



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PROGRAMA DE MESTRADO EM GENÉTICA

GABRIELA MOURA DE PAULA

---

O PAPEL PROGNÓSTICO DAS CÉLULAS INICIADORAS  
TUMORAIS (CIT) NO CÂNCER DE MAMA

---

Dissertação de Mestrado

Goiânia  
2014

GABRIELA MOURA DE PAULA

---

O PAPEL PROGNÓSTICO DAS CÉLULAS INICIADORAS  
TUMORAIS (CIT) NO CÂNCER DE MAMA

---

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pontifícia Universidade Católica de Goiás como requisito parcial para obtenção do Título de Mestre em Genética.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi

Dados Internacionais de Catalogação da Publicação (CIP)  
(Sistema de Bibliotecas PUC Goiás)

Paula, Gabriela Moura de.  
P324p O papel prognóstico das Células tronco tumorais (CIT) no  
câncer de mama [manuscrito] / Gabriela Moura de Paula – 2014.  
52 f. : il. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de  
Goiás, Programa de Mestrado em Genética, 2014.  
“Orientadora: Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi”.  
Bibliografia.

1. Mamas – Câncer. 2. Tumores. 3. Prognóstico. I. Título.

CDU 618.19-006(043)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS  
PRO-REITORIA DE GRADUAÇÃO

Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário  
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010  
Goiânia • Goiás • Brasil  
Fone: (62) 3946.1021 • Fax: (62) 3946.1397  
www.pucgoias.edu.br • prograd@pucgoias.edu.br

ATA COMPLEMENTAR Nº 94/2014

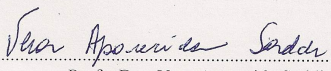
MESTRADO EM GENÉTICA DA PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

DISCENTE: GABRIELA MOURA DE PAULA

DEFENDIDA EM 29 DE AGOSTO DE 2014 E aprovada COM CONCEITO A

O título foi alterado  não ( ) sim

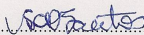
BANCA EXAMINADORA



Profª. Dra. Vera Aparecida Saddi  
(Presidente-orientador)



Prof Dr Paulo Roberto de Melo Reis / PUC Goiás  
(membro interno)



Profª. Dra. Silvia Helena Rabelo Santos / UFG  
(Membro externo)

Goiânia  
2014

Dedico este trabalho...

*A todas as mulheres que lutam contra o  
câncer de mama e a favor da vida.*

## Agradecimentos

---

Agradeço a Deus por todas as graças recebidas na minha vida: minha família, meus amigos e pela força que me faz prosseguir nos momentos difíceis.

Agradeço aos meus pais, pelo amor, pela dedicação, pela eterna paciência e acima de tudo por serem exemplos de bondade e ética profissional.

Agradeço ao meu namorado Tomás, meu filho Mateus e meus irmãos por entenderem tão bem as inúmeras ausências e por me oferecerem colo e palavras amigas em momentos difíceis.

À Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Vera Aparecida Saddi, agradeço de todo meu coração, não apenas por ter me orientado, mas acima de tudo, por não ter me permitido desistir.

À todos os meus amigos e colegas de trabalho, pela apoio e cumplicidade mostrados neste período de estudo.

Aos funcionários e professores do Programa de Mestrado em Genética, em especial ao professor Antônio Márcio Teodoro Cordeiro Silva, por todo o suporte na realização da meta-análise.

À PUC-GO pela estrutura e condições propiciadas para o desenvolvimento desta dissertação.

## Lista de figuras e tabelas

---

- Figura 1. Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para 2014 por sexo, exceto pele não melanoma ..... pg 12
- Figura 2. A função dos fatores prognósticos e preditivos .....pg 15
- Figura 3. Sítios de metástases à distância em tumores triplo-negativos e não-triplo-negativos .....pg 27
- Figura 4. Células -Tronco - Tecidos normais são originados de células-tronco que crescem e se diferenciam para criarem populações de células progenitoras e células maduras. As principais características da célula-tronco são a habilidade de auto-renovação (seta vermelha curva), habilidade de originar células de linhagens diferentes (células de cores diferentes) e importante capacidade proliferativa. As células-troco tumorais são originadas de células-tronco ou células progenitoras e em seguida crescem e se diferenciam para criar o tumor .....pg 28
- Figura 5. Cenários envolvendo as células-iniciadoras tumorais (CITs) – Papel das CITs. Primeiro, mutação de uma célula-tronco normal ou célula progenitora podendo levar à uma CIT e posteriormente a geração de um tumor primário (A). Segundo, durante o tratamento quimioterápico, a maioria das células tumorais são destruídas, mas se a CIT não for destruída, pode ocorrer recidiva (B). Terceiro, CIT podem se “desprender”da massa tumoral primária e migrar para sítios distantes, criando uma nova massa tumoral, metastática (C) .....pg 29
- Figura 6. Fluxograma da pesquisa de artigos científicos nas bases de dados disponíveis.....pg 35
- Figura 7 . *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e o fenótipo triplo-negativo ..... pg 39
- Figura 8. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a hiperexpressão de HER2..... pg 40
- Figura 9. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a presença de metástases linfonodais ..... pg 41

