

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

Dissertação de Mestrado

IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA Ep-CAM EM PACIENTES COM CARCINOMAS
MAMÁRIOS

JUNELLE PAGANINI

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vera Aparecida Saddi

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres

Goiânia – GO

2012

PONTIFÍCA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

IMUNODETECÇÃO DA PROTEÍNA Ep-CAM EM PACIENTES COM CARCINOMAS
MAMÁRIOS

JUNELLE PAGANINI

Dissertação de Mestrado apresentada ao programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como requisito parcial para obtenção de Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Vera Aparecida Saddi

Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres

Goiânia – GO

2012

Paganini, Junelle.

P129i Imunodeteccção da proteína Ep-CAM em pacientes com
carcinomas mamários [manuscrito] / Junelle Paganini. – 2012.
86 f. ; il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2012.

“Orientadora: Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi”.

“Co-orientador: Prof. Dr. Flávio Monteiro Ayres”.

1. Mamas - Cancer. 2. Imunohistoquímica. 3. Ep-CAM -
Proteína. I. Título.

CDU: 618.19-006(043)



**PUC
GOIÁS**

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

Av. Universitária, 1087 - Setor Universitário
Cidade Postal 05 - CEP 74805-010
Goiânia - Goiás - Brasil
Fone: (62) 3046.1070 - Fax: (62) 3046.1070
www.pucgoias.edu.br - propp@pucgoias.edu.br

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
DEFENDIDA E APROVADA EM 01 DE JUNHO DE 2012
PELA BANCA EXAMINADORA COM CONCEITO A**

Vera Aparecida Saddi

Prof.ª Dr.ª Vera Aparecida Saddi - PUC Goiás
(presidente-orientadora)

Flávio Monteiro Ayres

Prof.º Dr. Flávio Monteiro Ayres / UEG
(co-orientador)

Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva

Prof.º Dr. Antonio Márcio Teodoro Cordeiro Silva / PUC Goiás
(membro interno)

Silvia Helena Rabelo Santos

Prof.ª Dr.ª Silvia Helena Rabelo Santos / UFG
(membro externo)

“Não deixe que o barulho da opinião dos outros cale a sua própria voz interior. Tenha coragem de seguir o seu próprio coração e sua intuição. Eles de alguma maneira já sabem o que você realmente quer se tornar. Todo o resto é secundário.”

Steve Jobs.

Dedico este trabalho...

Aos meus pais Julio Filho e Vera Lúcia, aos meus irmãos Junyce e Julio Netto, à minha tia Joana, à minha avó Terezinha e ao meu namorado Thiago Lopes pelo apoio, carinho e amor incondicional. Dedico também a todos os profissionais que se dedicam à pesquisa em nosso país, que assim como eu sabem das dificuldades e da importância desse trabalho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora Dra. Vera Saddi, que durante esses oito anos me ensinou muito, que além de orientadora, professora, amiga foi como uma mãe. Sempre presente desde a minha iniciação científica guiando meus passos e sem ela não chegaria tão longe com êxito.

À minha mãe Vera Lúcia, que me apoiou e estimulou a fazer o mestrado, além de ter feito a leitura e correção e que sempre está ao meu lado em todas minhas decisões.

À minha tia Joana, sem o apoio e ajuda dela não conseguiria nem ter feito a faculdade de Biomedicina.

Ao meu pai Julio Filho, que me ajudou de todas as formas que poderia, me levando e buscando nos hospitais e bibliotecas, com seu carinho e compreensão sempre e que, como minha mãe e meus irmãos, é minha base para tudo.

Ao meu namorado Thiago, que além da paciência para entender a importância deste trabalho pra mim, também se dedicou junto comigo neste projeto, ajudando desde completar os dados do banco, separar prontuários e lâminas, procurar e abrir arquivos para a referência bibliográfica do trabalho e formatar o trabalho. E que além de tudo sempre me apoia e auxilia em todos meus sonhos e projetos.

Ao grande amigo Gustavo, que me ajudou a dar continuidade no projeto, sempre me orientando e conversando e poderia ser até considerado carinhosamente o meu co-orientador. E as colegas e amigas Rosana e Carla que colaboraram com a parte prática do trabalho e foram grandes companheiras de conversas, ensinamentos e experiências neste período.

Ao colega Abadio Júnior que me auxiliou tantas vezes, com as análises dos prontuários e a conseguir os laudos para a pesquisa.

À equipe do Setor de Anatomia Patológica do HAJ que sempre me recebeu muito bem e me auxiliou no trabalho em cada detalhe das etapas.

À Dra Rita, que com seu jeito tão carinhoso e dedicado me auxiliou nas análises imunohistoquímicas e com ela aprendi muito e ao Dr Ailton que sempre paciente também auxiliou na leitura das lâminas.

Ao colega e amigo Diego Franciel que sempre tão prestativo e dedicado ajudou nas análises estatísticas e em trabalhos enviados para eventos científicos.

Aos colegas João Luiz e Reyner, pela colaboração essencial na coleta dos dados.

À amiga e colega de faculdade e mestrado Samara, que como uma irmã me ajudou em todas as etapas, desde a seleção do mestrado, as disciplinas, os seminários, o laboratório e as conversas e desabafos nas horas que pareciam que iria dar tudo errado.

À minha amiga e segunda irmã Caroline Steglich, que me ajudou tanto no mestrado quanto na Santa Casa, me auxiliando sempre que precisei.

Ao amigo Milton, que me auxiliou na busca pelos artigos científicos da revisão bibliográfica do trabalho.

Ao professor Antonio Marcio que através dele conheci a professora Vera e cheguei até aqui e que me auxiliou muito neste trabalho com a parte de estatística e nos resumos mandados para congressos.

Aos colegas da turma 2009 do mestrado, que adorei conhecer e conviver.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	08
LISTA DE TABELAS E ANEXOS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	13
ABSTRACT	14
I – CÂNCER DE MAMA	15
1 – Epidemiologia	15
2 – Fatores de Risco	16
3 – Histologia do Câncer de Mama	19
4 – Fatores Prognósticos	21
5 – Estadiamento Clínico	22
6 – Imunoistoquímica	28
7 – Câncer de Mama Triplo-Negativo	29
II – CARACTERÍSTICAS DE Ep-CAM	33
1 – Gene	33
2 – O Transcrito de Ep-CAM	34
3 – A proteína Ep-CAM	35
4 – Ep-CAM e Câncer	39
5 – Ep-CAM E Câncer de Mama	40
III – JUSTIFICATIVAS	43

IV – OBJETIVOS	44
1 – Objetivo Geral	44
2 – Objetivos Específicos	44
V – METODOLOGIA	45
1 – Seleção das pacientes com carcinomas mamários	45
2 – Espécimes Biológicos	46
3 – Imunoistoquímica e Avaliação da proteína Ep-CAM	46
VI – ANÁLISE ESTATÍSTICA	48
VII – ASPECTOS ÉTICOS	48
VIII – RESULTADOS	49
1 – Dados Clinicopatológicos	49
2 – Avaliação dos Marcadores Imunoistoquímicos	56
3 – Análise da Sobrevida	58
3.1 – Sobrevida Global	58
3.2 – Sobrevida e tamanho dos tumores	59
3.3 – Sobrevida e comprometimento linfonodal	60
3.4 – Sobrevida e estadiamento clínico	61
3.5 – Sobrevida e metástases à distância	62
3.6 – Sobrevida e marcadores imunoistoquímicos	63
3.7 – Sobrevida e expressão de Ep-CAM	64
4 – Associações entre Imunodeteção da superexpressão de Ep-CAM e os Parâmetros Clinicopatológicos	65

IX – DISCUSSÃO	67
X – CONCLUSÕES	72
XI – CONSIDERAÇÕES FINAIS	73
XII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	74
XIII – ANEXOS	84
1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	84
2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa	86

LISTAS DE FIGURAS

FIGURA 1 – Modelo esquematizado do Gene <i>GA733-2</i>	34
FIGURA 2 – Modelos estruturais da proteína Ep-CAM	36
FIGURA 3 – Níveis de expressão da proteína Ep-CAM em relação à proporção e intensidade de marcação imunoistoquímica	48
FIGURA 4 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a faixa etária (anos)	49
FIGURA 5 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o status menopausal	50
FIGURA 6 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com estadiamento clínico	50
FIGURA 7 – Distribuição dos casos de carcinomas mamários de acordo com o comprometimento linfonodal axilar	51
FIGURA 8 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a presença metástase à distância	52
FIGURA 9 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com os locais de metástase à distância	52
FIGURA 10 – Distribuição dos casos de carcinomas mamários de acordo com o tamanho tumoral (cm)	53
FIGURA 11 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o grau de anaplasia do tumor	54
FIGURA 12 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o tipo histológico	55
FIGURA 13 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteção da Proteína Ep-CAM	56

FIGURA 14 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteção de receptores hormonais e HER2	57
FIGURA 15 – Sobrevida global em cinco anos para as pacientes estudadas	58
FIGURA 16 – Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com os diferentes tamanhos dos tumores	59
FIGURA 17 – Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o número e o comprometimento linfonodal axilar	60
FIGURA 18 – Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o estadiamento clínico	61
FIGURA 19 – Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com a presença de metástases à distância	62
FIGURA 20– Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com <i>status</i> de RE, RP e HER2	63
FIGURA 21 – Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com a imunexpressão da proteína Ep-CAM	64

LISTAS DE TABELAS

TABELA 1 – Classificação dos tumores de mama segundo estágio clínico 24

TABELA 2 – Associações entre a imunodeteção da superexpressão de Ep-CAM e os parâmetros clinicopatológicos 65

ANEXOS

ANEXO 1 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido 83

ANEXO 2 – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCG – Associação de Combate ao Câncer em Goiás

Bcl-2 – do inglês *B-cell lymphoma 2*

BP – fenótipo basal

BRCA1 – Gene supressor de tumor “*breast cancer type I*”

cDNA – ácido desoxirribonucléico complementar

CEPACCG – Comitê de Ética em Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás

DNA – ácido desoxirribonucléico

EGFR – receptor do fator de crescimento epidérmico

Ep-CAM – Molécula de adesão celular epitelial

ESA – do inglês *Epithelial Specific Antigen*

GO – Goiás

H AJ – Hospital Araújo Jorge

HER2 – do inglês “*Human Epidermal growth factor Receptor-type 2*”

HPR – do inglês *horseradish-peroxidase*

IARC – do inglês *International Agency for Research on Cancer*

IEP – Instituto de Ensino e Pesquisa

IHQ – Imunoistoquímica

INCA – Instituto Nacional do Câncer

Kb – Kilobase

Kda – Kilodalton

Ki-67 – Marcador celular de proliferação (Kiel-cidade de origem, xiv 67-clone original)

M – Metástase

mAB – anticorpo monoclonal

mRNA – ácido ribonucléico mensageiro

N – Linfonodos

NBP – fenótipo não-basal

OMS – Organização Mundial de Saúde

p53 – Proteína p53

Pb – pares de base

PCR – Reação em Cadeia de Polimerase

Rb – Gene do retinoblastoma

RCBPGO – Registro de Câncer de Base Populacional de Goiânia

RE – receptor de estrógeno

RP – receptor de progesterona

siRNA – pequenos ácidos ribonucléicos de interferência

SNC – Sistema Nervoso Central

T – Tumor

TACSTD1 – do inglês *tumor-associated calcium signal transducer 1*

TICs – células iniciadoras de tumor

TNBC – Câncer de mama triplo-negativo

TSS – sítio de início da transcrição

TY – tireoglobulina

UICC – União Internacional Contra o Câncer

UOA – Unidade Oncológica de Anápolis

RESUMO

O câncer de mama afeta mais de um milhão de mulheres em todo o mundo, e cerca de 400.000 pacientes morrem devido a esta doença a cada ano. Essa patologia vem atingindo progressivamente um número maior de mulheres, em faixas etárias mais baixas e a mortalidade também é crescente no Brasil. Diversos estudos sobre câncer de mama analisam a expressão e as possíveis rotas de sinalização celular da molécula de adesão celular epitelial (Ep-CAM). Ep-CAM é uma das proteínas mais amplamente investigadas em cânceres humanos. Por conta de seu alto nível de expressão em vários carcinomas, é um potencial alvo para o diagnóstico e terapia tumoral. O objetivo deste estudo foi avaliar as possíveis associações entre a superexpressão da proteína Ep-CAM e os aspectos clínicos e histopatológicos de 239 pacientes com carcinomas mamários. A superexpressão de Ep-CAM foi observada em 96 tumores (40%), a baixa expressão em 66 (28%), a ausência da expressão da proteína em 66 tumores (28%) e 11 (4,6%) casos foram excluídos porque não apresentaram material suficiente para a análise. Os fatores prognósticos que influenciaram a sobrevida global das pacientes foram: o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal, o estadiamento clínico, a presença de metastases à distância, o fenótipo de carcinoma mamário triplo-negativo e a superexpressão da proteína Ep-CAM. A superexpressão da proteína Ep-CAM associou-se de forma significativa com pior sobrevida global em cinco anos, com a ausência de receptores hormonais (estrógeno e progesterona), com o fenótipo triplo-negativo e com a ausência de metastase à distância. Com base nos resultados, sugere-se que a superexpressão de Ep-CAM seja considerada como potencial marcador prognóstico em carcinomas mamários, possibilitando escolhas terapêuticas mais adequadas para pacientes diagnosticadas com câncer de mama.

Palavras-chave: Ep-CAM, câncer de mama, imunohistoquímica.

ABSTRACT

Breast cancer affects more than one million women worldwide and about 400,000 patients die each year due to this illness. Breast cancer has progressively affected a larger number of young women and mortality is also increasing in Brazil. For about two decades, several studies on breast cancer focused the expression and the possible cellular pathways of the epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM). Ep-CAM is one of the most completely investigated proteins in human cancers. Because of its high expression in various carcinomas, Ep-CAM is a potential target for tumor diagnosis and therapy. The objective of this study was to investigate the associations between Ep-CAM protein overexpression and the clinical and pathological features of a group comprising 239 patients with breast carcinomas. Ep-CAM overexpression was observed in 96 tumors (40%), reduced expression was detected in 66 tumors (28%) and 66 tumors (28%) did not express Ep-CAM protein. Eleven cases (4.6%) were excluded from the group, because the material was not sufficient for analysis. Prognostic factors that significantly influenced overall survival of the patients included: tumor size, lymph node metastasis, clinical staging, the presence of distant metastasis, the triple negative phenotype and Ep-CAM overexpression. Ep-CAM overexpression was also significantly associated with a worse five years overall survival, with the absence of hormone receptors (estrogen and progesterone), the triple-negative phenotype and with the presence of distant metastasis. Based on the results, we suggest that Ep-CAM overexpression might be considered as a potential prognostic marker in breast carcinomas, allowing more appropriate therapeutic choices for the patients.

Keywords: Ep-CAM, breast cancer, immunohistochemistry.

I – CÂNCER DE MAMA

1 – Epidemiologia

O câncer de mama afeta mais de 1 milhão de mulheres em todo o mundo e cerca de 400.000 pacientes morrem devido a esta doença a cada ano. Mundialmente, é o câncer mais frequente em mulheres e representa a segunda principal causa de morte por câncer na população feminina (Sandhu *et al.*, 2010), respondendo por 22% (1.380.000) do total de novos casos de câncer e 14% (458.400) do total de mortes por câncer em 2008 (Jemal *et al.*, 2011).

Em 2012, esperam-se, para o Brasil, 52.680 casos novos de câncer da mama, com um risco estimado de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, esse tipo de câncer também é o mais frequente nas mulheres das regiões Sudeste (69/100 mil), Sul (65/100 mil), Centro-Oeste (48/100 mil) e Nordeste (32/100 mil). Na região Norte é o segundo tumor mais incidente (19/100 mil). As estatísticas mostram que no ano de 2012 surgirão mais 1.320 casos novos no Estado de Goiás. De acordo com essa estimativa, o câncer de mama é o terceiro câncer mais incidente no Estado, seguindo o câncer de pele não melanoma e o de próstata. Em Goiânia, 450 novos casos de câncer de mama são estimados para 2012, sendo que o risco previsto é de 64,68 casos para cada 100.000 habitantes (INCA, 2012).

Essa patologia vem atingindo progressivamente um número maior de mulheres, em faixas etárias mais baixas e a mortalidade também é crescente no país. Entre 1979 e 1999, houve um aumento de 69% na taxa bruta de mortalidade por câncer de mama no Brasil (de 5,77 para 9,75 óbitos por 100 mil mulheres/ ano). Dessa maneira, foi considerada a principal neoplasia maligna feminina também em mortalidade, com taxa bruta de mortalidade estimada, em 2003, de 10,40 óbitos por 100 mil mulheres (Sclowitz *et al.*, 2005). Ao longo dos últimos cinquenta anos, a

incidência do câncer de mama tem aumentado dramaticamente, sendo que hoje, uma entre oito mulheres apresenta chance de desenvolver câncer de mama durante a vida (Ellsworth *et al.*, 2010).

Martins *et al.* (2009) analisaram o perfil epidemiológico do câncer de mama na população da cidade de Goiânia (GO) e relataram um aumento do número de casos na ordem de 249%, no quinquênio 1999-2003, quando comparado ao quinquênio 1989-1993. Os autores enfatizaram que esse aumento foi decorrente da melhora nos programas de rastreamento do câncer de mama na população da cidade.

2 – Fatores de Risco

Segundo Berg (1984), os fatores de risco são características individuais dos pacientes que aumentam suas chances de desenvolver câncer de mama acima do nível de risco na população geral. Ele classificou os fatores de risco como genéticos (quando relacionados com história familiar), hormonais (quando relacionados à idade da menarca e da menopausa, paridade e idade ao primeiro parto, etc), nutricionais (incluindo possivelmente os fatores sociais, econômicos e étnicos), morfológicos e relacionados às radiações ionizantes.

O câncer de mama tem uma etiologia multifatorial e é um dos tumores mais estudados em termos de fatores de risco. Estudos epidemiológicos e pesquisas básicas têm identificado uma série de condições que podem predispor ao câncer de mama. Tais pesquisas são fundamentais para o conhecimento da biologia do tumor e para identificar fatores de risco e os hábitos que podem ser alterados ou controlados, na tentativa de diminuir o número de novos casos ou mortes causadas pela doença (Pinho & Coutinho, 2005).

Uma parte dos cânceres de mama é relacionada à ação hormonal. Mulheres sem ovário e que nunca receberam reposição estrogênica dificilmente desenvolvem câncer de mama (Pinho & Coutinho, 2005). Nos estudos de base populacional, fatores relacionados com a exposição aos estrogênios ao longo da vida da mulher, como menarca precoce, menopausa tardia, uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal são associados com um aumento de aproximadamente duas vezes no risco de câncer de mama (Ellsworth *et al.*, 2010). Além desses fatores, nuliparidade e idade da primeira gestação a termo acima de 30 anos também são considerados como fatores de risco (INCA, 2010).

Ao contrário do câncer do colo de útero, o câncer de mama encontra-se relacionado ao processo de industrialização e associado a um elevado *status* socioeconômico, além de outros fatores de risco clássicos descritos, incluindo obesidade, estatura e consumo de álcool. Este tipo de câncer é um importante problema de saúde pública na América Latina, com aumento consistente nas taxas de mortalidade nos últimos quarenta anos (Guerra *et al.*, 2005).

A idade é um dos mais importantes fatores de risco para o câncer de mama. As taxas de incidência aumentam rapidamente até os 50 anos e, posteriormente, esse aumento ocorre de forma mais lenta (INCA, 2010). Outro fator importante é a história familiar. De 5 a 10% dos tumores de mama são considerados hereditários e cerca de 30% das mulheres jovens que desenvolvem câncer de mama são susceptíveis a apresentar um padrão genético de predisposição à doença. Esta hipótese é confirmada pelo fato dessas mulheres desenvolverem carcinomas bilaterais associados com outras neoplasias, como carcinoma de ovário ou do cólon, ou de mostrarem um padrão de herança autossômica dominante (Dufloth *et al.*, 2008).

