatively, do not relate with genetic expression alterations of the c-Kit locus. Another possibility resides in the fact that a considerable number of intraductal carcinomas represent a final evolution step in breast carcinogenesis, without posterior acquisition of invasive properties. On the other hand, in the present study the histological subtype of invasive carcinoma did not correlate positively with the pattern of expression of c-Kit. This present study did not show, as well, a statistically significant association between the immunohistochemical expression of c-Kit and the different clinico-pathological parameters studied. In general, the predominant cytoplasmatic immunoreactivity observed in the great majority of cases, can be attributed to an excessive internalization of KIT protein or, in an alternative way, to an anomalous synthesis of KIT protein, which, prevented from reaching its transmembranar position, suffers a cytoplasmatic accumulation. The nuclear immunolocalization of c-Kit observed in a minority of cases studied may, in fact, represent a cross-reaction of the anti-c-Kit IgG antibody which was used, and not a specific pattern of expression of the proto-oncogene c-Kit. The increase in the stromal expression of c-Kit observed in the present study in low-grade malignant phyllodes tumors, reassures a possible association of c-Kit with the malignant potential of phyllodes tumors of the breast and confirms quite recent data which indicate a stromal overexpression of c-Kit in these type of tumors.

Anexo 1: Resultados descritivos da imunoreactividade "para" c-Kit das 55 lesões mamárias estudadas

BENIGNO	TIPO	GRADAÇÃO EPITELIAL	GRADAÇÃO ESTROMAL	EPITÉLIO N	MASTÓCITO	OBSERVA.	LOCALIZAÇÃO
CASO 1	Papilomas múltiplos	3+	1+	EN +	M+		C
CASO 2	Adenose	1+	0	EN +	M+		C e N
CASO 3	Tumor adenósico	3+	0	EN +/-	M+		C e N
CASO 4	Tumor adenósico	2+	1+	EN +	M+		N
CASO 5	Papilomas múltiplos	2+	0	EN +	M+		N
CASO 6	Adenose	3+	0	Não tem	M+	Alterações lactacionais	C e N
CASO 7	Fibroadenoma	1+	2+	Não tem	M-	Estroma subepitelial	N
CASO 8	Fibroadenoma	1+	2+	EN +	M+		C e N
CASO 9	Tumor adenósico	3+	0	EN -	M+		C
CASO 10	Adenose	3+	1+	EN +	M+	Metaplasia apócrina	C e N
CASO 11	Filóide	3+	3+	EN+	M+		CeN
CASO 12	Filóide	3+	3+	EN-	M+	Estroma subepitelial	Ce N
CASO 13	Filóide	2+	3+	Não tem	M-		C e N
CASO 14	Filóide	1+	0	EN-	M+	Estroma mixóide	
CASO 15	Filóide	3+	0	EN-	M+		C
CASO 16	Filóide	1+	0	EN+	M+		
CASO 17	Filóide	2+	0	EN-	M+		C
CASO 18	Filóide	3+	2+	Não tem	M-		N
CASO 19	Filóide	2+	0	Não tem	M-		N
CASO 20	Filóide	1+	0	EN+	M+		
FILÓIDE MALIGNO							
CASO 21	Bx grau	1+	3+	EN-	M+	Estroma subepitelial	C e N
CASO 22	Bx grau	0	2+	EN-	M+		N
CASO 23	Bx grau	0	3+	Não tem	M-	Estroma subepitelial	N
CASO 24	Bx grau	1+	3+	EN-	M+		N
CASO 25	Bx grau	0	2+	EN+	M-	Estroma subepitelial	N
CDIS							
CASO 26	Grau intermédio	0	0	EN +	M+		
CASO 27	Alto grau	0	0	EN +	M+		
CASO 28	Alto grau	0	0	EN +	M+		
CASO 29	Alto grau	1+	0	EN +	M+		N
CASO 30	Alto grau	0	0	EN +	M+		
CASO 31	Grau intermédio	0	0	EN +	M+		
CASO 32	Alto grau	0	0	EN +	M+		
CASO 33	Alto grau	1+	0	EN +	M+		C

13. ANEXO 1

CASO 34	Alto grau	2+	0	EN +	M+		C
CASO 35	Alto grau	2+	0	EN +	M+		N
CDISOE							
CASO 36	Mais CDIS	2+	0	EN +	M+	Positivo N	N
CASO 37	Mais CDIS	0	0	EN +	M+	Negativo	N
CASO 38	Mais CDIS	0	0	EN +/-	M+	Positivo N	N
CASO 39	Mais CDIS	1+	0	EN -	M+	Não tem	N
CASO 40		0	0	EN +	M+	Não tem	
CASO 41		0	0	EN +	M+	Negativo	
CASO 42		0	0	EN +/-	M+	Não tem	
CASO 43	Mais CDIS	0	0	EN +	M+	Negativo	
CASO 44		1+	0	Não tem	M+	Não tem	N e C
CASO 45	Mais CDIS	0	0	EN -	M+	Positivo N	N
CDIO							
CASO 46	Endócrino	1+	0	EN -	M+	Negativo	C
CASO 47	Mucinoso	1+	0	EN -	M+	Não tem	N
CASO 48	Micropapilar	1+	0	EN -	M+	Negativo	N
CASO 49	Tubular	0	0	EN -	M+	Não tem	
CASO 50	Escamoso	1+	0	EN -	M+	Não tem	N
CASO 51	Medular	0	0	EN +	M+	Não tem	
CASO 52	Atípico Lobular	0	0	EN -	M+	Não tem	
CASO 53	Tubular	0	0	EN +	M+	Não tem	
CASO 54	Micropapilar	0	0	EN +	M+	Negativo	
CASO 55	Metaplásico	1+	1+	EN +	M+	Não tem	C e N