Figura 10. <i>Forest plot</i> para a meta-análise que avaliou a associação entre a expressão de ALDH e o fenótipo triplo-negativo.....	pg 42
Figura 11. <i>Forest plot</i> para a meta-análise que avaliou a associação entre a expressão de ALDH e a hiperexpressão de HER2.....	pg 43
Figura 12. <i>Forest plot</i> para a meta-análise que avaliou a associação entre a expressão de ALDH e a presença de metástases linfonodais .....	pg 44
Quadro 1 . Classificação histológica do carcinoma mamário invasivo .....	pg 14
Quadro 2. Grau histológico - sistema de graduação histológica de Nottingham (esquema de Scarff, Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis). .....	pg 18
Quadro 3. Grau histológico – Score total - sistema de graduação histológica de Nottingham (esquema de Scarff, Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis) .....	pg 18
Quadro 4. Escore de marcação de HER2 – Critérios para avaliação de HER2 por IHQ .....	pg 21
Quadro 5. Estadiamento clínico (cTNM) .....	pg 23
Quadro 6 . Estudos que avaliaram o fenótipo CD44+/CD24-/low e a expressão de ALDH em carcinomas mamários, utilizando imuno-histoquímica .....	pg 38
Quadro 7. Estudos que avaliaram a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e o fenótipo triplo-negativo .....	pg 39
Quadro 8 . Estudos que avaliaram a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a hiperexpressão de HER2.....	pg 40
Quadro 9 . Estudos que avaliaram a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a hiperexpressão de HER2.....	pg 41
Quadro 10 . Estudos que avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e o fenótipo triplo negativo.....	pg 42
Quadro 11 . Estudos que avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e a hiperexpressão de HER2 .....	pg 43
Quadro 12 . Estudos que avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e a presença de metástases linfonodais .....	pg 44



## Lista de abreviaturas

---

AJCC: American Joint Committee on Cancer

CDI: Carcinoma ductal invasivo

CITs: Células-iniciadoras tumorais

CLI: Carcinoma lobular invasivo

EU: *European Union*

FISH: hibridização fluorescente in situ (*fluorescence in situ hybridization*)

HER2: Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2

IHQ: Imuno-histoquímica

INCA: Instituto Nacional de Câncer

NTN: Não-triplo-negativo

OMS: Organização Mundial de Saúde

RE: Receptor de estrogênio

RFC: Receptor de fator de crescimento

RP: Receptor de progesterona

SCN: Sistema de Classificação de Nottingham

TN: Triplo-negativo

UK RCPATH : *Royal College of Pathologists*

## Resumo

---

O câncer de mama é o segundo câncer mais comum do mundo. É uma doença complexa e heterogênea com diversas características clínicas, histológicas, origem celular, mutações, prognóstico e possibilidades terapêuticas. Uma subpopulação de células com a capacidade de auto-renovação, proliferação celular e maior resistência à quimioterápicos tem sido descrita no câncer de mama, sendo estas denominadas células-iniciadoras tumorais (CITs). O objetivo deste trabalho consistiu em revisar e integrar, por meio de meta-análise, os estudos que investigaram as possíveis associações entre células iniciadoras tumorais, definidas pelo fenótipo CD44+/CD24-/low e expressão de ALDH, por método de imuno-histoquímica, e aspectos prognósticos do câncer de mama. Vinte estudos preencheram os critérios de inclusão para esta meta-análise, 13 avaliaram o fenótipo CD44+/CD24-/low, 11 avaliaram a expressão de ALDH e quatro estudos avaliaram ambos marcadores. Os resultados da meta-análise demonstram associações estatisticamente significativas entre o fenótipo triplo negativo e as CITs, incluindo tanto a expressão do fenótipo CD44+/CD24-/low ( $p < 0,0001$ ), como a expressão de ALDH ( $p = 0,0004$ ). Associações investigadas para a hiperexpressão de HER2 apresentaram resultados conflitantes, sendo que fenótipo CD44+/CD24-/low não foi associado de forma significativa à este parâmetro ( $p = 0,1989$ ), enquanto a expressão de ALDH esteve significativamente associada ao HER2 ( $p < 0,0001$ ). Uma associação inversa, porém, estatisticamente significativa, foi observada entre a presença de metástases linfonodais e o fenótipo CD44+/CD24-/low ( $p = 0,0047$ ), enquanto a expressão de ALDH não esteve significativamente associada a este parâmetro ( $p = 2019$ ). Com base nas análises realizadas, é possível concluir que os marcadores CD44+/CD24-/low e ALDH representam uma importante ferramenta na identificação de células tumorais nos carcinomas mamários e que as associações estatísticas observadas criam perspectivas importantes para o desenvolvimento de terapias moleculares baseadas na presença de CD44+/CD24-/low e de ALDH no tratamento dos carcinomas triplo negativos.

Palavras chave: câncer de mama, triplo negativo, células iniciadoras tumorais, prognóstico.

## Abstract

---

Breast cancer is the second most common cancer in the world. It is a complex and heterogeneous disease with diverse clinical features, cellular origin, histological types, mutations, prognosis and therapeutic possibilities. A subpopulation of cells with the ability of self-renewing, increased proliferation and resistance to chemotherapy has been described in breast cancer, named tumor-initiating cells (TICs). The aim of this study was to review and integrate, through meta-analysis, the studies that have investigated the possible associations between tumor-initiating cells, defined by CD44+/CD24-/low phenotype and ALDH expression, by using immunohistochemistry, and prognostic aspects of breast cancer. Twenty studies met the inclusion criteria for this meta-analysis, 13 evaluated the CD44+/CD24-/low phenotype, 11 evaluated the expression of ALDH and four studies evaluated both markers. The results of the meta-analysis demonstrated statistically significant associations between the triple negative phenotype and the CITs, including both the expression of CD44+/CD24-/low phenotype ( $p < 0.0001$ ), as the expression of ALDH ( $p = 0.0004$ ). Associations investigated for HER2 overexpression presented conflicting results, whereas CD44+/CD24-/low phenotype was not significantly associated with this parameter ( $p = 0.1989$ ), ALDH expression was significantly associated with HER2 ( $p < 0.0001$ ). An inverse association, however, statistically significant, was observed between the presence of lymph node metastases and CD44+/CD24-/low phenotype ( $p = 0.0047$ ), while the expression of ALDH was not significantly associated with this parameter ( $p = 2019$ ). Based on the analyses carried out, it can be concluded that the markers, CD44+/CD24-/low and ALDH, represent an important tool in identifying tumor initiating cells in breast carcinomas and that statistical associations observed in this study raise important perspectives for developing molecular therapies based on presence of the CD44+/CD24-/low phenotype and ALDH expression in the treatment of triple-negative breast carcinomas.