Os avanços no estudo da genética do câncer de mama, pouco a pouco, contribuíram para uma melhor compreensão do processo biológico que leva uma célula normal da mama ser

transformada em uma célula maligna com poder invasivo e metastático. O portador de mutações germinativas nos genes de susceptibilidade para o câncer de mama, o *brca1* e o *brca2*, está particularmente em maior risco de desenvolver o câncer de mama (Esteves *et al.*, 2009). Mulheres que apresentam mutações nestes genes têm 85% de chance de desenvolver câncer de mama antes dos 70 anos de idade (INCA, 2010).

Pesquisas recentes utilizando perfis de expressão gênica, com o emprego de microarranjos de DNA e, posteriormente, perfis imunohistoquímicos empregando microarranjos de tecido (TMA), permitiram identificar novas categorias de tumores e desenvolver novo esquema de classificação molecular dos carcinomas mamários associados a diferentes cursos clínicos: luminal A (positivos para receptores de estrógeno, RE, e para receptores de progesterona, RP; e negativos para HER2); luminal B (RE+; PR+; HER2+); tumores com superexpressão de HER2 (RE-; RP-; HER2+); tipo basal (triplo-negativos; RE-, RP-, HER2-; e positivos para citoqueratinas basais); não classificável (tumores com negatividade para todos estes marcadores) (De Brot *et al.*, 2009).

Características ambientais, como a dieta e o peso corporal também são amplamente investigados na etiologia do câncer de mama. Populações de países em que a incidência de câncer de mama é baixa e que imigraram para países com incidência mais elevada demonstram que os descendentes começam a apresentar uma incidência semelhante à do país onde residem. Tais observações justificam a hipótese de que os fatores hormonais, reprodutivos e ambientais são tão importantes quanto (ou até mais) os fatores genéticos e também explicam a variação das taxas entre diferentes locais. Isto sugere que o uso de estimativas internacionais de prevalência de fatores de risco para o câncer de mama podem não ser adequadas para a definição de políticas de saúde brasileiras, já que as populações têm características diferentes (Pinho & Coutinho, 2005).

3 – Histologia do Câncer de Mama

A classificação histológica dos tumores de mama é resultante de um consenso, coordenado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (Tavassoli & Devilee, 2003) e classifica os tumores epiteliais em:

- a) Carcinomas ductais invasivos não especificados (40 a 75%);
- b) Carcinomas lobulares invasivos (5-15%);
- c) Carcinomas tubulares (< 2%);
- d) Carcinomas medulares (1-7%);
- e) Carcinomas mucinosos (2%);
- f) Carcinomas micropapilíferos (< 2%);
- g) Outros carcinomas invasivos: cribiforme invasivo, metaplásico, adenóide cístico, sebáceo, neuroendócrino, entre outros;
- h) Lesões *in situ* de mama: incluem a neoplasia lobular *in situ* (1-3,8%) e o carcinoma ductal *in situ* (15-40%).

A maioria dos cânceres de mama acomete as células dos ductos das mamas. Por isso, o tipo histológico mais comum é o carcinoma ductal. Ele pode ser *in situ*, quando não passa das primeiras camadas de células destes ductos, ou invasor, quando invade a camada basal e os tecidos adjacentes. Os cânceres que começam nos lóbulos da mama são chamados de carcinomas lobulares e são menos comuns que o primeiro. Este tipo de câncer muito frequentemente acomete as duas mamas. O carcinoma inflamatório de mama é um câncer mais raro e normalmente se apresenta de forma agressiva, comprometendo toda a mama, deixando-a vermelha, edemaciada e quente (Correa *et al.*, 2010).

O carcinoma invasivo de mama é definido como um grupo de tumores epiteliais malignos caracterizados por invadir o tecido adjacente e ter marcada tendência à metástase à distância. A

grande maioria desses tumores é derivada das células da unidade ducto terminal do lóbulo mamário, que são as células cuboidais luminais secretoras e as células mioepiteliais e/ou basais. Caracterizam-se como neoplasias heterogêneas, com vários subtipos patológicos e diferentes aspectos histológicos, além de apresentações clínicas diferentes com diversas variações de respostas ao tratamento (Vieira, 2008).

Para a classificação pós-cirúrgica do carcinoma de mama, o patologista deve mencionar o grau histológico do tumor:

GI – carcinoma bem diferenciado

GII – carcinoma moderadamente diferenciado

GIII – carcinoma pouco diferenciado

GX – grau histológico impossível de ser avaliado

Ao graduar os carcinomas em três grupos, são separados os tumores de possível comportamento biológico mais favorável (grau I) e os de provável diagnóstico desfavorável (grau III) daquele do grupo intermediário (grau II), cujo comportamento é difícil de ser previsto.

O grau citológico ou nuclear, de acordo com Bloom e Black, é o oposto do grau histológico:

Grau 1 – carcinomas anaplásicos, com intensa atipia nuclear e numerosas mitoses.

Grau 2 – moderada atipia nuclear

Grau 3 – leve atipia nuclear, raras mitoses (Alvarenga, 1980).

O grau histológico é aplicável somente ao carcinoma ductal invasivo, enquanto o grau nuclear pode ser determinado em todos os tipos histológicos. O grau histológico tende a aumentar junto com o tamanho tumoral e o acometimento linfonodal, com importante influência negativa no prognóstico (Rakha, 2010).

4 – Fatores Prognósticos

Apesar de ser considerado um câncer relativamente de bom prognóstico, quando diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade por câncer de mama continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estágios avançados. Na população mundial, a sobrevida média após cinco anos é de 61%, sendo que para países desenvolvidos essa sobrevida aumenta para 73%. Já nos países em desenvolvimento, fica em torno de 57% (INCA, 2010).

Os estudos são divergentes quando descrevem a idade como fator prognóstico independente para o câncer de mama, associando-o a um pior prognóstico. Entretanto, carcinomas mamários invasores que ocorrem em pacientes jovens (definidas com idade até 40 anos) geralmente apresentam características clínicas e patológicas associadas à doença mais agressiva, com maior risco de recidiva locorregional e morte, do que tumores em mulheres na pós-menopausa (com mais de 50 anos). Em mulheres jovens, os tumores são geralmente de alto grau, com alta taxa de proliferação, maior invasão vascular, mais linfonodos comprometidos e maior número de recorrências. Frequentemente, não expressam receptores hormonais e apresentam altas taxas de recorrência local e metástases à distância (Dutra *et al.*, 2009).

A ocorrência de câncer de mama em mulheres jovens é um evento raro. Cerca de 6,5% dos casos desta neoplasia ocorrem em mulheres com menos de 40 anos e 0,6%, em mulheres com menos de 30 anos. Em algumas séries de casos, vários fatores clínicos e epidemiológicos de mau prognóstico são associados às faixas etárias mais baixas (Clagnan *et al.*, 2008).

Apesar de vários estudos enfatizarem a contribuição de diversos fatores na sobrevida do câncer de mama feminino, o efeito de alguns desses no prognóstico da patologia permanece ainda incompreendido, tais como fatores étnicos-raciais, idade ao diagnóstico, história familiar da doença, estilos de vida e *status* sócio-econômico, entre outros (Guerra, 2009).

A caracterização patológica dos carcinomas de mama inclui uma série de variáveis, considerando a arquitetura tecidual, a diferenciação celular, o tamanho e a presença de metástase local ou à distância. Tais variáveis influenciam a progressão da doença, a avaliação de risco e o prognóstico. Outras variáveis, incluindo a expressão do receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e o receptor do fator de crescimento epidérmico 2 (HER2) variam amplamente entre os pacientes com câncer de mama e, portanto, são avaliados rotineiramente para determinar o tratamento mais eficaz (Perou *et al.*, 2000).

Sob o ponto de vista molecular, o câncer de mama apresenta uma grande variabilidade, com pelo menos cinco subtipos de tumores identificados por padrões de expressão gênica. Em mulheres com câncer de mama, a heterogeneidade molecular da doença pode acarretar resultados clínicos muito variáveis, embora as pacientes recebam tratamentos idênticos (Ellsworth *et al.*, 2010). Com o desenvolvimento de métodos de avaliação simultânea de múltiplos genes, como o de microarranjos de DNA, foi possível a identificação de diferentes grupos de câncer de mama segundo os perfis de expressão gênica, incluindo os luminais A e B, HER2, basal-simile e mama normal (Bacchi *et al.*, 2009).

5 – Estadiamento Clínico

O Sistema TNM foi idealizado nos anos 1940 e adotado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) nos anos 1950. Desde então, vem sendo continuamente revisado e publicado, estando em sua 6ª edição, de 2002, com a versão em Português Brasileiro datado em 2004 (Gadelha *et al.*, 2005). Três componentes principais são considerados para o estadiamento clínico: características do tumor primário, características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza e presença ou ausência de metástases à distância. Nesta classificação o “T” representa o tamanho ou o volume do tumor primário, com subcategorias que

variam de T0 a T4; o “N” indica a condição dos linfonodos regionais, com subcategorias que variam de N0 a N3, expressando o nível de evolução do tumor e dos linfonodos comprometidos; e o “M” indica a presença ou ausência de metástases à distância, com as subcategorias M1 ou M0, respectivamente. O símbolo “X” é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada. Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, formam-se os estádios que, geralmente, variam de 0 a IV, com subclassificações A, B e C, em alguns estádios, para expressar o nível de evolução da doença. Foram consideradas as seguintes categorias de estadiamento: estágio 0, estágio I, estágio II, estágio III e estágio IV. Segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde, foram considerados em estágio avançado os casos com doença nos estádios III e IV (Thuler & Mendonça, 2005). A Tabela 1 descreve as características do modelo TNM.

Tabela 1: Classificação dos tumores de mama segundo estadiamento clínico

<i>TNM – 6ª EDIÇÃO</i>	<i>GRUPAMENTO POR ESTÁDIOS</i>
<i>Estádio 0</i>	Tis, N0, M0
<i>Estádio I</i>	T1*, N0, M0
<i>Estádio IIA</i>	T0, N1, M0 T1*, N1, M0 T2, N0, M0
<i>Estádio IIB</i>	T2, N1, M0 T3, N0, M0
<i>Estádio IIIA</i>	T0, N2, M0 T1*, N2, M0 T2, N2, M0 T3, N1, N2, M0
<i>Estádio IIIB</i>	T4, N0, N1, N2, M0
<i>Estádio IIIC</i>	Qualquer T, N3, M0
<i>Estádio IV</i>	Qualquer T, qualquer N, M1

Modificado de TNM/UICC 6ª edição.

Onde:

Tumor primário (T)

TX: Tumor não pode ser avaliado;

T0: Sem evidência de tumor primário;

Tis: Carcinoma Intraductal, Carcinoma Lobular *in situ*, ou Doença de Paget do mamilo com ou sem associação de invasão normal;

T1: Tumor ≤ 2cm em sua maior dimensão;

T2: Tumor > 2 cm mas ≤ 5 cm em sua maior dimensão;

T3: Tumor > 5 cm em sua maior dimensão;

T4: Tumor de qualquer tamanho com extensão direta à parede torácica (a) ou à pele (b) ou ambas (c) e carcinoma inflamatório (d).

Linfonodos Regionais (N)

NX: Linfonodos regionais não podem ser avaliados;

N0: Sem evidência de metástase linfonodal;

N1: Metástase para linfonodos axilar ipsilareta;

N2: Metástase para linfonodo axilar fixo ipsilateral na ausência evidente de metástases linfonodais clinicamente visíveis;

N3: Metástases em linfonodos infraclaviculares ipsilaterais com ou sem envolvimento axilar evidente, ou metástases em linfonodos supraclaviculares ipsilaterais com ou sem envolvimento axilar de cadeia mamária interna.

Metástase à distância (M)

MX: Presença de metástase à distância que não pode ser avaliada;

M0: Sem metástase à distância;

M1: Metástase à distância.

O estudo histopatológico do tumor primário da mama por meio do exame anátomo-patológico com coloração de rotina (método de hematoxilina-eosina) é o método de avaliação mais utilizado no câncer de mama. As informações obtidas através deste exame são essenciais na determinação do prognóstico das pacientes, com utilidade clínica já comprovada no tratamento (Fitzgibbons *et al.*, 2000).

Faz parte da avaliação-padrão da paciente o estudo imunoistoquímico do tumor com o objetivo principal de obter informações sobre a expressão de receptores de estrogênio, receptores de progesterona e do receptor do fator de crescimento epidérmico (HER2) pelas células neoplásicas. Estas moléculas funcionam como marcadores tumorais de valor prognóstico e preditivo de resposta ao tratamento (Corrêa *et al.*, 2010).

O tamanho do tumor e a condição dos linfonodos axilares são os dois mais importantes indicadores prognósticos para o câncer de mama, tanto que constituem a base do estadiamento TNM estabelecido e aprovado pela União Internacional Contra o Câncer. O tamanho do tumor é

um dos melhores preditores da recidiva e quanto maior for o tamanho, maiores são as chances de comprometimento metastático dos linfonodos locorregionais. Os tumores de menor tamanho estão invariavelmente relacionados a um melhor prognóstico, tanto para sobrevida global quanto para sobrevida livre de doença, independente do autor, período ou tipo de tratamento aplicado (Abreu & Koifman 2002).

A presença de metástases nos linfonodos axilares é um dos fatores mais importantes no estadiamento e avaliação prognóstica de pacientes com câncer de mama. A presença de metástases linfonodais está relacionada com o maior potencial para metástases à distância e pior prognóstico. As características clínicas relacionadas às metástases linfonodais incluem a idade da paciente, sendo os tumores de mulheres mais jovens (pré-menopausa) mais agressivos; tamanho do tumor primário, o tipo e o grau histológico. Tumores maiores que 2 cm têm maior chance de estarem associados às metástases em linfonodos no momento do diagnóstico. Os carcinomas ductais sem outras especificações e os carcinomas micropapilares têm maior frequência de metástases linfonodais que os tipos especiais puros, de boa evolução, como os tubulares e o colóide. Tumores com alto grau histológico apresentam maior tendência a metástases. O índice proliferativo do tumor, avaliado por contagem mitótica, que é parte da avaliação do grau histológico, também está relacionado à maior propensão de metástases (Marinho *et al.*, 2008).

A detecção dos receptores hormonais (receptores de estrogênio e de progesterona) tem adquirido grande relevância, sendo relacionada tanto ao valor preditivo para resposta à terapia endócrina quanto ao seu valor prognóstico. Pacientes com tumores que expressam receptores hormonais tendem a apresentar melhor resposta à terapia anti-hormonal, maior sobrevida global e maior sobrevida livre de doença (Arias *et al.*, 2003).

O câncer de mama é uma doença heterogênea, que engloba uma série de entidades biológicas distintas associadas com características morfológicas, imunoistoquímicas e

comportamento clínico. Por muitas décadas, os carcinomas de mama foram apenas classificados de acordo com o tipo e grau histológico e com a expressão de receptores hormonais. Mais recentemente, após o sucesso dos ensaios clínicos com o Trastuzumab, a caracterização da expressão de HER2 tornou-se parte integrante do trabalho histopatológico de acompanhamento de pacientes com câncer de mama. Do ponto de vista de um oncologista clínico, as pacientes com câncer de mama são classificadas em três principais grupos: (i) aquelas que apresentam tumores com receptores hormonais positivos, que administram as terapias voltadas para receptores de estrogênio como opção terapêutica com ou sem quimioterapia, (ii) aquelas com tumores HER2 +, que recebem a terapia dirigida ao HER2, com uso do Trastuzumab ou, em algumas situações, o Lapatinibe, e (iii) aquelas com receptores hormonais (RE e RP) e HER2 negativos, para as quais a quimioterapia é a única modalidade de tratamento sistêmico disponível (Reis-Filho & Tutt, 2008).

Os tumores de mama que expressam receptores de estrogênio ou receptores de progesterona correspondem a 75 a 80% dos casos de cânceres de mama e os tumores que expressam receptores de HER2 correspondem a 15 a 20% dos casos de carcinomas mamários. Cerca da metade desses casos que expressa HER2 co-expressam receptores hormonais. E aproximadamente 10 a 20% dos cânceres de mama estão em uma categoria denominada triplo-negativo, tal como definido pela ausência de expressão destas três proteínas. (Cleator *et al.*, 2007).

A maioria dos cânceres de mama triplo-negativos pertence ao subtipo basal-símile. Cânceres basal-símiles são normalmente associados a um alto grau histológico, marcado por pleomorfismo celular, um alto índice de Ki67, aumento da atividade mitótica e presença de Figuras atípicas de mitose (Rakha *et al.*, 2007).

Em nível genômico, comparado com os outros subtipos, o subtipo basal-símile distingue-se pela instabilidade genômica, aumento de alterações no número de cópias do DNA, e freqüente

queda dos níveis de deleções e inserções. Este subtipo também é caracterizado pela desestabilização de componentes importantes do ciclo celular, como a via RB, e anormalidades em p53. Mutações nesse gene têm sido relatadas em até 82% das pacientes, em comparação com apenas 13% no grupo luminal A (Santana-Davila & Perez, 2010).

6 – Imunoistoquímica

No câncer de mama humano, a imunomarcção de receptores de estrógeno e progesterona auxilia na escolha do tratamento. Mas, as chances de sucesso também estão relacionadas com o diagnóstico precoce, já que as neoplasias decorrentes dos desequilíbrios hormonais, na sua fase inicial, ainda são hormônio-dependentes, com melhor prognóstico em comparação àquelas que já adquiriram independência hormonal (Silva *et al.*, 2004).

O método imunoistoquímico, principalmente após o desenvolvimento de anticorpos capazes de reconhecer epítopos que não são degradados durante o processamento histológico, tem, na prática, gradativamente, substituído o método bioquímico, antes tido como o padrão-ouro, para a avaliação dos receptores hormonais. Os resultados do método imunoistoquímico dependem de variáveis como o tipo de fixador utilizado, o tempo de fixação do material, a temperatura de processamento e o método de recuperação antigênica utilizado. À exceção do último, os outros nem sempre podem ser padronizados, pois são procedimentos que ocorrem à distância do laboratório de patologia ou, então, variam de laboratório para laboratório (Arias *et al.*, 2003).

O estudo imunoistoquímico é utilizado em diferentes situações da patologia mamária, sendo as mais importantes: avaliação de fatores preditivos e prognósticos do câncer de mama (por exemplo, receptores hormonais e HER2), pesquisa de células epiteliais metastáticas em linfonodo sentinela, diagnóstico diferencial de lesões mamárias e determinação de possível origem de neoplasias metastáticas (Salles *et al.*, 2009).

Nas últimas décadas, a imunohistoquímica tem revolucionado a prática da Anatomia Patológica. Além do inestimável auxílio ao diagnóstico de diferentes tipos de neoplasia, as técnicas permitem a identificação de diferentes tipos de marcadores (enzimas, receptores, produtos de genes, etc.) que estão relacionados ao comportamento biológico das neoplasias. No campo da imunohistoquímica, a disponibilidade de anticorpos monoclonais que reagem com antígenos associados aos tumores de mama está se expandindo progressivamente e, dessa forma, vem permitindo que se conheça melhor a biologia da referida neoplasia, oferecendo, com isso, um prognóstico, um diagnóstico e um tratamento mais estruturado para o controle dessa classe tumoral (Zuccari *et al.*, 2008).