Key words: breast cancer, triple negative, tumor initiating cells, prognostic.

## Sumário

---

1) Introdução.....	pg.12
2) Objetivos.....	pg.33
a. Objetivo geral.....	pg.33
b. Objetivos específicos.....	pg.33
3) Metodologia.....	pg.34
4) Resultados.....	pg.38
4.1. Descrição dos estudos.....	pg.38
4.2. Correlações entre os marcadores de células iniciadoras tumorais e os parâmetros clínicos.....	pg.38
4.2.1. CD44+/CD24-/low e o fenótipo triplo-negativo.....	pg.39
4.2.2. CD44+/CD24-/low e hiperexpressão de HER2.....	pg.40
4.2.3. CD44+/CD24-/low e metástase linfonodal.....	pg.41
4.2.4. ALDH e o fenótipo triplo-negativo.....	pg.42
4.2.5. ALDH e hiperexpressão de HER2.....	pg.43
4.2.6. ALDH e metástase linfonodal.....	pg.44
5) Discussão.....	pg.46
6) Conclusões e perspectivas futuras.....	pg.50
7) Referências.....	pg.51

## 1. Introdução

---

O câncer de mama é uma doença complexa e heterogênea no que se diz respeito às características clínicas, histológicas, origem celular, mutações, prognóstico, possibilidades e respostas terapêuticas. (CETIN et al., 2014).

Células iniciadoras tumorais (CITs) representam uma subpopulação celular distinta que constitui parte do volume tumoral, apresentando alta capacidade de proliferação e vida mais longa que as demais células tumorais (BERNARDI, et al., 2011). As CITs são capazes de formar tumores semelhantes àqueles dos quais se originaram, apresentam capacidade de auto-renovação, resistência à apoptose, crescimento independente e potencial metastático (DONTU et al., 2005).

No câncer de mama, as CITs são caracterizadas pelo fenótipo CD44+/CD24-/low e pela expressão de ALDH (AL-HAJJ et al., 2003; GINESTEIR et al., 2007; ALI et al., 2011; TSANG et al., 2012). A análise desses marcadores por meio de imunohistoquímica tornou-se possível nos últimos anos, permitindo o desenvolvimento de inúmeros estudos que avaliaram a presença de CITs em espécimes tumorais de arquivo, fixados em formol e incluídos em parafina. Entretanto, os resultados são controversos e dispersos, o que motivou a realização de uma meta-análise integrando o maior número possível de resultados.


Este estudo apresenta um referencial teórico sobre as principais características dos carcinomas mamários e uma meta-análise que integra estudos que avaliaram as possíveis associações entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a expressão de ALDH, que caracteriza a presença de CITs, e aspectos prognósticos do câncer de mama, incluindo o fenótipo triplo-negativo, a hiperexpressão de HER2 e o comprometimento metastático de linfonodos regionais.

### 1.1 Epidemiologia do câncer de mama

O câncer de mama é o segundo câncer mais comum do mundo, sendo o mais frequente entre as mulheres, estimando 1,67 milhões de novos casos diagnosticados em 2012 (25% de todos os casos de câncer). O câncer de mama é a quinta maior causa de

morte entre todos os casos de câncer e a maior causa de morte entre as mulheres de países em desenvolvimento (324.000 mortes, 14,3% do total). É também a segunda maior causa de morte por câncer em países desenvolvidos (198.000 mortes, 15,4%), perdendo apenas para o câncer de pulmão (GLOBOCAN 2012). Estima-se que, no Brasil, serão diagnosticados 57.120 novos casos de câncer de mama no ano de 2014 (Figura 1), um risco estimado de 56,09 casos a cada 100 mil mulheres.

**Figura 1.** Distribuição proporcional dos dez tipos de câncer mais incidentes estimados para o ano de 2014 por sexo, exceto pele não melanoma

	<b>Localização primária</b>	<b>casos novos</b>	<b>%</b>
<b>Mulheres</b> 	Mama Feminina	57.120	20,8%
	Cólon e Reto	17.530	6,4%
	Colo do Útero	15.590	5,7%
	Traqueia, Brônquio e Pulmão	10.930	4,0%
	Glândula Tireoide	8.050	2,9%
	Estômago	7.520	2,7%
	Corpo do Útero	5.900	2,2%
	Ovário	5.680	2,1%
	Linfoma não Hodgkin	4.850	1,8%
	Leucemias	4.320	1,6%

Fonte: Adaptado de INCA 2014

Em Goiás, são estimados 1.500 novos casos no ano de 2014. Nos últimos 40 anos, a sobrevivência vem aumentando nos países desenvolvidos, sendo atualmente de 85% em cinco anos, enquanto, nos países em desenvolvimento, permanece com valores entre 50% e 60%. O câncer de mama é a maior causa de morte por câncer nas mulheres em todo o mundo, com cerca de 520 mil mortes estimadas para o ano de 2012 (INCA 2014).

## 1.2 Fatores de risco para o câncer de mama

Vários fatores de risco para o câncer de mama já foram identificados. A história familiar aumenta até três vezes a chance de câncer de mama, assim como algumas mutações que aumentam de forma significativa este risco, particularmente nos genes BRCA1, BRCA2 e p53. No entanto, estas mutações são responsáveis apenas por uma pequena parcela de casos. Fatores reprodutivos associados à exposição prolongada de estrogênios endógenos, como menarca precoce, menopausa tardia e idade avançada à primeira gestação são considerados os fatores de risco mais importantes no desenvolvimento do câncer de mama (IARC, 2008). Excluindo os fatores reprodutivos, os fatores de risco mais importantes são uso abusivo de álcool, a obesidade e o sedentarismo.

### 1.3 Classificação histológica do câncer de mama

Carcinomas invasivos da mama são subdivididos de acordo com seu padrão de crescimento e grau de diferenciação (quanto à semelhança do tumor com o tecido mamário normal). Apesar do tipo histológico fornecer informações prognósticas importantes, a maioria dos tumores não tem características especiais específicas (RAKHA et al., 2010). De acordo com a quarta edição da classificação de tumores de mama da Organização Mundial de Saúde (OMS), em relação aos tumores invasivos, são reconhecidos o carcinoma mamário invasivo de tipo não especial e mais de 20 tipos histológicos especiais definidos predominantemente por critérios morfológicos (GOBBI, et al., 2012) (Quadro1).

Usualmente identificado na prática médica como carcinoma ductal invasivo (CDI), o carcinoma mamário invasivo de tipo não especial corresponde a cerca de 70% dos casos, sendo definido como uma neoplasia epitelial mamária invasiva que não preenche critério para nenhum tipo especial (SINN, et al 2013). Portanto, por definição, constitui um grupo de tumores bastante heterogêneo. Já os tipos histológicos especiais são mais homogêneos, com critérios diagnósticos mais rígidos, dos quais o carcinoma lobular invasivo (CLI) é o mais prevalente (~15%). Entretanto, é importante frisar que não é incomum uma mesma neoplasia apresentar áreas com diferentes morfologias, sendo denominadas neoplasias de padrão misto ( GOBBI, et al., 2012; SINN, et al., 2013).

Tabela 1: Classificação histológica do carcinoma mamário invasivo

---

<b>Tipos histológicos</b>
Carcinoma invasivo de tipo não especial
Carcinoma lobular invasivo
Carcinoma tubular
Carcinoma cribriforme
Carcinoma com características medulares
Carcinoma metaplásico
Carcinoma com diferenciação apócrina
Carcinoma adenoide cístico
Carcinoma mucoepidermoide
Carcinoma polimorfo
Carcinoma mucinoso e carcinoma com células em anel de sinete
Carcinoma com características neuroendócrinas
Carcinoma papilífero invasivo
Carcinoma micropapilífero invasivo
Carcinoma secretor
Carcinoma oncocítico
Carcinoma sebáceo
Carcinoma rico em lipídeos
Carcinoma de células claras rico em glicogênio
Carcinoma de células acinares

---

Fonte: (OMS, 2012)

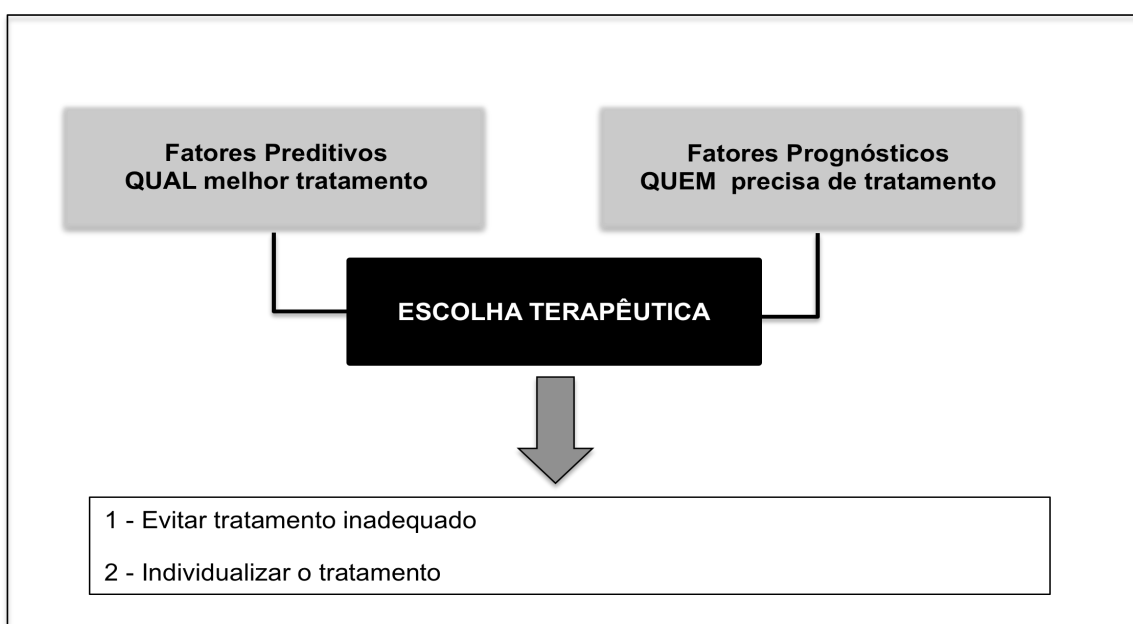
#### 1.4 Fatores prognósticos e preditivos para o câncer de mama

Fatores prognósticos são parâmetros possíveis de serem mensurados no momento do diagnóstico e que servem como preditor da evolução do tumor e da sobrevida do paciente. Uma variedade de fatores clínicos e patológicos são rotineiramente utilizados para categorizar pacientes com câncer de mama, a fim de avaliar o prognóstico e determinar o tratamento adequado (MACIEJCZYK et al., 2013). Estes fatores são: idade do paciente, comprometimento linfonodal, tamanho do tumor, características histológicas (principalmente grau histológico), expressão de receptores



hormonais e expressão de HER2 (FITZGIBBONS et al., 2000; SCHNITT et al., 2010; RAKHA et al., 2010; MACIEJCZYK et al., 2013). Tradicionalmente, fatores prognósticos auxiliam os médicos na escolha de quais pacientes necessitam ou não de terapia adjuvante, enquanto os fatores preditivos indicam qual terapia é a mais apropriada para cada paciente (Figura 2). Logo, o maior benefício da classificação prognóstica é identificar aqueles pacientes que não necessitam de terapia adjuvante e, portanto, evitar efeitos adversos desnecessários (LONNING et al., 2007).