7 – Câncer de Mama Triplo-Negativo

Câncer de mama triplo-negativo é um termo recente e refere-se a tumores que, quando analisados por imunohistoquímica, não expressam receptores de estrogênio, progesterona e HER2. Suas características moleculares e clínicas se superpõem às dos tumores definidos, pela técnica de microarranjos, como do tipo basal. Além dessas características, estes tumores afetam mais frequentemente mulheres com menos de 50 anos, apresentam comportamento mais agressivo e são mais prevalentes entre as afro-descendentes (Corrêa *et al.*, 2010).

Dos cerca de um milhão de casos de câncer de mama diagnosticados mundialmente em 2008, estima-se que 172.695 abrigam o fenótipo triplo-negativo. O câncer de mama triplo-negativo está recebendo uma quantidade enorme e adequada de atenção das pesquisas, dada à sua biologia única, o mau prognóstico, o padrão inicial de metástase agressivo e a relativa falta de alvos terapêuticos, quando comparado com o câncer de mama endócrino-sensível e HER2-positivo (Anders & Carey, 2009).

A heterogeneidade do câncer de mama tem implicações para os médicos e seus pacientes. Cada vez mais os tratamentos são voltados para marcadores moleculares. O desenvolvimento de terapias hormonais validou a distinção entre o receptor de estrógeno (ER), em cânceres de mama ER – positivo e negativo. O Tamoxifeno foi inicialmente utilizado como um tratamento para todos os cânceres de mama, porém mais tarde foi reconhecido que somente pacientes que expressavam receptores hormonais se beneficiavam do medicamento. A introdução da terapia com o Trastuzumabe (Herceptin), um anticorpo monoclonal, destacou a importância de identificar tumores com amplificação ou superexpressão de HER2neu (HER2) (Dent *et al.*, 2007).

Muitos autores sugerem que existe estreita relação entre o câncer de mama basal-símile, o triplo-negativo e o ligado à deficiência do *BRCA1*. A afirmativa é sustentada pelo fato de que grande parte das características moleculares, imunoistoquímicas e morfológicas são compartilhadas pelos três grupos de tumores. A maior parte dos tumores associados à deficiência de *BRCA1* é triplo-negativa e expressa marcadores de células mioepiteliais, como as citoqueratinas basais. Além disso, essas pacientes compartilham evolução clínica desfavorável (Fernandes *et al.*, 2009).

Os mastologistas adotaram o conceito de TNBCs (cânceres de mama triplo-negativos) logo após a introdução do teste de análise da expressão de HER2, no final dos anos 90. Estes tumores tendem a ser biologicamente agressivos e difíceis de tratar, devido à falta de eficácia dos alvos terapêuticos no seu tratamento. Além disso, essas pacientes não recebem o benefício de terapias específicas, tais como agentes anti-hormonais ou anti-HER2. Embora mais da metade dos TNBCs expresse receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), os primeiros testes com agentes anti-EGFR ainda precisam demonstrar sua eficácia clínica. Esses tumores tipicamente expressam altos níveis de p53 mutante, que tem sido utilizado como um marcador de mau prognóstico, e estão associados a mutações no gene *BRCA1* não hereditárias. O desenvolvimento

de terapias clinicamente úteis para estes tumores é imprescindível e vários candidatos a biomarcadores estão atualmente sob investigação (Diaz *et al.*, 2007).

O comportamento clínico do câncer de mama triplo-negativo é classicamente mais agressivo do que os demais tumores deste órgão. Conseqüentemente, a sobrevida dessas pacientes é inferior à da população geral das pacientes com câncer de mama. Além disso, os tumores triplo-negativos apresentam maior tropismo por órgãos sólidos, sendo a ocorrência de metástases ósseas, muitas vezes, um problema secundário nesta doença. O tropismo por envolvimento visceral (como de pulmões e fígado) é comum e segundo algumas séries recentes, apresentam maior incidência de metástases cerebrais, fato que poderá ser importante em um futuro próximo para estabelecer novas estratégias de estadiamento e, por conseguinte, de tratamento dessas pacientes (Fernandes *et al.*, 2009).

Na literatura mundial, existem poucos dados a respeito de locais específicos de metástases e evolução clínica ao longo do tempo, para pacientes com câncer de mama triplo-negativo e câncer metastático. Um potencial sítio de preocupação é o sistema nervoso central (SNC). Um aparente aumento de incidência de metástases do SNC também foi observado em afro-americanas e em portadoras da mutação *BRCA1*, duas populações de pacientes que têm incidência relativamente maior da doença triplo-negativa (Lin *et al.*, 2008).

A histologia dos tumores triplo-negativos inclui frequentemente tumores de alto grau, alta taxa de proliferação celular e necrose. Devido à alta atividade de proliferação, estes muitas vezes se manifestam como cânceres diagnosticados entre intervalos de mamografias (De Laurentiis *et al.*, 2010).

Devido à falta de expressão dos alvos moleculares estabelecidos, as mulheres com tumores triplo-negativos (TNBCs) não tem terapias alvo à sua disposição e têm uma sobrevida pior que os

subgrupos ER-positivo e/ou PR-positivos. Idade precoce e condição socioeconômica também estão associadas aos TNBCs (Lund *et al.*, 2008).

O câncer de mama triplo-negativo pode ser classificado em dois subtipos: o fenótipo basal (BP) e o fenótipo não basal (NBP). Normalmente a triagem clínica envolve apenas a detecção de ER, PGR e Her2 e por esta razão a abordagem terapêutica é sempre a mesma independente do subtipo. No entanto, há relatos de que 50 a 60% dos cânceres de mama triplo-negativos são positivos para os marcadores basais e por isso é aconselhável classificar as lesões como BP ou NBP e realizar análises para elaborar estratégias terapêuticas mais adequadas para as pacientes. (Sasa *et al.*, 2008).

II - CARACTERÍSTICAS DE Ep-CAM

1 – Gene

Em 1979, a busca por novos antígenos de superfície celular expressos em tecidos neoplásicos levou à descoberta de Ep-CAM (Armstrong & Eck, 2003), um dos primeiros antígenos humanos descritos em tecido epitelial (Baeuerle & Gires, 2007). Ep-CAM foi inicialmente identificada pelo anticorpo monoclonal (mAb) 17-1A, após a imunização de ratos com células de câncer colorretal humano (Münz *et al.*, 2010). Usando uma abordagem similar, o antígeno Ep-CAM foi identificado, várias outras vezes e cada vez recebendo o nome do respectivo anticorpo monoclonal usado na detecção (Tyrps *et al.*, 2007). Por um longo tempo, Ep-CAM foi considerada uma mera proteína de superfície celular, mediadora de adesão celular homotípica (Münz *et al.*, 2010).

Atualmente, acredita-se que a molécula de adesão epitelial (Ep-CAM) é um antígeno de diferenciação pan-epitelial, que está restrito ao epitélio normal em indivíduos saudáveis, mas que

está tipicamente hiperexpresso sob vários graus, na maior parte dos carcinomas humanos (Ziegler *et al.*, 2009). Há cerca de duas décadas, diversos estudos sobre câncer de mama enfocaram a expressão e as possíveis rotas de sinalização celular da molécula de adesão celular epitelial (Ep-CAM) (Gostner *et al.*, 2011).

A proteína Ep-CAM é codificada pelo gene *TACSTD1* (*tumor-associated calcium signal transducer 1*), originalmente relatado como gene *GA733-2*, que foi localizado no cromossomo 4q, com uma estimativa mínima do tamanho de 13,9 kilobase (kb). A comparação entre dados de sequência genômica e de cDNA revelou que o gene *GA733-2* consiste de nove éxons, dispostos consensualmente com sequências intrônicas intercalantes (Linnebach *et al.*, 1993) e que codificam componentes extracelulares, transmembranares e citoplasmáticos (Armstrong & Eck *et al.*, 2003). A sequência de aminoácidos codificada pelo éxon 1 corresponde ao peptídeo sinal. O domínio extracelular é codificado pelos éxons 2 a 6, sendo que o éxon 2 codifica uma sequência rica em cisteína que é homóloga ao fator de crescimento epidérmico (EGF-like) e um pequeno domínio com homologia ao nidogênio (uma proteína da matriz celular) (Simon *et al.*, 1990; Linnebach *et al.*, 1993), seguido de uma região pobre em cisteína (Litvinov *et al.*, 1994). O éxon 7 codifica o domínio transmembranar. O éxon 8 codifica uma porção de 15 aminoácidos do domínio citoplasmático, incluindo um grupamento de seis aminoácidos carregados positivamente. O éxon 9 codifica 13 aminoácidos restantes do domínio citoplasmático, o códon de parada e toda a região 3' não-traduzida (Linnebach *et al.*, 1993; Balzar *et al.*, 1999b). A Figura 1 esquematiza o gene *GA733-2*.

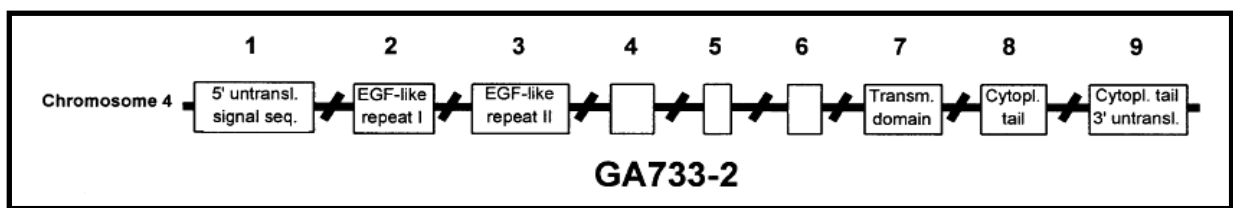


Figura 1 – Modelo esquematizado do gene *GA733-2*

Modificado de Balzar, *et al.*, 1999

2 – O Transcrito de Ep-CAM

O mRNA transcrito é de aproximadamente 1,5kb. A maior variação nos transcritos ocorre na porção não-traduzida 5', podendo ter 16 ou 160 nucleotídeos. A região não-traduzida 3' contém dois possíveis motivos importantes. A primeira sequência (ATTTA) apresenta-se como um sinal específico para degradação do mRNA das citocinas, linfocinas e algumas oncoproteínas. A segunda sequência (TTATTTAT) têm sido identificada como uma sequência consenso na região 3' de mediadores inflamatórios. Isto sugere que a expressão de Ep-CAM seja altamente regulada ao nível do mRNA (Balzar *et al.*, 1999b).

As análises do mRNA de Ep-CAM em um grande número de células de carcinoma, não foram capazes de demonstrar variações de *splicing* dos éxons que codificam o domínio intracelular da molécula (Balzar *et al.*, 1999b).

A região promotora de Ep-CAM, que controla a expressão do gene, foi clonada e caracterizada. A sequência do local de início de transcrição (TSS) foi definida. Por análise de deleção, foi estabelecido que 177pb da sequência 5'-flanqueadora são suficientes para conduzir a expressão do gene repórter, enquanto a região 687-341 pb do sítio de início da transcrição (TSS) parece ser responsável pela expressão epitélio-específica (van der Gun *et al.*, 2010).

3 – A proteína Ep-CAM

Ep-CAM é uma glicoproteína transmembranar do tipo I, com massa molecular de 40 kD e possui 314 resíduos de aminoácidos, dos quais 23 formam um peptídeo sinal, 242 resíduos de aminoácidos formam o domínio extracelular, 23 formam o domínio transmembranar e os 26 restantes formam um pequeno domínio intracelular (Szala *et al.*, 1990; Winter *et al.*, 2003). Doze

resíduos de cisteína existem entre os 242 aminoácidos do domínio extracelular, com vários sítios de glicosilação. O modelo atual da estrutura terciária de Ep-CAM contém 3 domínios funcionais (Armstrong & Eck *et al.*, 2003). O primeiro domínio extracelular contém dois domínios similares ao fator de crescimento epidermal (EGF-like). Alguns trabalhos mostram que o segundo domínio EGF-like de Ep-CAM é na verdade um domínio de tireoglobulina (TY) (Bauerle & Gires, 2007). O terceiro domínio é um domínio livre de cisteína e sem relação com moléculas conhecidas. A porção N-terminal do domínio *EGF-like* pode desempenhar um papel nas interações de linfócitos (Armstrong & Eck *et al.*, 2003). A Figura 2 demonstra os dois modelos estruturais propostos para Ep-CAM e apresenta os pontos de N-glicosilação da molécula. As seqüências de aminoácidos homólogas entre Ep-CAM e Tireoglobulina são mostradas em vermelho e perfazem 54% da estrutura protéica (Bauerle & Gires, 2007).

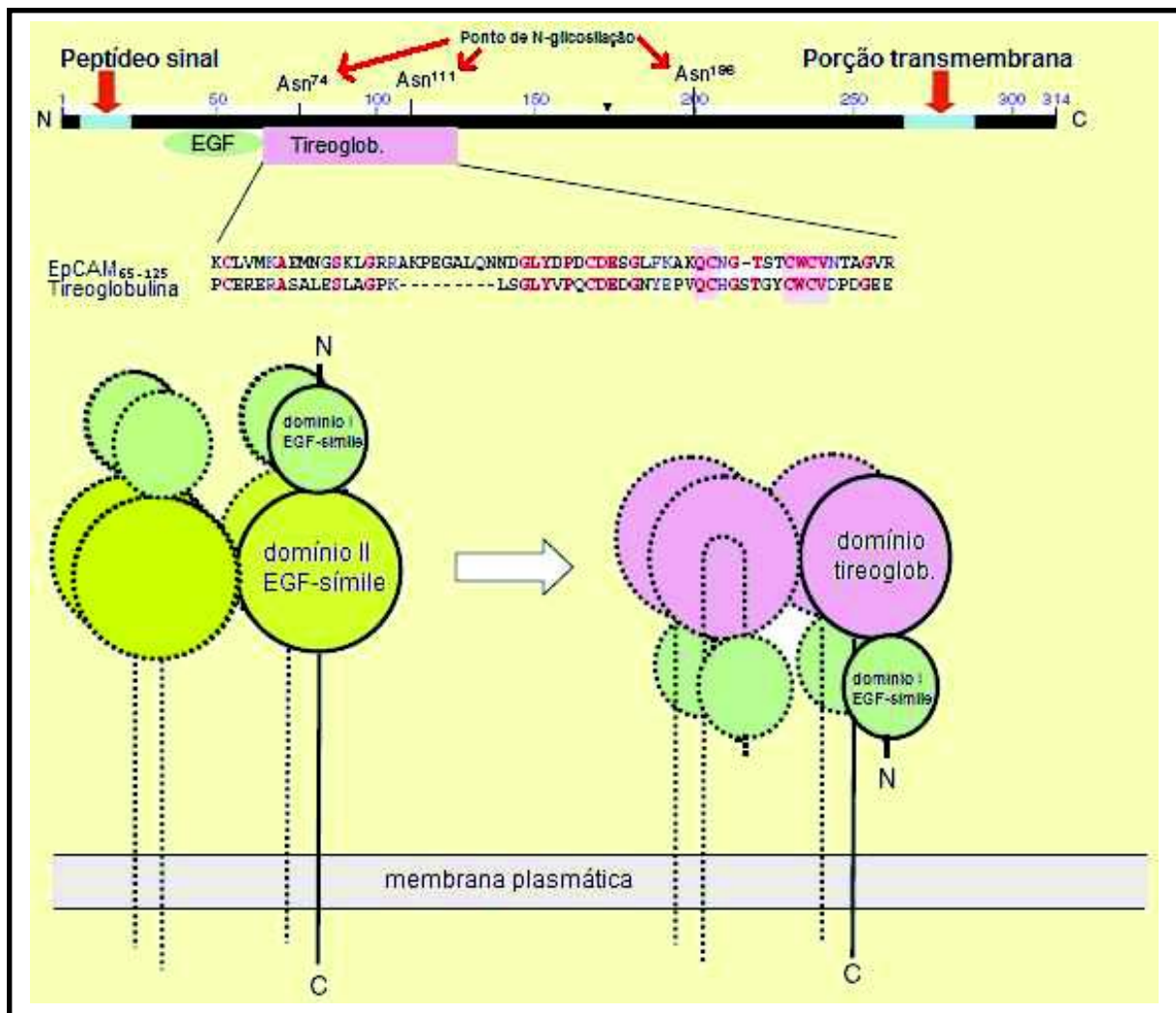


Figura 2 – Modelos estruturais da proteína Ep-CAM. (Modificado de Baeuerle & Gires, 2007)

A molécula de adesão epitelial (Ep-CAM) foi inicialmente descrita como antígeno associado a tumor. No entanto, Ep-CAM mostrou ser um marcador pan-epitelial, que é enriquecido na membrana basolateral. O nível de expressão de Ep-CAM tem sido associado com a diferenciação celular. Por exemplo, as regiões germinais das colônias de células normais apresentam níveis elevados de expressão de Ep-CAM, que diminuem à medida que as células se diferenciam e migram para o topo das vilosidades (Maaser & Borlac *et al.*, 2008). A função reguladora de Ep-CAM na morfogênese do tecido epitelial tem sido demonstrada em uma série de tecidos, no pâncreas e em particular na glândula mamária (Went *et al.*, 2004).

Ep-CAM é uma proteína transmembrana capaz de interagir com muitas outras proteínas, como a própria Ep-CAM, claudina-7, tetrapaninas, CD44 e catepsinas (Went *et al.*, 2008). Tem um papel importante na adesão celular, proliferação celular, diferenciação, migração, regulação do ciclo celular e está implicada também à sinalização de células-tronco tumorais (Ralhan *et al.*, 2010).

Além disso, a associação de Ep-CAM com claudina-7 interfere com a adesão homotípica celular mediada por Ep-CAM, promovendo a motilidade celular, proliferação, sobrevivência, carcinogênese e formação de metástases (Nübel *et al.*, 2009). Estes resultados sustentam um papel para Ep-CAM como oncogene. De fato, a superexpressão de Ep-CAM foi associada com a diminuição da sobrevivência global dos pacientes com diferentes tipos de câncer (Varga *et al.*, 2004).

Estudos que investigam o papel de Ep-CAM na carcinogênese ainda são controversos. Em contraste com o seu papel de promover formação do tumor, Ep-CAM também é descrita como uma proteína supressora de tumores. Ep-CAM foi inicialmente proposta para funcionar como uma molécula de adesão, capaz de mediar as interações de adesão homofílicas, evitando a dispersão

celular. Devido a essas propriedades adesivas, Ep-CAM é susceptível de desempenhar um papel na inibição da invasão (Litvinov *et al.*, 1994). A superexpressão de Ep-CAM em alguns tipos de carcinoma é associada com a melhora da sobrevida dos pacientes (Songun *et al.*, 2005).

O duplo papel da Ep-CAM é refletido também em estudos sobre mecanismos que investigam o papel de Ep-CAM na modulação aplicada à sua expressão. Células de carcinoma colorretal de ratos, transfectadas com cDNA de Ep-CAM aumentaram a adesão célula-célula, atenuando a invasão de células tumorais e diminuindo a incidência de tumores e metástases, quando inoculadas no baço de ratos (van der Gun *et al.*, 2010).

Estes dados sugerem que a expressão de Ep-CAM antagoniza o crescimento do tumor e o aparecimento de metástases. Além disso, em quatro diferentes tipos de carcinomas, a baixa regulação da expressão de Ep-CAM, utilizando RNA antisense ou pequenos RNAs de interferência (siRNA), diminuiu a proliferação, migração e invasão celular (Osta *et al.*, 2004 Munz *et al.*, 2009).

Abordagens experimentais que visam ao controle do promotor de Ep-CAM e o silenciamento da expressão de Ep-CAM com pequenos RNAs de interferência foram conduzidas (Went *et al.*, 2008). Tais estudos demonstram que o silenciamento da expressão de Ep-CAM foi mostrado associado à diminuição da taxa de migração celular tumoral (Maaser & Borlac; 2008).