**Figura 2.** A função dos fatores prognósticos e preditivo



Fonte: Adaptado LONNING et al., 2007

Neste contexto, os fatores prognósticos devem ser distinguidos dos fatores preditivos. Sendo os primeiros relacionados com a história natural da doença, enquanto os fatores preditivos estão relacionados com a resposta a um determinado tratamento. Alguns fatores, como receptores hormonais e expressão de HER2, são considerados tanto fatores prognósticos como fatores preditivos (BRADLEY et al., 2007)

Nos casos de câncer de mama em estágio inicial, os fatores clássicos mais utilizados na prática clínica incluem o comprometimento linfonodal, o tamanho do tumor e grau histológico. A graduação histológica Scarff-Bloom-Richardson, modificado por Nottingham (Elston-Ellis), conhecida como o Sistema de Classificação

de Nottingham (SCN), é o sistema de gradação recomendado por várias organizações internacionais como a Organização Mundial de Saúde (OMS), *American Joint Committee on Cancer (AJCC)*, *European Union (EU)*, and the *Royal College of Pathologists (UK RCPATH)*. A relevância prognóstica do SCN em câncer de mama foi inicialmente demonstrada em 1991 e posteriormente validada em vários estudos independentes (RAKHA et al., 2010).

#### 1.4.1 Fatores prognósticos clássicos para o câncer de mama

##### 1.4.1.1 Comprometimento linfonodal

O comprometimento linfonodal é o fator prognóstico mais importante no câncer de mama e tem se mostrado como o indicador mais importante de sobrevida livre de doença e sobrevida global (VERONESI et al., 1993; FITZGIBBONS et al., 2000; RAKHA et al., 2010;). Macrometástases (>0.2cm) tem papel prognóstico já bem definido, no entanto, a presença de micrometástases ainda não está bem estabelecida (BOER et al., 2010; GOLDBIRSCHE et al., 2011). A vasta maioria de pacientes com comprometimento linfonodal é candidata à terapia sistêmica adjuvante. Para aqueles casos sem linfonodos comprometidos, o tratamento adjuvante ainda é um desafio, pois a maioria destes é curada apenas com tratamento cirúrgico, sendo, portanto, de extrema importância a utilização de outros fatores prognósticos para melhor estratificação destes pacientes (WONG et al., 2002; BRADLEY et al., 2007).

##### 1.4.1.2 Grau histológico

O valor prognóstico do grau histológico foi validado em vários estudos independentes e em análises multivariadas. Os estudos demonstraram uma associação entre tumores de alto grau e outras variáveis de pior prognóstico como metástase linfonodal, tumores grandes, invasão linfovascular e expressão de biomarcadores de pior prognóstico como negatividade para receptor de estrogênio (RE), a expressão de HER2 e mutações em p53 (RAKHA et al., 2010). O grau histológico tem valor prognóstico equivalente ao do status linfonodal, sendo considerado melhor do que o do tamanho tumoral ( O'MALLEY ET AL., 2011). Todos os carcinomas mamários

invasivos devem ser graduados, exceto os carcinomas medulares, e deve-se especificar o sistema de graduação escolhido. O sistema de Nottingham (Scarff-Bloom-Richardson modificado por Elston-Ellis) é o mais recomendado mundialmente (FITZGIBBONS et al., 2000).

O grau histológico é baseado no grau de diferenciação do tecido tumoral e trata-se de uma avaliação semiquantitativa das características morfológicas (RAKHA et al., 2010; SCHNIT et al., 2010). O método é eficaz, de baixo custo e relativamente simples, necessitando apenas de adequado preparo do material (fixação adequado do tecido), escolha do bloco mais representativo e avaliação de acordo com recomendações internacionais e por patologista experiente (TAVASSOLI et al., 2003). O método de graduação envolve a análise de três componentes morfológicos e, para cada um deles, é dado o escore que pode variar de 1 a 3. Os componentes avaliados são: a) formação tubular/acinar; b) atipia nuclear/pleomorfismo; c) índice mitótico (Quadro 2). Após a avaliação de cada componente, individualmente, os escores são somados e, finalmente, é dado o grau histológico do tumor (Quadro 3) (TAVASSOLI et al., 2003; SCHNIT et al., 2010; O'MALLEY ET AL., 2011).

**Quadro 2.** Grau histológico - sistema de graduação histológica de Nottingham

\* Avaliação de mitoses em dez campos de grande aumento (objetiva de 40x com campo de 0,40 mm de diâmetro).

	<b>Escore 1</b>	<b>Escore 2</b>	<b>Escore 3</b>
<b>Formação tubular/acinar</b>	> 75% da área tumoral é formada por estruturas glandulares/acinares	10-75% da área tumoral é formada por estruturas glandulares/acinares	< 10% da área tumoral é formada por estruturas glandulares/acinares
<b>Atipia nuclear / pleomorfismo</b>	Núcleo pequeno, com discreto aumento de tamanho em relação às células epiteliais normais, contornos regulares e cromatina nuclear uniforme.	Células maiores do que as células epiteliais normais, núcleo vesiculoso, moderada variabilidade de forma e tamanho	Núcleo vesiculoso, nucléolo proeminente, acentuada variabilidade de tamanho e forma, ocasionalmente com células muito grandes e bizarras.
<b>Índice mitótico*</b>	≤ 4 mitoses	5 a 9 mitoses	≥ 10 mitoses

Fonte : Scarff, Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis

**Quadro 3. Grau histológico – Escore total** - sistema de graduação histológica de Nottingham

<b>Grau Histológico</b>	<b>Escore total</b>
<b>Grau 1</b>	3 a 5
<b>Grau 2</b>	6 ou 7
<b>Grau 3</b>	8 ou 9

Fonte: Scarff, Bloom e Richardson modificado por Elston e Ellis

#### 1.4.1.3 Tamanho do tumor

O tamanho do tumor é, há muito tempo, reconhecido como fator prognóstico independente e um fator preditor de metástase linfonodal, ou seja, tumores grandes têm sido associados com maior risco de metástase para linfonodos regionais (SEIDMAN et al., 1995; BRADLEY et al., 2012). A incidência de metástase linfonodal em pacientes com tumores menores que 1,0 cm varia de 10 a 20%, e aquelas pacientes com tumores menores que 1,0 cm e sem metástase linfonodal têm 10 anos de sobrevida livre de doença em 90% dos casos. Apesar de ser um bom fator prognóstico/ preditivo, este parâmetro apresenta algumas limitações como variações inter-observadores, medição macroscópica ou microscópica, medição em uma ou três dimensões, entre outras (FITZGIBBONS et al., 2000).

#### 1.4.2. Biomarcadores moleculares clássicos no câncer de mama

Os marcadores tumorais (ou biomarcadores) são substâncias presentes no tumor, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente por ele ou, secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do tumor (EISENBERG et al., 2001; MACIEJCZYK et al., 2013). Eles podem ser classificados em biomarcadores diagnósticos (utilizados na identificação da doença, na subtipagem ou no estadiamento),

biomarcadores prognósticos (promovendo uma estimativa da sobrevida e o risco de recorrência) e biomarcadores preditivos (identificando a chance de resposta ou risco de resistência a um determinado tratamento). Entretanto, vale ressaltar que um mesmo biomarcador pode exercer mais de uma destas funções (SCHNITT et al., 2010; O,MALLEY et al., 2011). A utilização dos biomarcadores na avaliação do prognóstico e para escolha terapêutica do câncer de mama tem crescido muito nos últimos anos. Muitos desses marcadores, foram inicialmente identificados através de estudos moleculares ou bioquímicos e podem agora ser localizados em cortes de tecido pelo uso da técnica de imuno-histoquímica (EISENBERG et al., 2001). Estudos mostram a existência de mais de 200 biomarcadores com potencial valor diagnóstico, prognóstico e preditivo no câncer de mama, no entanto, de todos eles, apenas três - receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e HER2 – são amplamente aceitos e recomendados nos testes de rotina, na avaliação de câncer de mama invasivo (O,MALLEY et al., 2011).

#### 1.4.2.1 Receptores hormonais

A avaliação da expressão de receptores hormonais é de extrema importância tanto prognóstica quanto preditiva. Como fator preditivo, a positividade destes marcadores prediz o benefício da terapia hormonal adjuvante, incluindo inibidores de aromatase, tamoxifeno e tratamento oral com moduladores de receptores de estrogênio. Como fator prognóstico, a positividade para receptores hormonais está associada à redução da mortalidade em comparação com as mulheres com receptores hormonais negativos (BRADLEY et al., 2012). A expressão do receptor de estrogênio (RE) é sem dúvida o mais importante biomarcador em câncer de mama, pois ele fornece o índice de sensibilidade ao tratamento endócrino. Tumores RE-positivos usam o esteróide hormonal estradiol como seu principal estímulo para crescimento. Os receptores de RE são, portanto, o alvo direto das terapias endócrinas. O tratamento com tamoxifeno, nos casos RE-positivos, reduz até 31% a taxa anual de morte por câncer de mama. A expressão do RP é fortemente dependente do presença de RE. Tumores expressando RP mas não o RE são incomuns e representam 1% de todos os casos de câncer de mama, nestes, alguns benefícios limitados com uso de tamoxifeno foram descritos, por isto a

terapia endócrina é ainda amplamente recomendada ( ALLRED et al., 2010; GOLDBHIRSCH et al., 2011;).

#### 1.4.1.2 HER2

O HER-2/neu, também denominado c-erbB-2 ou HER-2, é considerado um protooncogene humano, localizado no cromossomo 17q, responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana que atua como receptor de fator de crescimento (RFC) e apresenta atividade de tirosina quinase específica (ALLRED et al., 2010). Em quantidades normais, tem um papel importante no crescimento e desenvolvimento de uma vasta categoria de células epiteliais (VERMA et al., 2012). HER2 está envolvido em inúmeras vias importantes de regulação que envolvem proliferação, sobrevivência, motilidade celular e invasão. Slamon et al., em 1987, foram os pioneiros a relacionar a amplificação do gene HER2/neu com o prognóstico em pacientes com câncer invasivo de mama, demonstrando o valor da amplificação de HER2/neu como fator preditivo significativo de tempo livre de doença e de sobrevida geral em pacientes axila-positiva com câncer de mama (SALES et al., 2004). Tanto a amplificação do gene HER2, quanto a superexpressão da proteína, estão relacionadas com alto grau histológico, tamanho do tumor, status nodal, idade da paciente ao diagnóstico, assim como status de RE e pior evolução (O,MALLEY et al., 2011; WOLFF et al. 2013). A amplificação do HER2 ocorre em aproximadamente 20% dos casos de câncer de mama e está associado com diminuição da sobrevida (GOLDBHIRSCH et al., 2011; VERMA et al., 2012).