4 – Ep-CAM e Câncer

Ep-CAM é uma das proteínas mais amplamente investigadas em cânceres humanos (Ralhan *et al.* 2010). Está tipicamente hiperexpressa em uma variedade de tumores de origens mesoteliais e ectodérmicos, como os tumores neurogênicos, sarcomas, melanomas e linfomas

(Monburg *et al.*, 1987). Também foi descrita em carcinomas de várias origens, incluindo de cólon e reto, de próstata, do fígado, do esôfago, do pulmão, de cabeça e pescoço, de pâncreas e de mama (Went *et al.*, 2004).

A expressão de Ep-CAM é conhecida por ser reguladora em uma variedade de carcinomas, incluindo os de pulmão e cólon (Went *et al.*, 2006). A correlação entre expressão de Ep-CAM e o prognóstico parece ser tecido-específica. No câncer de ovário, mama e de carcinoma de células escamosas do esôfago, a superexpressão de Ep-CAM tem sido correlacionada com pior prognóstico (Stoecklein *et al.*, 2006).

A imunoterapia com o anticorpo monoclonal anti-Ep-CAM diminuiu a frequência de metástase à distância em pacientes com câncer colorretal e eliminou células tumorais de câncer de mama na medula óssea (Braun *et al.*, 1999). Por conta de seu alto nível de expressão em vários carcinomas, Ep-CAM é um potencial alvo para o diagnóstico e terapia tumoral. Ensaios clínicos visando Ep-CAM foram realizados com sucesso variável (Baeuerle & Gires, 2007).

Além do seu papel na proliferação, Ep-CAM está superexpressa em células iniciadoras de câncer isoladas de carcinomas de cólon, mama, pâncreas e próstata e nas células-tronco progenitoras de tecidos normais. No entanto, não é entendido como Ep-CAM transmite sinais para o núcleo da célula, ou como o sinal é gerado (Maetzel *et al.*, 2009).

Recentemente, Ep-CAM ganhou um interesse renovado como um transdutor de sinal e foi identificado como um marcador de células-tronco iniciadoras de câncer. O silenciamento transitório da expressão de Ep-CAM levou a uma redução do potencial oncogênico em carcinoma de mama, gástrico, hepatocelular e de células escamosas orais da língua (van de Gun *et al.*, 2010).

5 – Ep-CAM e Câncer de Mama

Em meados de 2003, Thurm e colaboradores avaliaram a expressão de Ep-CAM em células residuais de carcinoma mamário micrometastático após terapia adjuvante. Amostras de medula óssea de pacientes sem metástases à distância e com menos de 10 linfonodos axilares positivos foram analisadas. As 62 pacientes foram divididas em dois grupos quanto ao processamento das amostras de medula óssea. No primeiro grupo, 35 pacientes tiveram as células separadas com o uso de centrifugação em Ficoll e nas amostras das 27 pacientes restantes foram empregadas esferas imunomagnéticas acopladas a um anticorpo anti-Ep-CAM. A análise da medula óssea ocorreu 3 meses após o tratamento. Das 35 primeiras pacientes, 10 (28,6%) tiveram células que expressaram citoqueratinas, indicando provável metástase mamária. Entretanto, nenhuma delas co-expressava a Ep-CAM. As 27 pacientes do segundo grupo apresentaram resultados semelhantes. Mesmo com o emprego de um método que aumentava a sensibilidade de detecção, apenas duas amostras co-expressavam a Ep-CAM, o que limitaria o uso terapêutico do anticorpo anti-Ep-CAM como terapia adjuvante (Thurm *et al.*, 2003).

Em 2004, Spizzo e colaboradores realizaram um estudo com 1.715 pacientes, utilizando microarranjos de tecido e análise por imunohistoquímica. Como resultado, 41,7% dos casos apresentaram alta expressão de Ep-CAM, enquanto 48% tiveram baixos níveis e 10,3% perderam a expressão da proteína. Uma relação significativa foi estabelecida entre a expressão de Ep-CAM e o comprometimento de linfonodos axilares, o grau histológico e o tamanho do tumor. A sobrevida das pacientes diminuiu significativamente com o aumento da expressão de Ep-CAM, nos casos em que havia comprometimento de linfonodos axilares.

Schmidt e colaboradores, em 2008, analisaram num estudo tipo coorte, a expressão de Ep-CAM por imunohistoquímica em 402 pacientes de uma única instituição e dessas, 70 tinham o

fenótipo triplo-negativo. Além de detectar uma possível associação entre Ep-CAM e o pior prognóstico, também nestes casos, a detecção dos níveis de Ep-CAM foi conduzida para que estas pacientes pudessem ser tratadas com adecatumumab, um anticorpo dirigido contra Ep-CAM. Foram encontradas associações significativas entre o grau-histológico, a superexpressão de Ep-CAM e de HER2 com uma pior sobrevida livre de doença. E foi sugerido que Ep-CAM representasse um alvo adequado para terapias específicas, particularmente em tumores triplo-negativos.

Em 2011, o mesmo grupo liderado por Spizzo realizou outro estudo acerca da expressão de Ep-CAM com imunoistoquímica, desta vez com 2.291 espécimes de tumores primários e 108 com metástases, utilizando o anticorpo específico para Ep-CAM, clone VU1D9. A expressão de Ep-CAM no câncer de mama dependeu do subtipo histológico, sendo que os de histologia lobular geralmente não mostraram expressão ou a expressão foi fraca. A maioria das metástases foi Ep-CAM positiva e estas frequentemente refletiam o fenótipo da expressão do tumor primário.

No câncer de mama invasivo, a superexpressão de Ep-CAM está associada a uma redução da sobrevida livre de doença e da sobrevida global. Portanto, esta molécula foi sugerida como um potencial alvo para imunoterapia adjuvante contra a doença com presença de micrometástase. No entanto, a Ep-CAM pode estar desregulada em células de tumores metastáticos, pois a perda de adesão celular é um pré-requisito para a disseminação de células tumorais (Thurm *et al.*, 2003). Além de sua importância prognóstica, a Ep-CAM tem se destacado como um potencial alvo para terapias antitumorais (Schmidt *et al.*, 2008).

O câncer de mama triplo-negativo é resistente às terapêuticas específicas, como tratamentos endócrinos ou trastuzumab. Portanto, muitos estudos têm sido publicados no intuito de compreender a biologia do câncer de mama triplo negativo. A relevância clínica de uma

possível associação de Ep-CAM com pior prognóstico também no câncer de mama triplo-negativo seria a de que este subtipo de câncer de mama pode ser tratado com adecatumumab, um anticorpo dirigido contra Ep-CAM. (Schmidt et al., 2008).

Oferecer tratamento mais efetivo e menos tóxico para o câncer de mama requer uma abordagem individualizada, considerando as características clínicas e moleculares das pacientes (Gonzalez-Angulo *et al.*, 2005). A Ep-CAM tem sido alvo de ensaios clínicos utilizando anticorpos monoclonais e acredita-se que Ep-CAM representa um novo alvo para terapia gênica em câncer de mama (Osta *et al.*, 2004).

III – JUSTIFICATIVAS

- 1) A proteína Ep-CAM é detectada na maioria dos carcinomas, sendo alvo molecular para estabelecimento de imunoterapia antitumoral.
- 2) Ep-CAM é considerado marcador molecular de proliferação e diferenciação celular, porém, seu potencial papel prognóstico ainda não está totalmente elucidado para pacientes com câncer de mama.
- 3) A detecção imunoistoquímica de Ep-CAM em tumores de mama é importante a fim de selecionar pacientes candidatas à imunoterapia contra Ep-CAM.
- 4) A avaliação da epidemiologia molecular de Ep-CAM em pacientes com câncer de mama é uma pungente necessidade, dado o diagnóstico ainda tardio da doença. Na região Centro-Oeste, o risco estimado de incidência é de 48 casos a cada 100.000 mulheres. (INCA, 2012).
- 5) O Brasil ainda se mantém ausente na produção científica sobre Ep-CAM, seja em tecidos tumorais ou em tecidos normais.

IV – OBJETIVOS

1 – Objetivo Geral:

Avaliar as possíveis associações entre a superexpressão de Ep-CAM e os aspectos clínicos e histopatológicos de pacientes com carcinomas mamários.

2 – Objetivos Específicos:

2.1. Avaliar o impacto dos aspectos clínicos, histopatológicos e imunoistoquímicos no prognóstico de um grupo de 239 pacientes com carcinomas de mama, diagnosticados no Hospital Araújo Jorge, em Goiânia-GO.

2.2. Avaliar a expressão da proteína Ep-CAM, por imunoistoquímica, nos 239 espécimes de carcinomas mamários.

2.3. Investigar as possíveis associações entre os aspectos clínico-patológicos, a expressão de Ep-CAM e a sobrevida das pacientes com câncer de mama.

V - METODOLOGIA

1 – Seleção das Pacientes com Carcinomas Mamários:

Um grupo de 239 pacientes com carcinomas mamários foi selecionado entre os casos examinados no laboratório de imunoistoquímica do Hospital Araújo Jorge, em Goiânia, Goiás. Um levantamento inicial nos livros de registros que contêm cópias dos laudos imunoistoquímicos foi realizado, selecionando-se 345 casos de carcinomas mamários diagnosticados no período de 1998 a 2002. A busca de dados clínico-patológicos foi realizada a partir dos respectivos prontuários, no Setor de Arquivo do HAJ. Os blocos de parafina, contendo os espécimes tumorais correspondentes foram levantados no arquivo de blocos do Setor de Anatomia Patológica do HAJ. Os dados clínicos colhidos dos prontuários incluíram nome, idade na época do diagnóstico, estadiamento clínico, evolução da doença, óbito (quando registrado) e antecedentes familiares. Os aspectos histopatológicos incluíram tamanho do tumor, confirmação do tipo histológico, grau nuclear, expressão de receptores hormonais, HER2e comprometimento linfonodal.

Os dados coletados foram inseridos em uma planilha de banco de dados. As pacientes selecionadas foram aquelas que apresentaram dados clínicos e histopatológicos completos, blocos de tumores disponíveis e suficientes para análise e seguimento mínimo de cinco anos, a fim de que fossem analisados os dados de sobrevida. Nos casos de falta de informações nos prontuários, foi feita uma busca ativa, por meio de ligações telefônicas com o objetivo de atualizar o estado clínico da paciente. As pacientes selecionadas foram somente aquelas submetidas à biópsia ou cirurgia antes de qualquer tratamento radioterápico ou quimioterápico e esses dados também foram obtidos a partir dos prontuários. O estadiamento clínico das pacientes foi baseado nos critérios da *International Union Against Cancer, UICC, 2002* (Sobin & Wittekind, 2002).

2 – Espécimes Biológicos

Os espécimes biológicos analisados consistiram de fragmentos de mama colhidos por meio de biópsia ou cirurgia, antes de qualquer abordagem radioterápica ou quimioterápica. Os fragmentos foram fixados em formol 10% tamponado e incluídos em blocos de parafina. Todos os blocos foram obtidos dos arquivos do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. Foram também separadas dos arquivos as lâminas coradas por hematoxilina e eosina referentes aos blocos para a reavaliação por um médico patologista. Após a comprovação do diagnóstico, foram confeccionadas lâminas para o estudo imunoistoquímico. A espessura dos cortes usados na análise imunoistoquímica foi de 3µm.

3 – Imunoistoquímica e Avaliação da proteína Ep-CAM:

A expressão da proteína Ep-CAM foi avaliada por imunoistoquímica utilizando marcação com o anticorpo monoclonal ESA (*Epithelial Specific Antigen*, clone VU-1D9, Novo Castra) e a técnica padrão da HPR-polímero universal (MACH-4 Kit, Biocare, Concord, CA, USA), para detecção do antígeno referente à molécula de adesão celular epitelial (EP-CAM). Os cortes montados em lâminas silanizadas foram desparafinizados com incubações em xilol e hidratados em uma bateria de etanol com concentrações decrescentes até 50% e água destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito em peróxido de hidrogênio (H₂O₂) 3%, durante 10 minutos, seguido de lavagem das lâminas com tampão fosfato (PBS), pH 7,4 por 5 minutos. Em seguida, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica, utilizando uma solução de tripsina (Sigma, T-8128) e cloreto de cálcio a 0,1% em tampão PBS por 5 minutos. As lâminas foram incubadas a 4°C, *overnight*, com o anticorpo monoclonal anti-Ep-CAM (1:100), diluído em solução de PBS contendo albumina bovina a 1%. Após a incubação com o anticorpo primário, as lâminas eram lavadas 3 vezes em PBS, por 5 minutos e incubadas durante 1 hora com o anticorpo secundário

biotinilado. Novamente eram lavadas em PBS e os cortes eram incubadas com uma sonda, que se liga aos anticorpos de camundongo e coelho e em seguida aplicado o polímero contendo *horseradish-peroxidase* que se liga à sonda. Após nova lavagem com PBS por 5 minutos, as reações foram reveladas com tetra-hidroclorato de 3-3' diaminobenzidina (Sigma D-5637), por 5 minutos, e levemente contra-coradas com hematoxilina. Em seguida as lâminas foram desidratadas e montadas com lamínula. Tecidos de carcinoma de mama com padrão de revelação conhecido para ESA (Ep-CAM) foram utilizados como controles positivos da reação. Pelo menos dois profissionais experientes em imunoistoquímica avaliaram, de forma independente, a expressão da proteína Ep-CAM contando no mínimo 100 células tumorais. Em casos de resultados conflitantes entre os examinadores, o resultado final foi obtido por análise e discussão entre os membros da equipe de imunoistoquímica. O padrão para marcação foi definido pela coloração específica, castanha, da membrana celular. A expressão de Ep-CAM foi pontuada quanto à proporção de células marcadas (de 0 a 4 pontos) e quanto à intensidade de marcação (de 0 a 3 pontos). Assim, pontuações gradativas, variando de 0 a 12 (produto de pontos de proporção pelos pontos de intensidade), foram consideradas para classificar a expressão da Ep-CAM no câncer de mama, resultando nos seguintes padrões: sem expressão (0 pontos), baixa expressão (1 a 4 pontos) e alta expressão (> 4 pontos) (Gastl *et al.*, 2000, Spizzo *et al.*, 2004). A tabela a seguir demonstra a classificação da expressão da proteína Ep-CAM no câncer de mama.

Pontos de Intensidade \ Pontos de proporção	0 (nenhuma célula marcada)	1 (<10% de células marcadas)	2 (de 10 a 50% de células marcadas)	3 (de 50 a 80% de células marcadas)	4 (>80% de células marcadas)
0 (sem marcação)	Sem expressão				
1 (marcação fraca)	Baixa expressão				Alta expressão
2 (marcação moderada)					
3 (marcação forte)					

Figura 3 - Níveis de expressão da proteína Ep-CAM em relação à proporção e intensidade de marcação imunohistoquímica (Modificado de Gastl *et al.*, 2000).

VI – ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados de prontuários e resultados foram tabulados em planilhas de um banco de dados para análise estatística utilizando-se o aplicativo estatístico BioEstat (5.0) para os testes do chi-quadrado, e SPSS (version 18.0, SPSS Inc., USA) para os testes de Kaplan-Meier (KM) e *log-rank*. As pacientes foram agrupadas, de acordo com a expressão da proteína, para o cálculo da curva de sobrevida pelo método de Kaplan e Meier (1958). Diferenças entre curvas de sobrevida foram avaliadas pelo teste *log-rank*. O teste do chi-quadrado foi utilizado para testar a associação entre as variáveis qualitativas (onde foram considerados como significativos para $p < 0,05$).

VII – ASPECTOS ÉTICOS

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Associação de Combate ao Câncer em Goiás protocolo CEPACCG Nº 072/07 de 01/02/2007 conforme os Anexo 1.

VIII – RESULTADOS

1 – Dados Clinicopatológicos

Um grupo de 239 pacientes com diagnóstico de carcinoma mamário feito no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge, Associação de Combate ao Câncer em Goiás, no período de 1998 a 2002, foi incluído neste estudo. A idade das pacientes variou entre 23 e 90 anos, com uma média de 52,6 anos e uma mediana de 51 anos. Quinze pacientes (6,28%) apresentaram idade abaixo de 35 anos, 101 pacientes (42,26%) tinham entre 35 e 50 anos e 123 pacientes (51,46%) tinham mais que 50 anos (Figura 4).

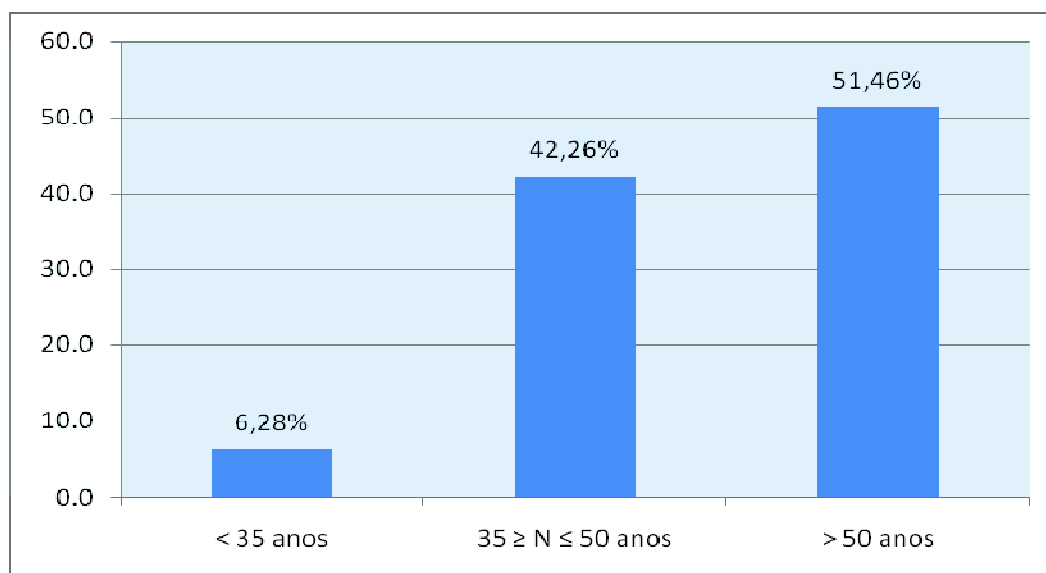


Figura 4: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a faixa etária (anos).

Foram relatadas 116 pacientes (48,5%) pré-menopausadas e 123 pacientes (51,5%) pós-menopausadas (Figura 5).

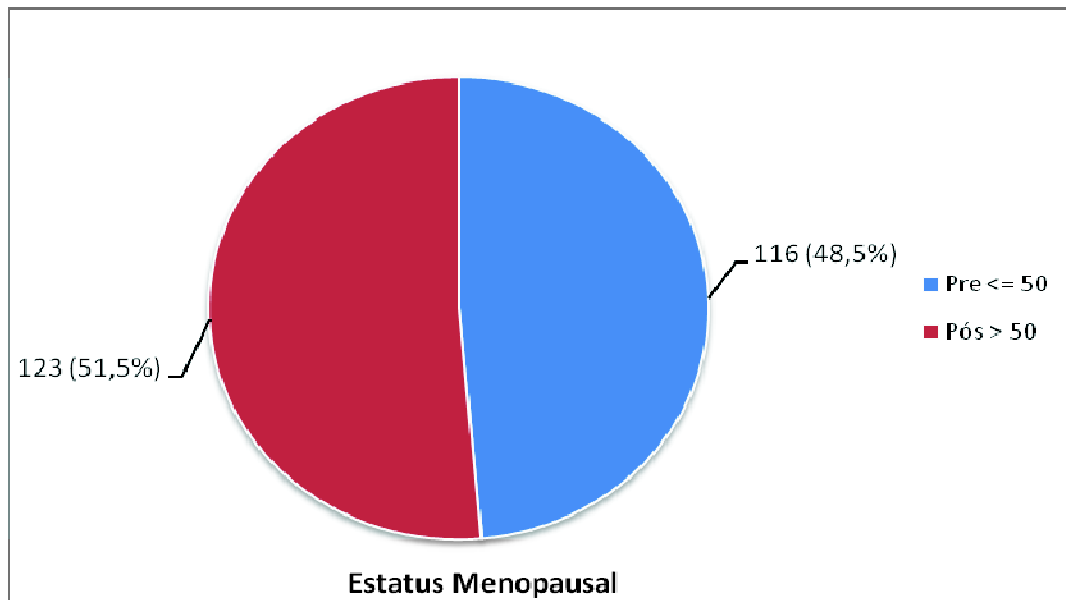


Figura 5 - Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o status menopausal.

Segundo a classificação TNM da UICC (União Internacional Contra o Câncer), três pacientes (1,2%) apresentaram estágio 0, 47 (19,7%) apresentaram estágio I, 106 (44,4%) apresentaram estágio II, 59 (24,7%) apresentaram estágio III, 23 (9,6%) apresentaram estágio IV e apenas uma paciente (0,4%) não teve o estadiamento descrito (Figura 6).

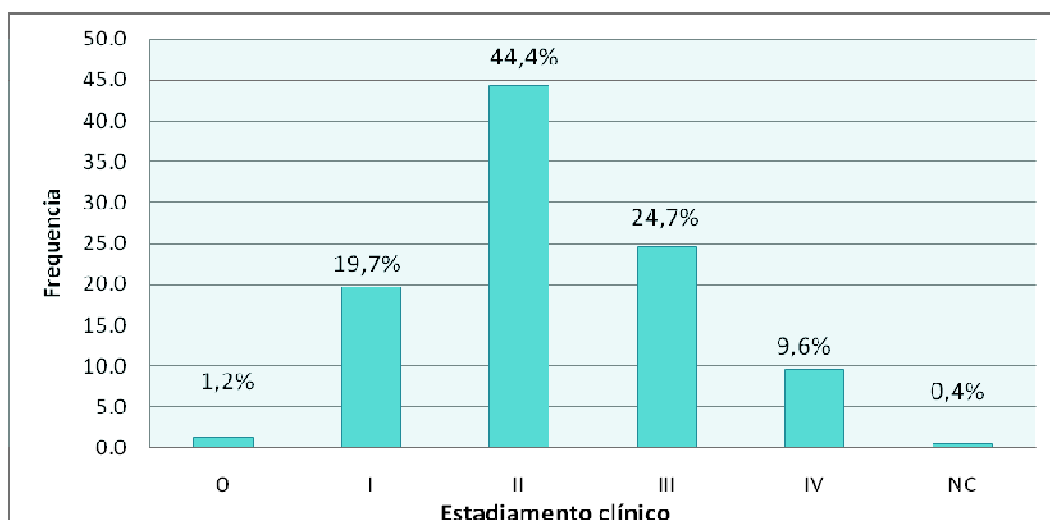


Figura 6: Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com estadiamento clínico.

Com relação ao comprometimento dos linfonodos regionais, 118 pacientes (49,4%) não apresentaram comprometimento linfonodal, 46 pacientes (19,2%) apresentaram de um a três linfonodos comprometidos, 26 pacientes (10,9%) apresentaram de quatro a nove linfonodos comprometidos, 41 pacientes (17,2%) apresentaram 10 ou mais linfonodos comprometidos e oito pacientes (3,3%) não tiveram o número de linfonodos comprometidos relatado (Figura 7).

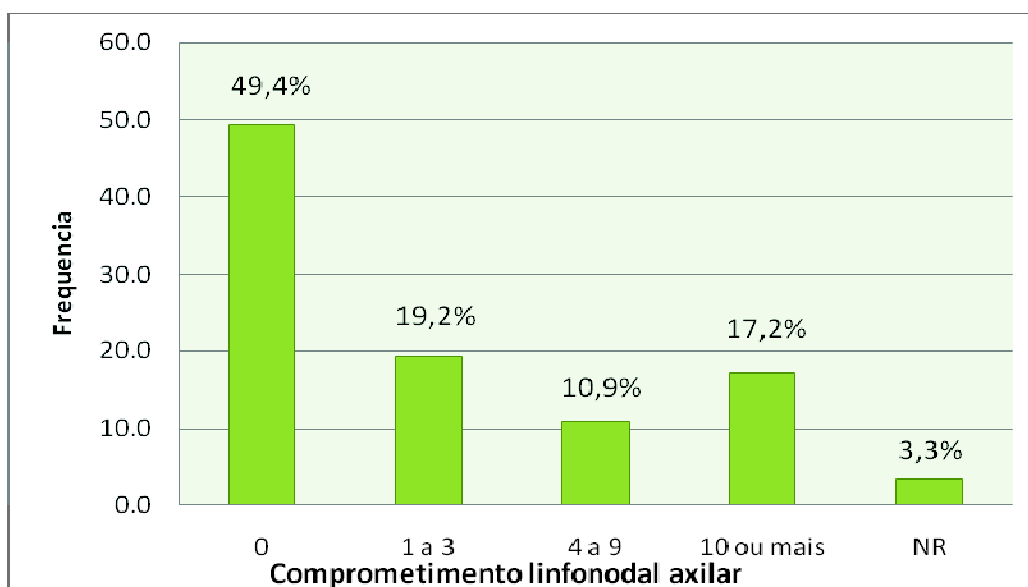


Figura 7: Distribuição dos casos de carcinomas mamários de acordo com o comprometimento linfonodal axilar.

As metástases à distância foram relatadas em 84 pacientes, perfazendo um total de 35,1% dos casos (Figura 8).

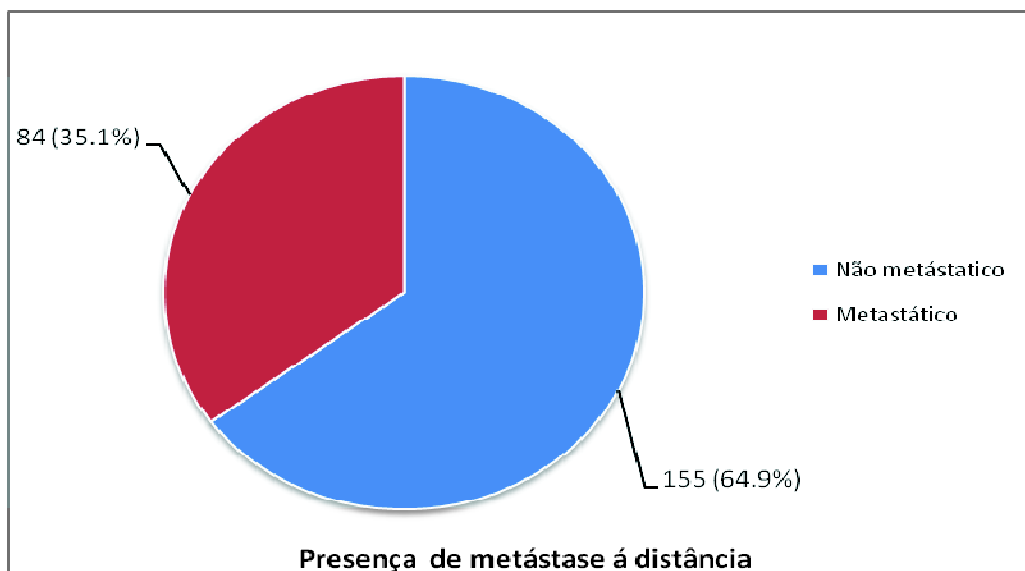


Figura 8 – Distribuição de casos de carcinomas de mama de acordo com a presença de metástase à distância.

O local mais freqüente de metástases foi nos ossos (35,9%), seguidos de pulmão (33,0%) e fígado (19,4%) (Figura 9).

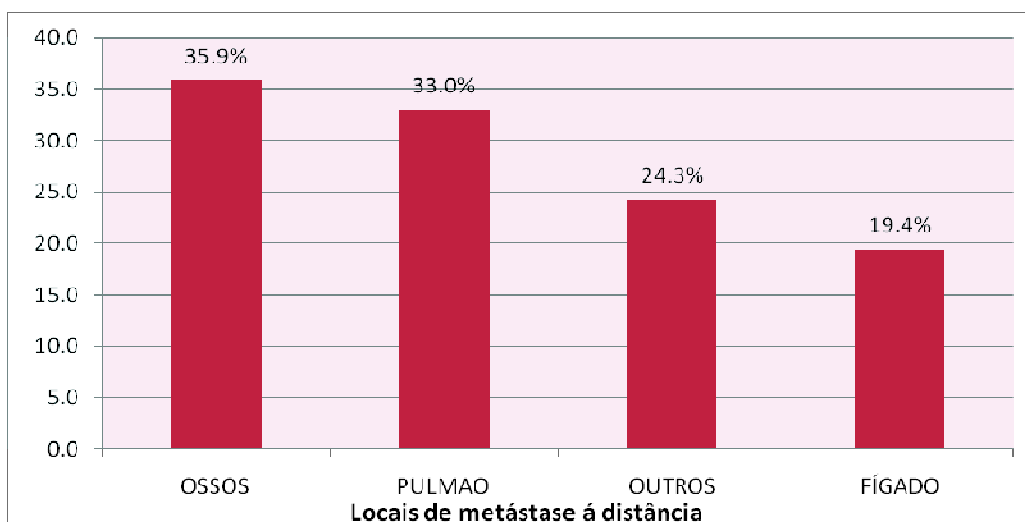


Figura 9 – Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com os locais de metástase à distância.

Quanto ao tamanho do tumor, 57 pacientes (23,8%) apresentaram tumores < 2 cm, 128 pacientes (53,6%) apresentaram tumores $2\text{cm} < T \leq 5\text{cm}$, 49 pacientes (20,5%) apresentaram tumores > 5cm e cinco pacientes (2,1%) não tiveram o tamanho do tumor relatado (Figura 10).

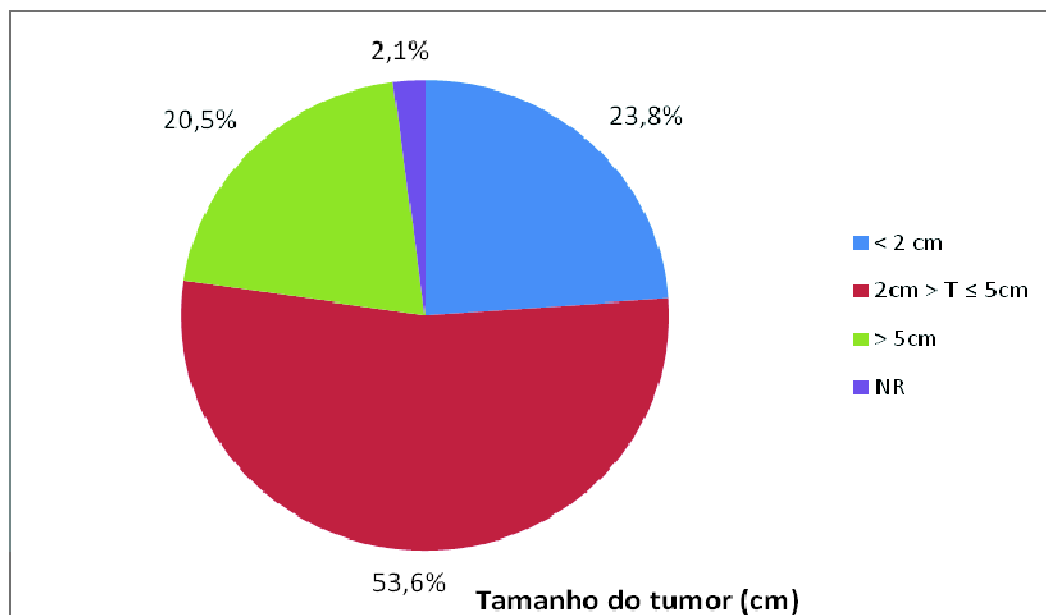


Figura 10 - Distribuição dos casos de carcinomas mamários de acordo com o tamanho tumoral (cm).

Quanto ao grau de anaplasia do tumor, 19 tumores (8,0%) foram classificados com grau histológico I, 155 (64,8%) com grau histológico II, 48 tumores (20,1%) com grau histológico III e 17 tumores não tiveram graduação histológica determinada (7,1%) (Figura 11).

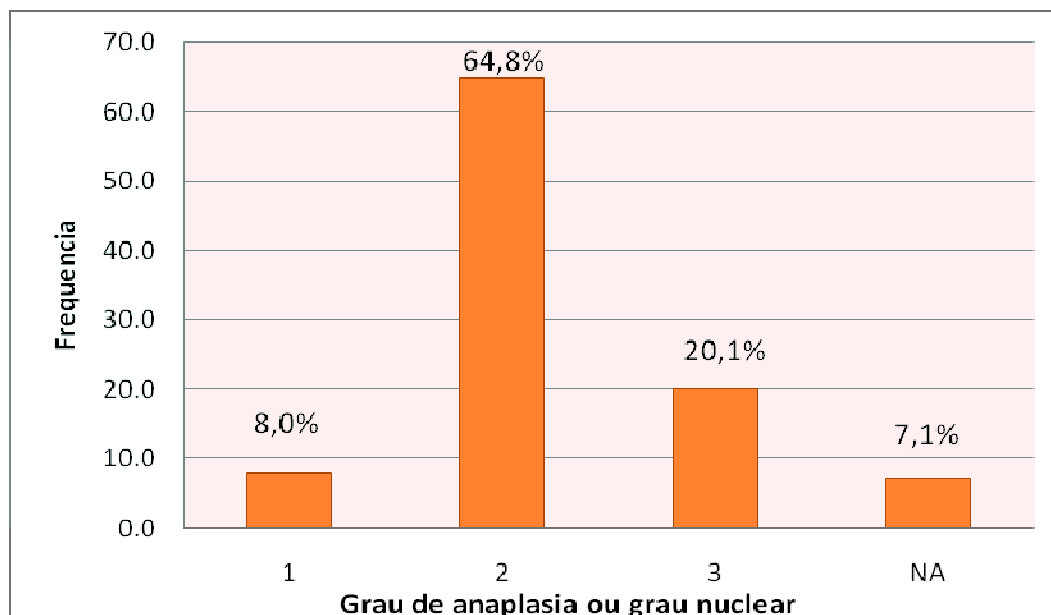


Figura 11 - Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com o grau de anaplasia do tumor.

Quanto ao tipo histológico, o carcinoma ductal infiltrante foi o mais frequente, com 228 casos (95,4%), seguido do carcinoma medular com três casos (1,3%), carcinoma lobular infiltrante com dois casos (0,8%), carcinoma ductal *in situ* com um caso e carcinoma mucinoso com um caso para cada um deles (0,4%) e outros tipos histológicos com quatro casos (1,7%) (Figura 12).

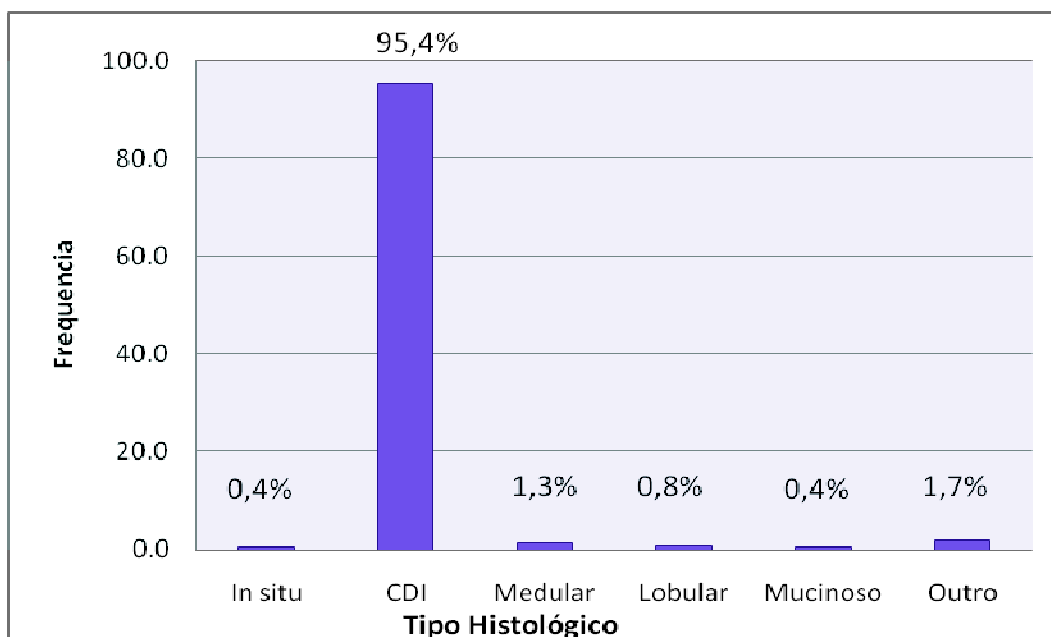


Figura 12 - Distribuição dos casos de carcinomas de mama acordo com o tipo histológico.

2 – Avaliação dos Marcadores Imunoistoquímicos

Todos os 239 casos de carcinomas mamários tiveram os dados de imunodeteção de receptores de estrógenos, receptores de progesterona e HER2 coletados a partir dos livros de registro do Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge. A imunodeteção de Ep-CAM foi avaliada em todos os casos. Destes 239 casos, onze apresentaram marcação insatisfatória ou inconclusiva, porque não apresentaram um padrão de marcação ideal ou não apresentaram material suficiente e foram excluídos desta análise, restando 228 casos avaliados. A superexpressão de Ep-CAM foi observada em 96 tumores (40,2%), a baixa expressão em 66 tumores (27,6%) e 66 tumores (27,6%) não apresentaram marcação (Figura 13).

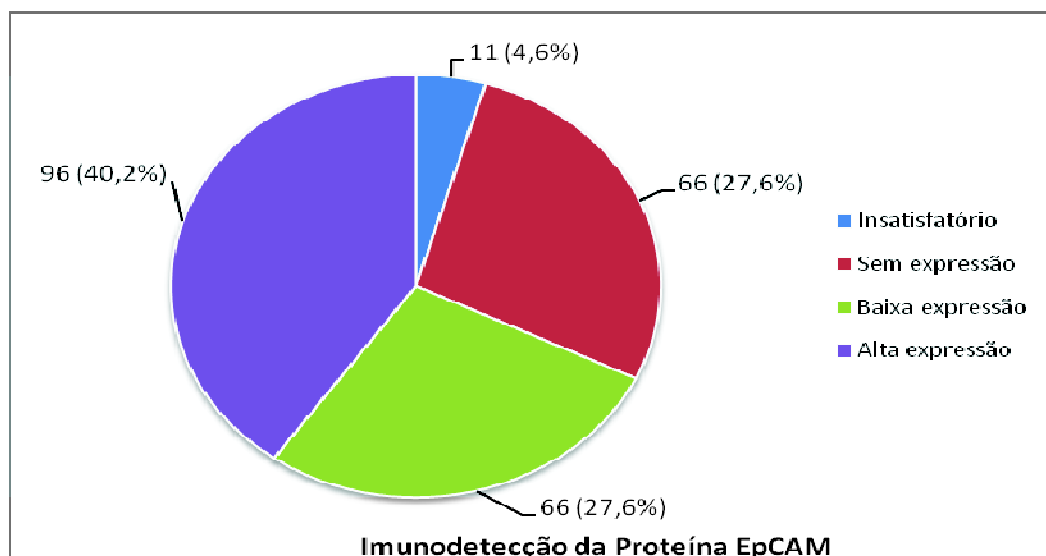


Figura 13 - Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteccção da Proteína Ep-CAM.