Há uma variedade de métodos disponíveis para a avaliação do estado de HER2 e estes podem ser divididos em métodos que pesquisam a amplificação do gene e em métodos que investigam a hiperexpressão da proteína HER2 (SALES et al., 2004). Atualmente, os dois métodos mais utilizados são imuno-histoquímica (IHQ) - para avaliação da superexpressão da proteína - e hibridização fluorescente in situ (FISH) - para detecção da presença ou ausência de amplificação gênica. Ambas tecnologias apresentam limitações, portanto, devem ser utilizadas de forma complementar. Na maioria das recomendações, sugere-se a utilização da IHQ e, em casos duvidosos, a utilização do FISH. Há um escore amplamente aceito para avaliação de HER2 pela IHQ (Quadro 4), em que os tumores são divididos em tumores HER2 negativos ( 0 ou 1+ ) ,

HER2 duvidosos (2+) e HER2 positivos (3+) (O,MALLEY et al., 2011; WOLFF et al. 2013).

**Quadro 4. Escore de marcação HER2 – Critérios para avaliação de HER2 por IHQ**

<b>Escore</b>	<b>Expressão HER2</b>	<b>Critérios de marcação</b>
0	Negativa	Sem marcação ou marcação de membrana em menos de 10% das células tumorais
1+	Negativa	Marcação de membrana fraca e parcial em mais de 10% das células tumorais
2+	Duvidosa	Marcação de membrana de fraca a moderada, em toda a membrana, em mais 10% e menos de 30% das células tumorais
3+	Positiva	Marcação de membrana forte e completa em menos de 30% das células tumorais.

Fonte: O,MALLEY et al., 2011

O grau de concordância entre IHQ e FISH é excelente nos casos em que os resultados são totalmente negativos (0 ou 1+) ou fortemente positivos (3+) pelo método de IHQ. Nos casos em que a positividade é fraca por IHQ (2+), apenas 10% a 30% revelam amplificação gênica pelo FISH (SALES et al., 2004; WOLFF et al. 2013). Tumores HER2 positivos (que hiperexpressam a proteína HER-2) respondem ao trastuzumabe, um anticorpo monoclonal que age diretamente contra o domínio extracelular da proteína HER2, e ao lapatinibe, um inibidor da tirosinoquinase, diferentemente dos tumores HER2 negativos. Vários estudos clínicos têm mostrado que a utilização de trastuzumabe adjuvante reduz a recidiva e mortalidade, em aproximadamente 50 e 30% respectivamente, naquelas pacientes que apresentam hiperexpressão de HER2 (GOLDHIRSCH et al., 2011; FIGUEREDO et al., 2013)

## 1.5 Tratamento do câncer de mama

Nos últimos 30 anos, o tratamento cirúrgico do câncer de mama sofreu profundas alterações e procedimentos menos mutiladores, com preservação importante do tecido mamário, foram disseminados (O,MALLEY et al., 2011). Os pontos-chave para determinação de um bom resultado oncológico do tratamento conservador são a integração entre o controle local e a sobrevida global e resultados semelhantes desta última quando comparada ao tratamento anteriormente considerado padrão ouro (mastectomia radical independente de estadiamento) (FIGUEREDO et al., 2013)

As modalidades terapêuticas disponíveis atualmente são a cirurgia e a radioterapia para o tratamento loco-regional e a hormonioterapia e a quimioterapia para o tratamento sistêmico. A indicação de diferentes tipos de cirurgia depende do estadiamento clínico, que consiste na avaliação do tamanho do tumor, comprometimento linfonodal e presença ou não de metástases (Quadro 5) e do tipo histológico. A cirurgia pode ser conservadora, ressecção de um segmento da mama (engloba a setorectomia, a tumorectomia alargada e a quadrantectomia), com retirada dos gânglios axilares ou linfonodo sentinela, ou não-conservadora (mastectomia) (O,MALLEY et al., 2011).



### Quadro 5. Estadiamento clínico (cTNM)

#### Mama

Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	<= 2 cm
T1mic	<= 0,1 cm
T1a	> 0,1 cm até 0,5 cm
T1b	> 0,5 cm até 1 cm
T1c	> 1 cm até 2 cm
T2	> 2 cm até 5 cm
T3	> 5 cm
T4	Parede torácica/pele
T4a	Parede torácica
T4b	Edema / ulceração cutânea, nódulos cutâneos satélites
T4c	Ambos T4a e T4b
T4d	Carcinoma inflamatório

#### Linfonodos

N1	Linfonodos axilares móveis		
pN1mi	Micrometástase, > 0,2 mm, <= 2 mm		
pN1a	1-3 linfonodos axilares		
pN1b	Linfonodos mamários		
	Internos com metástase		
	Microscópica por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente		
pN1c	1-3 linfonodos axilares e mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodo sentinela, mas não clinicamente aparente		
N2a	Linfonodos axilares fixos		
pN2a	4-9 linfonodos axilares		
N2b	Linfonodos mamários internos, clinicamente aparentes		
pN2b	Linfonodos mamários internos, clinicamente aparentes, sem linfonodos axilares		
N3a	Linfonodos infra-claviculares		
pN3a	>= 10 linfonodos axilares ou infra-claviculares		
N3b	Linfonodos mamários internos e axilares		
pN3b	Linfonodos mamários internos, clinicamente aparentes, com linfonodo(s) axilar(es) ou >3 linfonodos axilares e mamários internos com metástase microscópica por biópsia de linfonodos sentinela, mas não clinicamente aparente		
N3c	Linfonodos supra-claviculares		
pN3c	Linfonodos supraclaviculares		
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio IT1 <sup>1</sup>	N0	M0	
Estádio IIA	T0	N1	M0
T1 <sup>1</sup>	N1 <sup>1</sup>	M0	
T2	N0	M0	
Estádio IIB	T2	N1	M0
T3	N0	M0	
Estádio IIIA	T0	N2	M0
T1 <sup>1</sup>	N2	M0	
T2	N2	M0	
T3	N1, N2	M0	
Estádio IIIB	T4	N0, N1, N2	M0
Estádio IIIC	Qualquer T	N3	M0
Estádio IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Nota: 1. T1 inclui o T1mic.