Quanto à imunodeteccção do receptor de estrógenos, 98 tumores foram positivos (41,0%) e 141 (59,0%) foram negativos. A imunodeteccção do receptor de progesterona foi positiva em 73 casos (30,5%) e negativa em 166 casos (69,5%). A superexpressão de HER2 ocorreu em 91 casos (38,1%) e em 148 casos (61,9%) não houve superexpressão de HER2 (Figura 14). Setenta e seis pacientes (31,8%) apresentaram tumores com o fenótipo triplo-negativo e 163 pacientes (68,2%) apresentaram fenótipo não triplo-negativo.

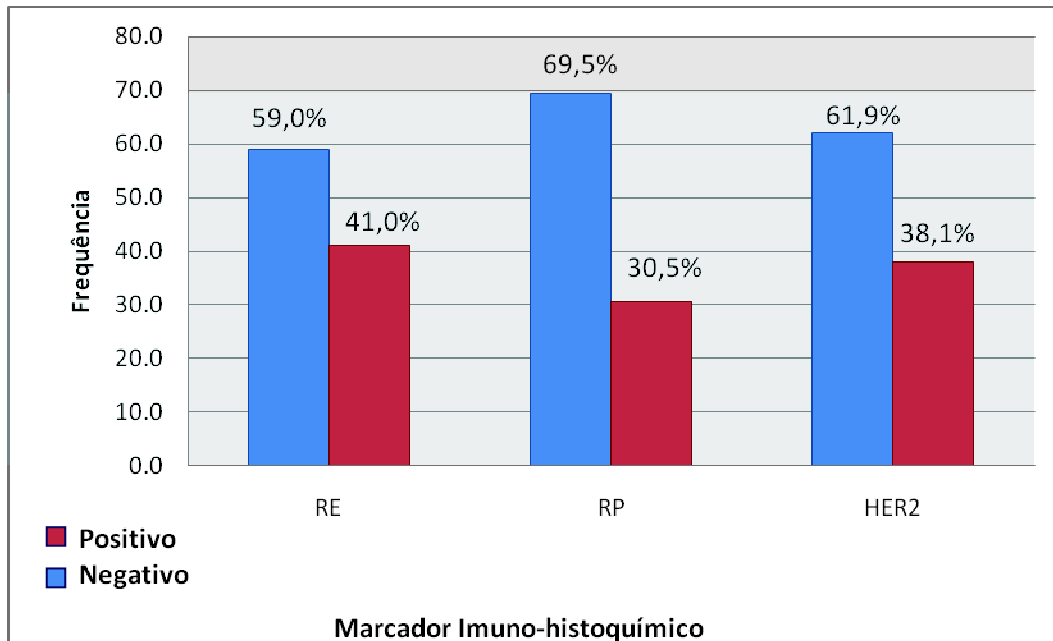


Figura 14 - Distribuição dos casos de carcinomas de mama de acordo com a imunodeteção de receptores hormonais e HER2.

3 – Análise da Sobrevida

3.1 Sobrevida global: Dentre as 239 pacientes analisadas, a sobrevida global em cinco anos foi de 68,2%, sendo que 163 pacientes estavam vivas ao final de 5 anos de seguimento, enquanto 76 pacientes foram a óbito (Figura 15).

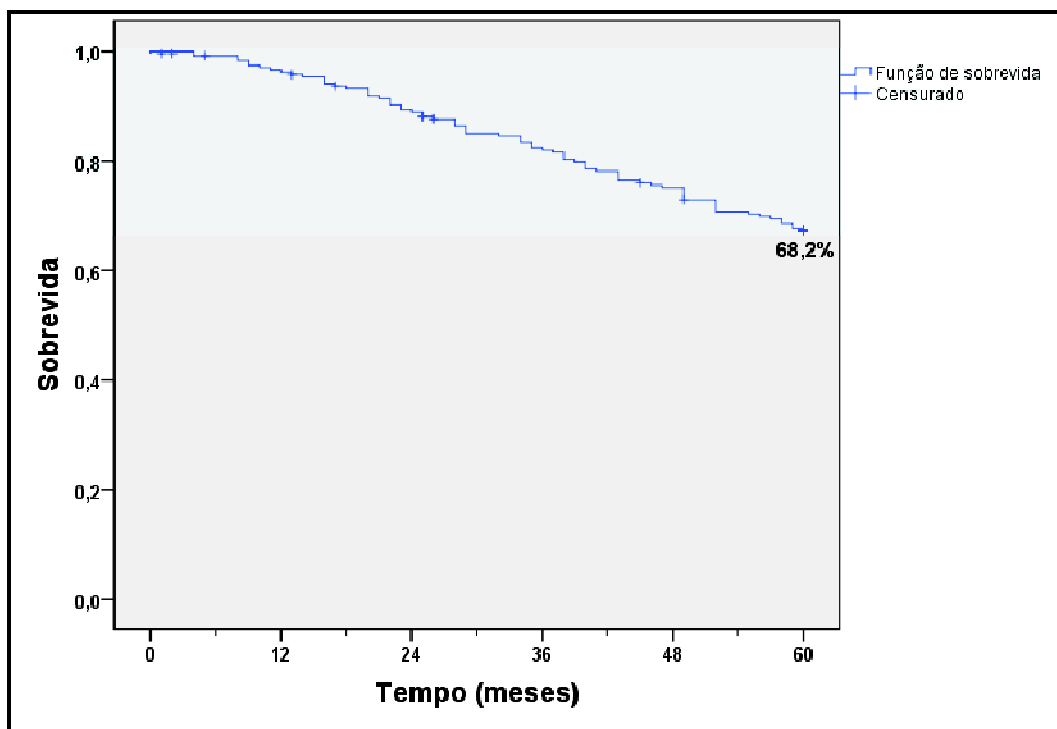


Figura 15: Sobrevida global em cinco anos para as pacientes estudadas.

Utilizando o teste de Log-rank, verificou-se que os fatores que influenciaram significativamente a sobrevivida das pacientes foram: o tamanho do tumor, o comprometimento de linfonodos regionais, o estadiamento clínico, a presença de metástases à distância, a presença do subtipo de carcinoma mamário triplo-negativo e a alta expressão de Ep-CAM.

3.2 Sobrevida e tamanho dos tumores

O tamanho do tumor foi um fator prognóstico que influenciou significativamente a sobrevivida do grupo estudado (Figura 16), uma vez que pacientes com tumores < 2 cm tiveram uma sobrevivida de 75,4%, comparadas com pacientes com tumores entre 2 e 5 cm, que tiveram a

sobrevida de 69,5% e pacientes com tumores > 5cm, cuja sobrevida foi de 53,1%, ao final dos cinco anos ($p = 0,024$).

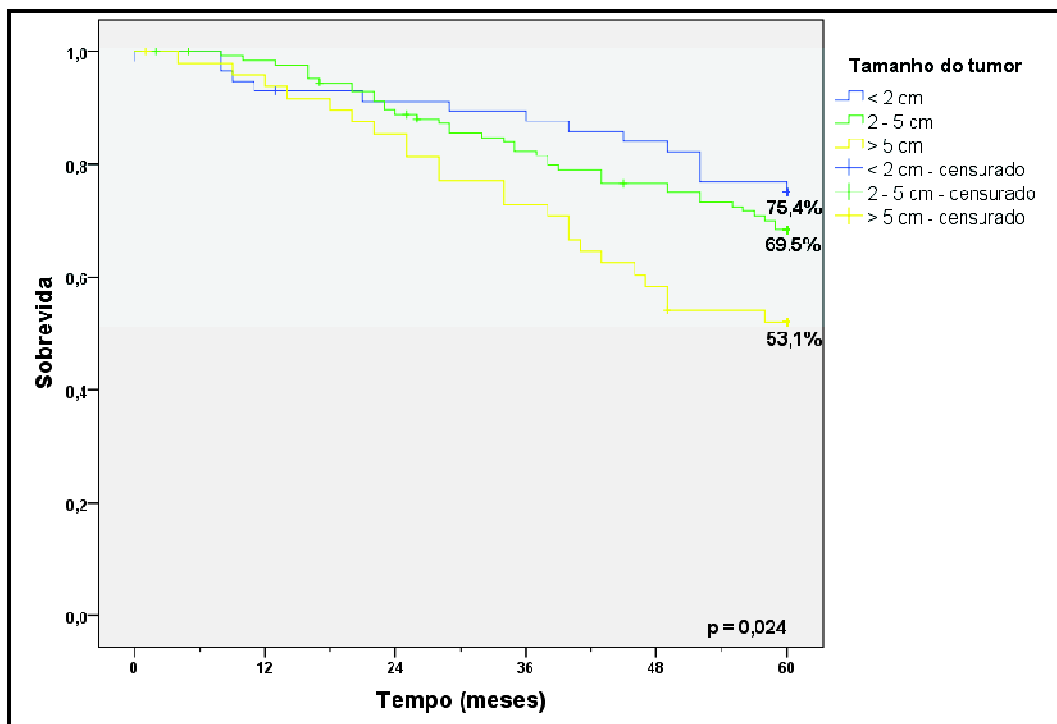


Figura 16: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com os diferentes tamanhos dos tumores.

3.3 Sobrevida e comprometimento linfonodal

O comprometimento dos linfonodos regionais mostrou-se um fator prognóstico importante, uma vez que a sobrevida global das pacientes sem comprometimento regional foi de 85,6%, 69,2% para as pacientes com 1-3 linfonodos comprometidos, 42,3% para o grupo com 4-9 linfonodos comprometidos e 34,1% para as pacientes que tinham 10 ou mais linfonodos comprometidos ($p < 0,001$) (Figura 17).

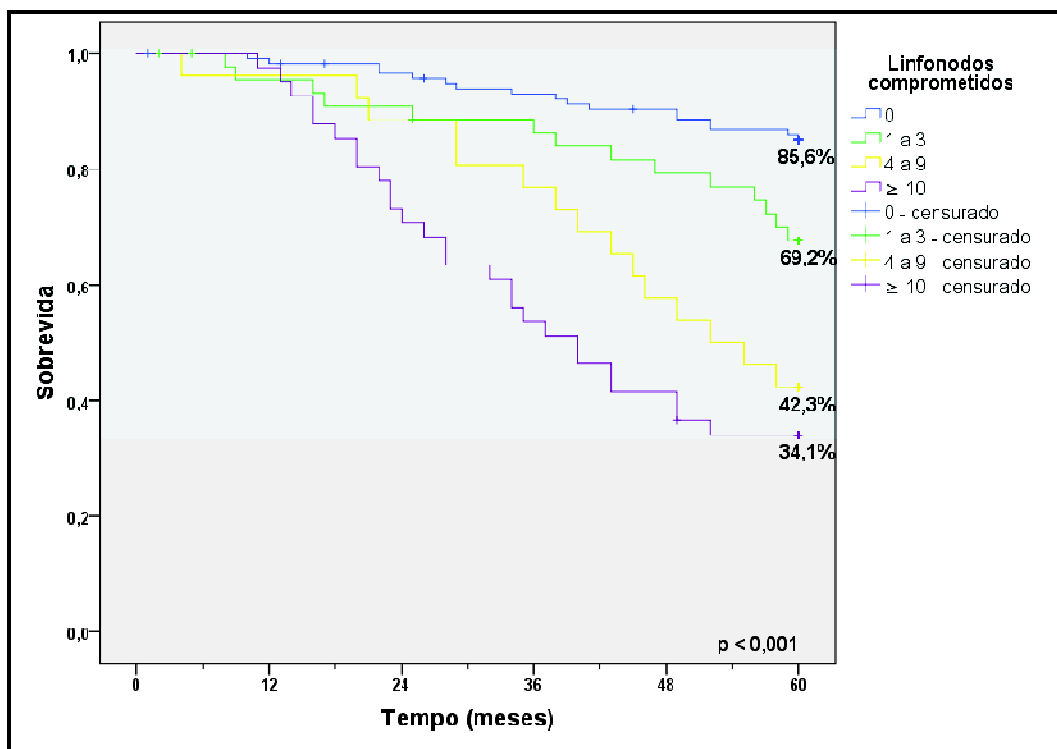


Figura 17: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o número e o comprometimento linfonodal axilar.

3.4 Sobrevida e estadiamento clínico

O estadiamento clínico representou um fator prognóstico estatisticamente significativo para as pacientes estudadas (Figura 18). A sobrevida foi de 95,7% para as pacientes com estágio I, 74,3% para as de estágio II, 44,1% para as de estágio III e 39,1% para as pacientes com estágio IV ($p < 0,001$).

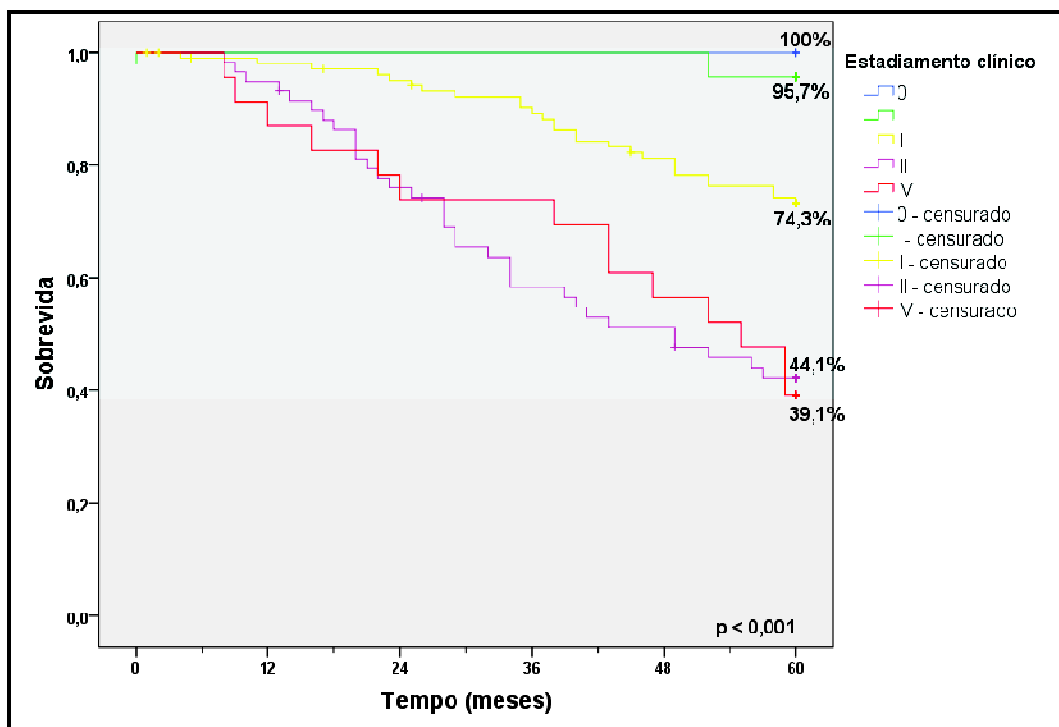


Figura 18: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com o estadiamento clínico.

3.5 – Sobrevida e metástases à distância

A presença de metástases à distância influenciou significativamente a sobrevida, como já era esperado, uma vez que as metástases representam uma das principais causas de óbito em pacientes portadores de qualquer tipo de câncer. A sobrevida em 5 anos nos casos com relato de metástase foi de 38,1%, contra 84,5% para as pacientes sem metástase. A Figura 19 demonstra a sobrevida com relação às metástases à distância ($p < 0,001$).

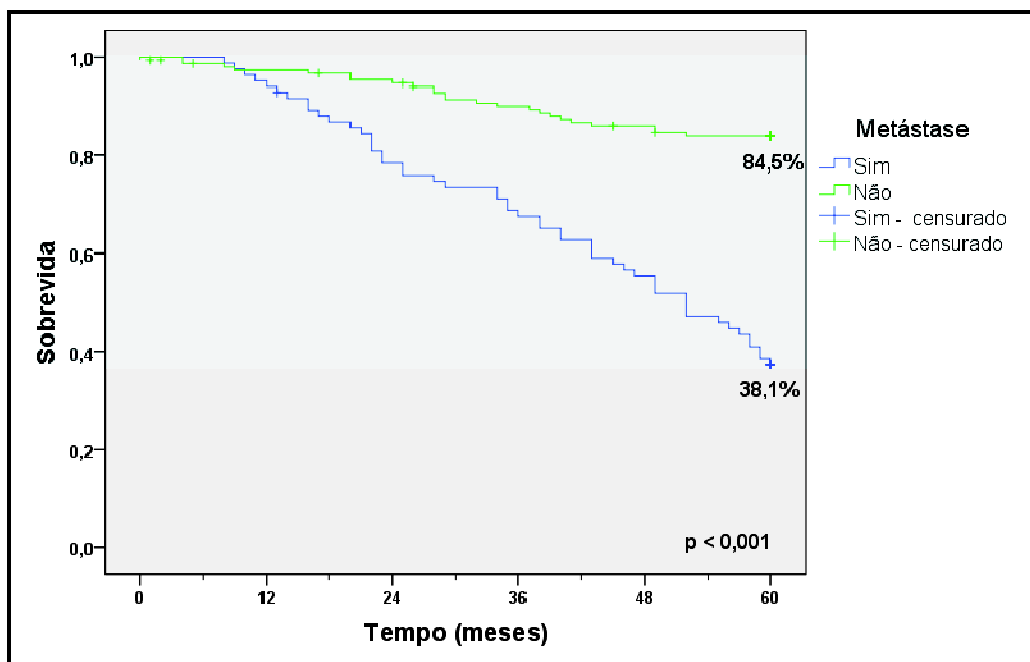


Figura 19: Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com a presença de metástases à distância.

3.6 Sobrevida e marcadores imunoistoquímicos

Com relação aos marcadores imunoistoquímicos, as pacientes foram divididas em dois grupos, incluindo aquelas que expressavam receptores de estrógeno/progesterona/HER2, denominadas não triplo-negativas (NTN) e aquelas que não expressavam esses receptores, denominadas triplo-negativas (TN). Comparando esses dois grupos de pacientes, observou-se sobrevida significativamente mais baixa (60%) para as pacientes TN, comparadas às NTN (72%) ($p = 0,011$) (Figura 20).

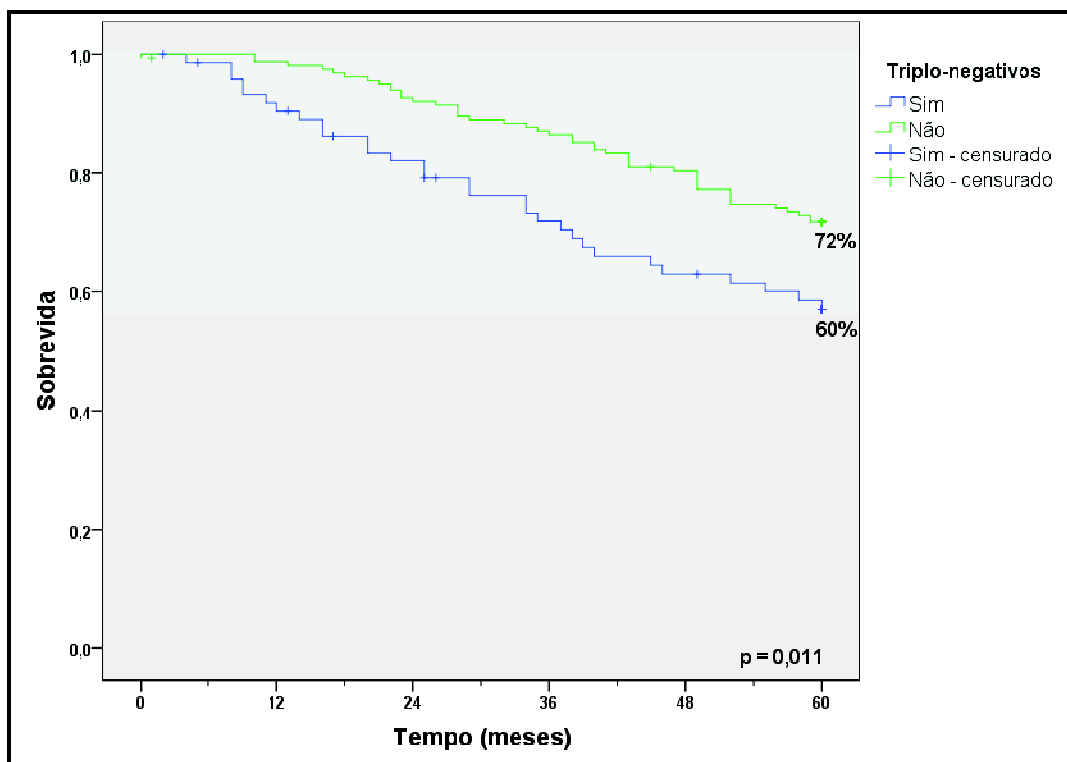


Figura 20. Sobrevida global em cinco anos avaliada de acordo com *status* de RE, RP e HER2.

3.7 Sobrevida e expressão de Ep-CAM

A expressão de Ep-CAM foi considerada satisfatória em 228 casos. Onze casos foram excluídos porque não apresentaram um padrão de marcação ideal ou não apresentaram material suficiente. Diferenças significativas na sobrevida das pacientes com relação à imunodeteção de Ep-CAM foram detectadas. As pacientes que hiperexpressavam a proteína Ep-CAM tiveram uma sobrevida de 57,3%, comparadas a 74,2% para as que tiveram uma baixa expressão e 78,8% para as que não apresentaram expressão da proteína ($p = 0,004$) (Figura 21).

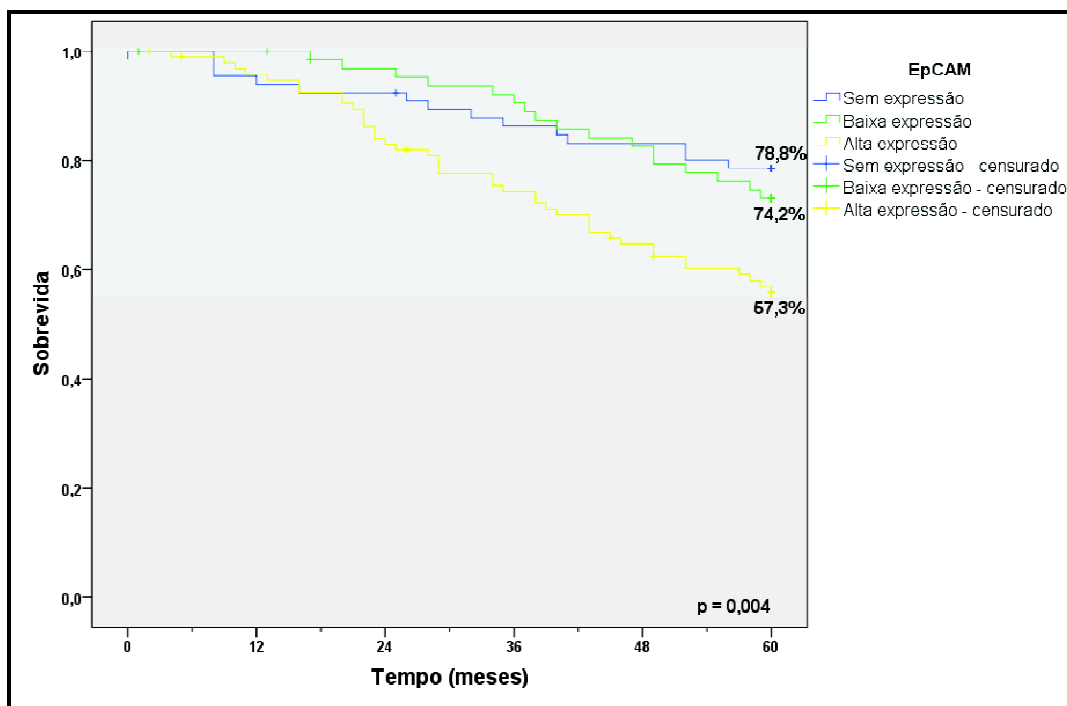


Figura 21: Sobrevivência global em cinco anos avaliada de acordo com a imunoposição da proteína Ep-CAM.

4 – Associações entre Imunodeteção da expressão de Ep-CAM e os parâmetros clinicopatológicos

Utilizando o teste do chi-quadrado, foram investigadas as possíveis associações entre a superexpressão de Ep-CAM com os seguintes parâmetros: grau histológico, grau nuclear, comprometimento dos linfonodos, tamanho do tumor, metástases à distância, *status* das pacientes, imunodeteção do receptor de estrogênio, do receptor de progesterona, de HER2 e o subtipo triplo-negativo. Dentre esses parâmetros, verificaram-se associações significativas entre a superexpressão da proteína Ep-CAM e a ausência de metástases à distância, o óbito das pacientes, a ausência do receptor de estrogênio e progesterona e o fenótipo triplo-negativo. Segue abaixo a tabela 2 com os dados associados.

Tabela 2: Associações entre a imunodeteção da superexpressão de Ep-CAM e os parâmetros clinicopatológicos.

Característica	no. pacientes	Superexpressão de Ep-CAM				P
		Não		Sim		
		no.	%	no.	%	
Linfonodos						
Negativo	112	71	63,4	41	36,6	0,1105
Positivo	108	56	51,9	52	48,1	
Não relatados	8	5	62,5	3	37,5	
Tamanho do tumor						
Até 5 cm	177	101	57,1	76	42,9	0,9743
Acima de 5 cm	46	27	58,7	19	41,3	
Não relatados	5	4	80	1	20	
TNM						
0, I e II	148	89	60,1	59	39,9	0,3834
III e IV	79	42	53,2	37	46,8	
Não relatados	1	1	100	0	0	
Status						
Óbito	72	31	43,1	41	56,9	0,0034
Vivo	143	93	65	50	35	
Não relatados	13	8	61,5	5	38,5	
Metástases						
Não-metastático	148	95	64,2	53	35,8	0,0132
Metastático	80	37	46,2	43	53,8	
RE						
Negativo	136	67	49,3	69	50,7	0,0021
Positivo	92	65	70,6	27	29,4	
RP						
Negativo	157	82	52,2	75	47,8	0,015
Positivo	71	50	70,4	21	29,6	
HER2						
Negativo	138	79	57,2	59	42,8	0,9137
Positivo	90	53	58,9	37	41,1	
Triplo-negativo						
Negativo	157	99	63,1	58	36,9	0,0276
Positivo	71	33	46,5	38	53,5	
Grau nuclear						
Grau 1	19	13	68,4	06	31,6	0,3841
Grau 2 e 3	194	107	55,2	87	44,8	
Não relatados	15	12	80,0	03	20,0	

IX – DISCUSSÃO

A proteína Ep-CAM foi o primeiro antígeno associado a tumores identificado com o uso de anticorpos monoclonais e a primeira a ser alvo de terapia sistêmica com o uso de anticorpos dirigidos contra ela. O tratamento com o anticorpo anti-Ep-CAM, posteriormente denominado Edrecolomab ou Panorex, também foi o primeiro a apresentar eficácia clínica em cânceres humanos em termos de prolongamento da sobrevida (Baeuerle & Gires, 2007).

Recentemente, o papel de Ep-CAM como uma molécula de adesão celular foi reforçado pela observação que esta proteína, além de adesão, participa de outros processos específicos das moléculas de adesão, como proliferação, diferenciação, migração, regulação do ciclo celular e sinalização intracelular. Assim, Ep-CAM se caracteriza como uma molécula pleiotrópica que exerce um papel importante no surgimento, desenvolvimento, manutenção, reparo e função dos epitélios no organismo (Trzpis *et al.*, 2007).

Em um estudo com 205 pacientes, a superexpressão de Ep-CAM, detectada com o uso do anticorpo ESA, correlacionou-se significativamente com pior sobrevida ($p=0,0004$), independente do tamanho do tumor, status de linfonodos regionais, grau histológico e expressão de receptores hormonais (Gastl *et al.*, 2000).

Uma relação significativa foi estabelecida entre a expressão de Ep-CAM e os seguintes aspectos: comprometimento de linfonodos axilares, grau histológico e tamanho do tumor no estudo de Spizzo e colaboradores (2004). A sobrevida das pacientes também decresceu significativamente com o aumento da expressão de Ep-CAM, nos casos em que havia comprometimento de linfonodos axilares (Spizzo, 2004). O mesmo grupo (Spizzo *et al.*, 2011) realizou outro estudo sobre expressão de Ep-CAM, com 2.291 amostras de tumores primários e 108 metástases, definindo quatro subgrupos de expressão (sem expressão, fraca, moderada e

expressão intensa). Em pacientes com câncer de mama, foi observada a superexpressão de Ep-CAM em 46% de 188 amostras com carcinoma ductal invasivo. Em contraste, no câncer de mama lobular invasivo, houve uma baixa expressão de Ep-CAM, ou seja em 15% de 82 amostras (Spizzo, 2011).

No nosso estudo, a imunodeteção da proteína Ep-CAM foi avaliada nos 239 casos e uma diferença significativa na sobrevida global em cinco anos foi observada para as pacientes, cujos tumores exibiram diferentes níveis de expressão de Ep-CAM ($\rho = 0,004$). As pacientes que hiperexpressavam a proteína tiveram uma sobrevida de 57,3%, comparadas a 74,2%, para as que tiveram uma baixa expressão, e 78,8%, para as que não apresentaram expressão da proteína.

A proteína Ep-CAM pode estar relacionada às metástases ao exercer influência na adesão celular. Entretanto, a forma como a proteína Ep-CAM atua no desenvolvimento das metástases é ainda controversa. Por um lado, Ep-CAM preveniria a dispersão celular ao manter as células tumorais unidas em grupamentos. Por outro lado Ep-CAM poderia facilitar o escape de células da massa tumoral ao substituir a adesão mais forte promovida pelas moléculas de caderina (Balzar *et al.*, 1999a, Kim *et al.*, 2003). No nosso estudo, as metástases à distância foram relatadas para 84 pacientes (35,1%). Desses casos, 43 (53,8%) mostraram superexpressão da proteína Ep-CAM. Utilizando o teste do chi-quadrado, a superexpressão da proteína Ep-CAM correlacionou-se significativamente com a presença de metástases quando comparada com os casos em que a expressão de Ep-CAM estava ausente ($p=0,0132$), ou seja, é possível que a perda da expressão de Ep-CAM associe-se à maior capacidade metastática.

A presença de metástase também influenciou na sobrevida global em 5 anos na nossa casuística. Nos casos com relato de metástase à distância, a sobrevida foi de 38,1% contra 84,5% nas pacientes sem metástase.

A identificação apropriada de fatores prognósticos e parâmetros preditivos de resposta a tratamentos específicos continua a ser um desafio na individualização da melhor terapêutica para cada paciente com câncer de mama (Marinho, 2008). No Brasil, no que diz respeito ao câncer de mama, nos últimos anos, observa-se aumento nas taxas de mortalidade, atribuído principalmente, ao retardamento no diagnóstico e no estabelecimento de terapêutica adequada (Thuler & Mendonça, 2005).

O estágio da doença no momento do diagnóstico é geralmente o fator mais importante para determinar a sobrevida dos pacientes com câncer, uma vez que certos tratamentos só estão acessíveis para tumores detectados precocemente e são bem-sucedidos se iniciados antes da ocorrência de metástases (Brito, 2009). Estudos de base hospitalar que foram feitos em algumas regiões brasileiras foram comparados ao nosso estudo. Em hospital de referência do Rio Grande do Sul, no período de 1980 a 2000, foi encontrada uma sobrevida global em cinco anos de 87,7%. Outro estudo de base hospitalar conduzido em Belém (Pará) evidenciou sobrevida global em cinco anos bem inferior (61%), incluindo dados de todos os casos com diversas fases de estadiamento, e não apenas os casos cirúrgicos. Abreu em 2002 analisou a sobrevida global em cinco anos, em coorte de base populacional de Goiânia (Goiás), no período de 1988 a 1990, obtendo valores de 64%, tendo sido analisados todos os casos incidentes da doença no período. Em estudo conduzido com coorte hospitalar constituída por mulheres com diagnóstico de câncer de mama efetuado entre 2000 e 2002, em Florianópolis (Santa Catarina), foi verificada taxa de sobrevida após cinco anos de 76,2% (Guerra, 2009). Em nosso estudo, a proporção de pacientes em estágio III foi de 24,7% e em estágio IV foi de 9,6%, com uma sobrevida global em cinco anos de 44,1% e 39,1%, respectivamente, significativamente menor do que a sobrevida global constatada para o total das pacientes, que foi de 68,2%, condizendo com alguns dados da literatura descritos acima.

Em nossa casuística, as curvas de sobrevida foram significativamente influenciadas pelo comprometimento dos linfonodos regionais, o tamanho do tumor, o estadiamento clínico, as metástases à distância, o fenótipo triplo-negativo e a superexpressão da proteína Ep-CAM.

A ocorrência de metástases em linfonodos regionais é o mais poderoso e independente parâmetro prognóstico em mulheres com câncer de mama recentemente diagnosticado (Marinho, 2008). Em nosso estudo o número de linfonodos regionais comprometidos afetou a sobrevida das pacientes de forma estatisticamente significativa ($p < 0,001$).

O tamanho do tumor no momento do diagnóstico é fator determinante na indicação do tratamento conservador, além de se constituir ainda, nos casos de pacientes com ausência de comprometimento metastático dos linfonodos, o melhor preditor da recidiva da doença (Abreu & Koifman, 2002). Como mostrado em outros trabalhos, o tamanho do tumor correlacionou-se com a sobrevida global em cinco anos, das pacientes do nosso grupo amostral, uma vez que pacientes com tumores < 2 cm tiveram uma sobrevida de 75,4%, comparadas com pacientes com tumores entre 2 e 5 cm que tiveram a sobrevida de 69,5% e pacientes com tumores > 5 cm foi de 53,1%, ao final dos cinco anos ($p = 0.024$).

Atualmente, as pacientes portadoras de câncer de mama triplo-negativo apresentam um conjunto de fatores que levam a considerar que esse tipo de patologia seja mais grave do que aquela manifestada nas demais pacientes com câncer de mama. Além de serem portadoras de subtipo de neoplasia intrinsecamente mais agressiva, essas pacientes também não se beneficiam de alguns tratamentos dirigidos aos alvos moleculares altamente efetivos, como o trastuzumabe, para os tumores HER2 positivos, ou as terapêuticas hormonais utilizadas no tratamento dos tumores que expressam seus receptores (Fernandes *et al*, 2009).

Schmidt e colaboradores, em 2008, analisaram num estudo tipo coorte a expressão de Ep-CAM em 402 pacientes de uma única instituição, por imunohistoquímica, verificando que 70 tinham o fenótipo triplo-negativo. No referido estudo, foram encontradas associações significativas entre o grau-histológico, a superexpressão de Ep-CAM e de HER2 com uma pior sobrevida livre de doença. E foi sugerido que Ep-CAM poderia ser um alvo adequado para terapias específicas, particularmente em tumores triplo-negativos (Schmidt *et al.*, 2008).

Em nosso estudo, principalmente nos casos das pacientes triplo-negativas, observou-se significativa redução na sobrevida destas pacientes, 60%, quando comparadas com as pacientes não triplo-negativas, 72% ($p = 0.011$). Além disso, índices de marcação mais elevados da proteína Ep-CAM foram associados com tumores triplo-negativos ($p = 0,0276$).

A significativa associação entre a superexpressão de Ep-CAM e a menor sobrevida dos carcinomas mamários, observada neste estudo, permite-nos sugerir que a expressão imunohistoquímica de Ep-CAM seja utilizada como potencial marcador prognóstico em carcinomas mamários. A superexpressão de Ep-CAM nos tumores triplo-negativos sugere também a possibilidade da utilização de Ep-CAM como alvo terapêutico nesse grupo de tumores, que cursa com pior prognóstico e que não responde às terapias anti-tumorais convencionais.

X – CONCLUSÕES

Com base em nossos resultados podemos concluir que:

1 – Dentre as pacientes analisadas, a maioria tinha idades acima de 50 anos (51,5%) e apresentavam estágio clínico II (44,4%); 47,3% apresentavam comprometimento linfonodal, 53,6% apresentavam tumores com tamanhos intermediários ($2\text{ cm} < T \leq 5\text{ cm}$); 64,9% apresentavam tumores de grau nuclear ou de anaplasia II; o local mais frequente de metástases à distância foi o pulmão (32%) e a grande maioria dos tumores (95,4%) era representada por carcinomas ductais infiltrantes.

2 – Dentre os tumores de mama avaliados neste estudo, a proteína Ep-CAM esteve superexpressa em 40% dos casos.

3 – A sobrevida global em cinco anos para as pacientes analisadas foi de 68,2% e foi significativamente influenciada pelo tamanho dos tumores, o comprometimento de linfonodos regionais, a presença de metástases à distância, o estadiamento clínico, o fenótipo triplo-negativo e a superexpressão de Ep-CAM.

4 – Dentre as associações investigadas, resultados significativos foram observados entre a superexpressão de Ep-CAM e a ausência de receptores de estrógenos, a ausência de receptores de progesterona, o fenótipo triplo-negativo, a ausência de metástases à distância e a menor sobrevida das pacientes avaliadas.

XI – CONSIDERAÇÕES FINAIS

A detecção de Ep-CAM foi considerada neste estudo como uma ferramenta importante para avaliação prognóstica do câncer de mama e para selecionar pacientes candidatas à imunoterapia dirigida para esta proteína. Os carcinomas de mama com fenótipo triplo-negativo apresentam comportamento agressivo e não apresentam os alvos terapêuticos comuns presentes nos carcinomas endócrino-sensíveis e naqueles que superexpressam HER2. Uma vez que a superexpressão de Ep-CAM foi observada em grande parte dos tumores triplo-negativos (63%), tais pacientes poderiam ser beneficiadas com tratamentos dirigidos para Ep-CAM.

Ao realizarmos o levantamento bibliográfico sobre o assunto abordado, notamos que o Brasil ainda se mantém ausente na produção científica sobre Ep-CAM. Sendo assim, destacamos a relevância deste estudo e sugerimos que mais pesquisas sejam desenvolvidas sobre esse marcador, especialmente considerando um número maior de pacientes com fenótipo triplo-negativo, ou enfocando as células iniciadoras de tumor (TICs) em câncer de mama, que também expressam níveis aumentados de Ep-CAM.

XII – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu E, Koifman S. Fatores prognósticos no câncer da mama feminina. *Rev Bras Cancerol.* 2002; 48(1):113-31.
- Anders CK, Carey LA. Biology, metastatic patterns, and treatment of patients with triple-negative breast cancer. *Clin Breast Cancer* 2009; 9 Suppl 2: S73–81.
- Arias V, Mazza PL, Funke MAA. Processamento tecidual para análise imunoistoquímica de receptores hormonais em carcinoma mamário: dois momentos em um laboratório de anatomia patológica; correlação dos resultados com método bioquímico. *Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial* 2003; 39(3): 223-8.
- Armstrong A, and Eck SL, Ep-CAM: a new therapeutic target for an old cancer antigen. *Cancer Biol. Ther.* 2003, 2, 320– 326.
- Bacchi LM, Corpa M, Bacchi CE, Carvalho FM. Caracterização anatomopatológica e imunofenotípica de carcinomas de mama em mulheres jovens. *Rev Bras Mastol.* 2009 Abr-Jun;n 19(2):42-46.
- Baeuerle PA, Gires O. Ep-CAM (CD326) finding its role in cancer. *Br J Cancer.* 2007; 96: 417–423.
- Balzar M, Prins FA, Bakker HAM, Fleuren GJ, Warnaar SO, Litvinov SL. The structural analysis of adhesions mediated by Ep-CAM. *Exp Cell Res.* 1999(a); 246:108–121.
- Balzar M, Winter MJ, de Boer CJ, Litvinov SV. The biology of the 17-1A antigen (Ep-CAM). *J Mol Med.* 1999(b); 77:699–712.

Berg JW. Clinical implications of risk factors for breast cancer. *Cancer* 1984; 53(3 Suppl): 589–91.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. ESTIMATIVA/2012. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2012.

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer. ESTIMATIVA/2010. Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2010.

Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Análise da Situação de Saúde. Sistema de Informações sobre Mortalidade (SIM) [Internet]. [citado 2011 ago]. Disponível em: <http://www.datasus.gov.br>

Braun S, Hepp F, Kentenich C, *et al*: Monoclonal antibody therapy with edrecolomab in breast cancer patients: Monitoring of elimination of disseminated cytokeratin-positive tumor cells in bone marrow. *Clin Cancer Res.*1999. 5: 3999-4004.

Brito C, Portela MC, Vasconcellos MTL. Sobrevida de mulheres tratadas por câncer de mama no estado do Rio de Janeiro. *Rev Saúde Pública* 2009; 43: 481-9.

Clagnan WS, Andrade JM, Carrara HHA, Tiezzi DG, Reis FJC, Marana HRC, *et al*. Idade como fator independente de prognóstico no câncer de mama. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008; 30(2): 67-74.

Cleator S, Heller W, Coombes RC: Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol* 2007, 8(3): 235-244.

Corrêa PB, Toralles MBP, Abe-Sandes K, Machado TMB, Bonfim TF, Meyer L, Abes-Sandes C, Nascimento I. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. *R. Ci. Méd. Biol.* 2010; 9(Supl.1): 3-7.

De Brot M, Soares FA, Stiepcich MM, Curcio VS, Gobbi H. Basal-like breast cancers: Clinicopathological features and outcome. *Rev Assoc Med Bras.* 2009; 55:529-34.

De Laurentiis M, Cianniello D, Caputo R, Stanzione B, Arpino G, Cinieri S, Lorusso V, De Placido S. Treatment of triple negative breast cancer (TNBC): current options and future perspectives. *Cancer Treatment Reviews.* 2010; 36: 3: S80-6; ISSN 0305-7372.

Dent R, Trudeau M, Pritchard KI. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res.* 2007; 13; 4429–4434.

Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol.* 2007; 14(6):419–430.

Dufloth RM, Arruda A, Heinrich JK, Schmitt F, Zeferino LC. The investigation of DNA repair polymorphisms with histopathological characteristics and hormone receptors in a group of Brazilian women with breast cancer. *Genet Mol Res* 2008, 1; 7(3): 574-582.

Dutra MC, Rezende MA, Andrade VP, Soares FA, Ribeiro MV, Paula EC, Gobbi H. Imunofenótipo e evolução de câncer de mama: comparação entre mulheres muito jovens e mulheres na pós-menopausa. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2009; 31(2): 54-60.

Ellsworth RE, Decewicz DJ, Shriver CD, Ellsworth DL: Breast cancer in the personal genomics era. *Curr Genomics* 2010; 11:146–161.

Fernandes GS, Calabrich A, Katz A. Câncer de mama triplo-negativo: aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos. *Rev Bras Mastol.* 2009; 19(2): 76-82.

Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, Ruby SG, O'Malley F, Simpson JF, Connolly JL, Hayes DF, Edge SB, Lichter A, Schnitt SJ .Prognostic factors in breast cancer: College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000; 124: 966-978.

Gadelha, MIP, Costa MR, Almeida RT. Estadiamento de tumores malignos-análise e sugestões a partir de dados da APAC. *Rev Bras Cancerol* 2005; 51(3): 193-9.

Gastl G, Spizzo G, Obrist P, Dünser M, Mikuz G. Ep-CAM overexpression in breast cancer as a predictor of survival. *The Lancet.* 2000; 356: 1981-1982.

Gonzalez-Angulo AM, Broglio K, Kau SW, Eralp Y, Erlichman J, Valero V, Theriault R, Booser D, Buzdar AU, Hortobagyi GN, Arun B. Women age < or = 35 years with primary breast carcinoma: disease features at presentation. *Cancer.* 2005, 103(12):2466-72.

Gostner JM, Fong D, Wrulich OA, Lehne F, Zitt M, Hermann M, Krobitsch S, Martowicz A, Gastl G, Spizzo G: Effects of Ep-CAM overexpression on human breast cancer cell lines. *BMC Cancer* 2011, 11:45.

Guerra MR, Gallo CVM, Mendonça CVM, Silva GA. Risco de câncer no Brasil: tendências e estudos epidemiológicos mais recentes. *Rev Bras Cancerol.* 2005;51:227-34.

Guerra MR, Mendonça GAS, Bustamante-Teixeira MT, Cintra JRD, Carvalho LM, Magalhães LMPV. Sobrevida de cinco anos e fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. *Cad Saúde Pública.* 2009; 25:2455-66.

Jemal A, Bray F, Center M M, Ferlay J, Ward E, Forman D. Global cancer statistics. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, 2011; 61: 69–90. doi: 10.3322/caac.20107

Kaplan EL, Meier P. Nonparametric estimation from incomplete observations. *J Am Stat Assoc.* 1958; 53: 457-81.

Kim JH, Herlyn D, Wong K, Park DC, Schorge JO, Lu KH, Skates SJ, Cramer DW, Berkowitz RS, Mok SC. Identification of epithelial cell adhesion molecule autoantibody in patients with ovarian cancer. *Clin Cancer Res.* 2003; 9: 4782-4791.

Linnenbach AJ, Seng BA, Wu S, Robbins S, Scollon M, *et al.* Retroposition in a family of carcinoma-associated antigen genes. *Mol Cell Biol.* 1993; 13: 1507–1515.

Litvinov SV, Velders MP, Bakker HA, Fleuren GJ, Warnaar SO. Ep-CAM: a human epithelial antigen is a homophilic cell-cell adhesion molecule. *J Cell Biol.* 1994; 125:437–446.

Lund MJ, Butler EN, Bumpers HL, Okoli J, Rizzo M, Hatchett N, Green VL, Brawley OW, Oprea-Ilies GM, Gabram SG: High prevalence of triple-negative tumors in an urban cancer center. *Cancer* 2008, 113:608-615.

Maaser K, Borlak J. A genome-wide expression analysis identifies a network of Ep-CAM-induced cell cycle regulators. *Br J Cancer* 2008; 99: 1635–43.

Maetzel D, Denzel S, Mack B, Canis M, Went P, Benk M, Kieu C, Papior P, Baeuerle PA, Munz M, Gires O. Nuclear signalling by tumour-associated antigen Ep-CAM. *Nat Cell Biol* 2009; 11: 162–71.

Marinho VFZ, Metze K, Sanches FSF, Rocha GFS, Gobbi H. Marcadores moleculares em câncer de mama preditivos de metástases axilares. *Rev Assoc Med Bras.* 2008, v. 54, n. 3, p. 1-5.

Martins E, Freitas-Junior R, Curado MP, Freitas NM, De Oliveira JC, Silva CM. Temporal evolution of breast cancer stages in a population-based cancer registry in the Brazilian central region. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2009; 31(5):219-23.

Münz M, Murr A, Kvesic M, Rau D, Mangold S, Pflanz S, Lumsdem J, Volkland J, Fagerberg J, Reithmuller G, Ruttinger D, Kufer P, Baeuerle PA, Raum T. Side-by-side analysis of five clinically tested anti-Ep-CAM monoclonal antibodies. *Cancer Cell International* 2010; 10:44.

Münz, M., Baeuerle, P. A. and Gires, O. The emerging role of Ep-CAM in cancer and stem cell signaling. *Cancer Res.* 2009. 69, 5627-5629.

Osta WA, Chen Y, Mikhitarian K, Mitas M, Salem M, Hannun YA, Cole DJ, Gillanders WE (2004) Ep-CAM is overexpressed in breast cancer and is a potential target for breast cancer gene therapy. *Cancer Res.* 2004; 64: 5818–5824.

Perou, C.M.; Sørlie, T.; Eisen, M.B.; van de Rijn, M.; Jeffrey, S.S.; Rees, C.A.; Pollack, J.R.; Ross, D.T.; Johnsen, H.; Akslén, L.A.; Fluge, Ø.; Pergamenschikov, A.; Williams, C.; Zhu, S.X.; Lønning, P.E.; Børresen-Dale, A.L.; Brown, P.O.; Botstein, D. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*, 2000, 406, 747-752.

Pinho VFS, Coutinho ESF. Risk factors for breast cancer: a systematic review of studies with female samples among the general population in Brazil. *Cad Saude Pública* 2005; 21:351-60.

Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO: Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer* 2007, 109:25-32.

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

Ralhan R, He HC-H, So AK-C, Tripathi SC, Kumar M, *et al.* (2010) Nuclear and Cytoplasmic Accumulation of Ep-ICD Is Frequently Detected in Human Epithelial Cancers. *PLoS ONE*. 2010. 5(11): 14130. doi:10.1371.

Reis-Filho JS, Tutt NA. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 2008; 52: 108-18.

Salles, MA; Curcio VS, Perez AA, Gomes DS, Gobbi H. Contribuição da imunohistoquímica na avaliação de fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama e no diagnóstico de lesões mamárias. *J Bras Patol Med Lab* 2009. 45: 3: 213-22.

Sandhu DS, Sandhu S, Karwasra RK, Maswah S. Profile of breast cancer patients at a tertiary care hospital in north India. 2010. *India J Cancer*; 47:16-22.

Santana-Davila R, Perez EA. Treatment options for patients with triple-negative breast cancer. *J Hematol Oncol*. 2010;3:42.

Sasa M, Bando Y, Takahashi M, Hirose T, Nagao T. Screening for basal marker expression is necessary for decision of therapeutic strategy for triple-negative breast cancer. *J Surg Oncol* 2008; 97: 30–4.

Schmidt M, Hasenclever D, Schaeffer M, *et al*. Prognostic effect of epithelial cell adhesion molecule overexpression in untreated node-negative breast cancer. *Clin Cancer Res* 2008;14:5849–55.

Sclowitz ML, Menezes AMB, Gigante DP, Tessaro S. Conduas na prevenção secundária do câncer de mama e fatores associados. *Rev Saúde Pública* 2005; 39:340-9.

Simon B, Podolsky DK, Moldenhauer G, Isselbacher KJ, Gattoni-Celli S, Brand SJ. Epithelial glycoprotein is a member of a family of epithelial cell surface antigens homologous to nidogen, a matrix adhesion protein. *Cell Biol*. 1990; 87:2755-2759.

Silva AE, Serakides R, Cassali GD: Carcinogênese hormonal e neoplasias hormônio-dependentes. *Ciência Rural* 2004, 34:625-633.

Sobin LH, Wittekind Ch, editors. TNM classification of malignant *tumours*. 6^o ed. New York: Wiley-Liss, 2002.

Songun I, Litvinov SV, van de Velde CJ, Pals ST, Hermans J, van Krieken JH (2005) Loss of Ep-CAM (CO17-1A) expression predicts survival in patients with gastric cancer. *Br J Cancer* 92: 1767–1772.

Spizzo G, Fong D, Wurm M, Ensinger C, Obrist P, Hofer C, Mazzoleni G, Gastl G, Went P. Ep-CAM expression in primary tumour tissues and metastases: an immunohistochemical analysis. *J Clin Pathol*. 2011. doi:10.1136/jcp.2011.090274.

Spizzo G, Went P, Dirnhofer S, Obrist P, Simon R, Spichtin H, Maurer R, Metzger U, von Castelberg B, Bart H, Stopatschinskaya S, Köchli OR, Haas P, Mross F, Zuber M, Dietrich H, Bischoff S, Mirlacher M, Sauter G, Gastl G. High Ep-CAM expression is associated with poor prognosis in node-positive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat* 2004; 86:207–13.

Stoecklein NH, Siegmund A, Scheunemann P, Luebke AM, Erbersdobler A, Verde PE, Eisenberger CF, Peiper M, Rehders A, Esch JS, Knoefel WT, Hosch SB. Ep-CAM expression in squamous cell carcinoma of the esophagus: a potential therapeutic target and prognostic marker. *BMC Cancer*. 2006; 6: 165.

Szala S, Froehlich M, Scollon M, Kasai Y, Steplewski S, Koprowski H, Linnenbach A. Molecular cloning of cDNA for the carcinoma-associated antigen GA733–2. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990. 87:3542–3546.

Thuler LCS, Mendonça GA: Initial staging of breast and cervical cancer in Brazilian women. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2005, 27(11):656-660.

Thurm H, Ebel S, Kentenich C, *et al.* Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res* 2003; 9:2598–604.

Trzpis M, McLaughlin PM, de Leij LM, Harmsen MC Epithelial cell adhesion molecule: more than a carcinoma marker and adhesion molecule. *Am J Pathol* 2007; 171: 386–395.

van der Gun BT, Melchers LJ, Ruiters MH, de Leij LF, McLaughlin PM, Rots MG: Ep-CAM in carcinogenesis: the good, the bad or the ugly. *Carcinogenesis*. 2010, 31:1913-1921.

Varga M, Obrist P, Schneeberger S, Muhlmann G, Felgel-Farnholz C, Fong D, Zitt M, Brunhuber T, Schafer G, Gastl G, Spizzo G. Overexpression of epithelial cell adhesion molecule antigen in gallbladder carcinoma is an independent marker for poor survival. *Clin Cancer Res* 2004; 10: 3131–3136.

Vieira DSC, Dufloth RM, Schmitt FC, Zeferino LC. Carcinoma de mama: novos conceitos na classificação. *Rev Bras Ginecol Obstet* 2008; 30: 42-47.

Went PT, Lugli A, Meier S, Bund M, Mirlacher M, Sauter G, Dirnhofer S. Frequent Ep-CAM protein expression in human carcinomas. *Hum Pathol* 2004;35:122–8.

Went P, Vasei M, Bubendorf L, Terracciano L, Tornillo L, Riede U, Kononen J, Simon R, Sauter G, Baeuerle PA. Frequent high-level expression of the immunotherapeutic target Ep-CAM in colon, stomach, prostate and lung cancers. *Br J Cancer*. 2006; 94: 128–135.

Went P, Dirnhofer S, Schöpf D, Moch H, Spizzo G. Expression and prognostic significance of Ep-CAM. *J. Cancer Mol.* 2008; 3: 169–174.

Winter MJ, Nagtegaal ID, van Krieken JH, Litvinov SV. The epithelial cell adhesion molecule (Ep-CAM) as a morphoregulatory molecule is a tool in surgical pathology. *Am J Pathol* 2003; 163: 2139–48.

Ziegler A, Heidenreich R, Braumuller H, Wolburg H, Weidemann S, Mocikat R, Rocken M. “Ep-CAM, a human tumor-associated antigen promotes Th2 development and tumor immune evasion,” *Blood*, 2009. 113, 15, 3494–3502.

Zuccari DAPC, Berton CR, Terzian ACB, Ruiz CM. Fatores prognósticos e preditivos nas neoplasias mamárias –importância dos marcadores imuno-histoquímicos nas espécies humana e canina – estudo comparativo. *Arq Ciênc Saúde* 2008 out/dez;15(4):189-98.

XIII – ANEXOS

Anexo 1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidada para participar, como voluntária, em uma pesquisa. Após ser esclarecida sobre as informações a seguir e no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento. Você deverá assinar duas vias, uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvidas sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com os pesquisadores responsáveis, Dra. Vera A. Saddi ou Junelle Paganini nos telefones 9688-2044 ou 8186-1859. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa no telefone 3243-7050.

INFORMAÇÕES IMPORTANTES SOBRE A PESQUISA:

O trabalho é intitulado como “Avaliação molecular da proteína EP-CAM em pacientes com carcinoma ductal infiltrante (CDI) de mama”. Este termo de consentimento está sendo aplicado por Junelle Paganini, que participa do projeto. Esta pesquisa tem o objetivo de estudar uma proteína presente no câncer de mama, para tentar descrever suas características e descobrir se pode ser usada para auxiliar no diagnóstico e prognóstico do câncer de mama.

Uma vez que você aceite participar, no momento de sua cirurgia, o médico cirurgião entrará em contato conosco para que um pequeno fragmento do tumor seja coletado por nós para exame molecular. Você não sofrerá nenhum desconforto ou prejuízo além dos previstos na cirurgia. O fragmento será bastante pequeno e não vai interferir nos exames necessários para o diagnóstico convencional.

Essa pesquisa não tem interesses econômicos e não haverá nenhum pagamento ou gratificação financeira pela sua participação. Você não terá o direito de pleitear a nenhuma indenização devido a sua participação na pesquisa porque nenhuns procedimentos cirúrgicos ou medicamentosos extras serão feitos. A participação nesta pesquisa não favorecerá nenhum tratamento ou atendimento médico além daqueles normalmente praticados no Hospital.

Se você aceitar participar desta pesquisa, estará colaborando para um melhor entendimento de alguns detalhes do câncer de mama, o que poderá favorecer novos estudos e o desenvolvimento de formas auxiliares de diagnóstico e tratamento no futuro.

A sua participação terá início no momento anterior a sua cirurgia e possivelmente, você não será mais procurada. A pesquisa começa em janeiro e termina em dezembro de 2007.

Você tem toda a liberdade para aceitar ou não participar desta pesquisa, e tem também, todo o direito de desistir em qualquer momento, sem nenhum prejuízo para você. Garantimos ainda que todos os dados coletados serão utilizados apenas para esta pesquisa e guardaremos todos com sigilo, não informando para ninguém qualquer dado pessoal.

Pesquisador: _____.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO DA PESQUISA

Eu, _____, portadora do RG _____, CPF _____, registrada no Hospital Araújo Jorge pelo prontuário ou matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Avaliação Molecular da proteína EP-CAM em Pacientes com Carcinoma Ductal Infiltrante de Mama”, sob a responsabilidade do Dra. Vera A. Saddi como sujeita voluntária. Fui devidamente informada e esclarecida pela pesquisadora Junelle Paganini sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve à qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento.

Goiânia, ___/___/____.

Nome e assinatura da paciente ou responsável

Assinatura datiloscópica

Pesquisador responsável: _____.

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimento sobre a pesquisa e aceite da paciente em participar.

Testemunhas (não ligadas à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura _____

Nome: _____ Assinatura _____

*Observações complementares:

Anexo 2. PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

CEP/ACCG - COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
ASSOCIAÇÃO DE COMBATE AO CÂNCER EM GOIÁS

PROTOCOLO CEPACCG Nº 072/07

Goiânia, 01/02/2007

INVESTIGADOR (A) RESPONSÁVEL (IES): Prof. Flávio Monteiro Ayres, Dr. Gustavo Nogueira Caixeta, Dr. Élbio Cândido de Paula e Dra. Vera Aparecida Saddi.

TÍTULO: Avaliação molecular da proteína Ep-CAM em pacientes com carcinoma ductal infiltrante de mama, atendidos no Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás.

Área Temática: Grupo III

Local de Realização: ACCG/Hospital Araújo Jorge – Setor de Anatomia Patológica

Informamos que o Comitê de Ética em Pesquisa da ACCG **analisou e aprovou** o projeto de Pesquisa acima referido, juntamente com os documentos apresentados e os mesmos foram considerados em acordo com os princípios éticos vigentes.

Não há necessidade de aguardar o parecer da CONEP – Comissão Nacional de Ética em Pesquisa para iniciar a pesquisa.

O Pesquisador responsável deverá encaminhar ao CEPACCG, relatórios trimestrais do andamento da pesquisa, encerramento, conclusão(ões) e publicação(ões).

DR. GERALDO SILVA QUEIROZ
Coordenador do CEP/ACCG