Fonte: modificado de INCA 2014

### 1.5.1 Estádios I e II

Nos casos de câncer de mama com estágio I e II, a conduta habitual consiste de cirurgia, que pode ser conservadora, com retirada apenas do tumor; ou mastectomia, com retirada da mama. A avaliação dos linfonodos axilares tem função prognóstica e terapêutica. Após a cirurgia, o tratamento complementar com radioterapia pode ser indicado em algumas situações. Já a reconstrução mamária deve ser sempre considerada nos casos de mastectomia. O tratamento sistêmico será determinado de acordo com o risco de recorrência (idade da paciente, comprometimento linfonodal, tamanho tumoral, grau de diferenciação), assim como das características tumorais que irão ditar a terapia mais apropriada. Essa última baseia-se principalmente na mensuração dos receptores hormonais (receptor de estrogênio e progesterona) - quando a hormonioterapia pode ser indicada; e também de HER-2 (fator de crescimento epidérmico 2)- com possível indicação de terapia biológica anti-HER-2 (INCA 2014).

### 1.5.2 Estádio III

Pacientes com tumores maiores, porém ainda localizados, enquadram-se no estágio III. Nessa situação, o tratamento sistêmico (na maioria das vezes, com quimioterapia) é a modalidade terapêutica inicial. Após resposta adequada, segue-se com o tratamento local (INCA 2014).

### 1.5.3 Estádio IV

No estágio IV, é fundamental que a decisão terapêutica busque o equilíbrio entre a resposta tumoral e o possível prolongamento da sobrevida, levando-se em consideração os potenciais efeitos colaterais decorrentes do tratamento. A modalidade principal nesse estágio é sistêmica, sendo o tratamento local reservado para indicações restritas. Atenção à qualidade de vida da paciente com câncer de mama deve ser preocupação dos profissionais de saúde ao longo de todo o processo terapêutico.

O tratamento do câncer de mama, conforme prevê a Política Nacional de Atenção Oncológica, deve ser feito por meio das Unidades de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (Unacon) e dos Centros de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (Cacon), que fazem parte de hospitais de nível terciário. Este nível de atenção deve estar capacitado para determinar a extensão da neoplasia (estadiamento), tratar, cuidar e assegurar a qualidade da assistência oncológica (INCA 2014).

### 1.6 Classificação molecular dos tumores mamários

Em 2000, foi publicado o primeiro trabalho com uma avaliação molecular mais ampla do câncer de mama (incluindo a análise de milhares de genes simultaneamente) que abriu novos horizontes na classificação do cancer de mama (PEROU et al., 2000). Foram identificadas diferenças na expressão gênica (RNA mensageiro) de uma série de tumores de mama que permitia a separação dos casos em alguns subgrupos. Uma análise detalhada da lista de genes com alta e baixa expressão em cada grupo permitiu identificar os perfis de expressão gênica, ou assinaturas genéticas, característicos de cada grupo. Por fim, baseado na similaridade com algumas células do epitélio mamário os grupos foram denominados: “Luminal” quando a assinatura genéticas se assemelhava à célula luminal do ducto mamário; “Basal-símile” quando se assemelhava à célula basal e “Her-2” quando os tumores apresentavam um perfil com hiperexpressão do gene Her2 ou moléculas por ele reguladas na sua via de sinalização celular. (PEROU et al., 2000).

Uma outra versão usando IHQ vem sendo aplicada para traduzir o conhecimento adquirido ao nível do mRNA para o nível protéico. Através da combinação da expressão protéica dos receptores de estrógenos (RE), receptores de progesterona (RP) e HER2, sendo possível identificar o grupo luminal (ER+/PR+/HER2- ou ER+/PR-/ HER2-), HER2 (HER2+) e um grupo chamado triplo negativo (ER-/PR-/ HER2-) (GOLDHIRSCH et al., 2011; MACIEJCZYK et al., 2013). A sobreposição destes grupos com aqueles descritos originalmente não é perfeita, já que a expressão gênica está sujeita a regulação pós-transcricional que faz com que o nível de expressão gênica possa ser distinto do nível de expressão protéica. Mesmo com todas as limitações, esta

classificação molecular através da IHQ tem ganhado popularidade porque os grupos estão associados com tratamentos específicos (GOLDHIRSCH et al., 2011).

Os subtipos moleculares mais frequentes são os luminais (A e B), que representam aproximadamente 60% dos carcinomas mamários. O subtipo luminal A, o mais frequente, é composto por tumores, em geral, de baixo grau histológico, que revelam alta expressão de receptores de estrogênio (RE) e progesterona (RP) e baixos índices de proliferação celular (SCHNITT ET AL., 2010). Neste grupo, a hormonioterapia se constitui numa forma eficaz de terapêutica adjuvante ao tratamento cirúrgico. O segundo subtipo é o luminal B, no qual as neoplasias apresentam maior grau histológico que no subtipo luminal A, além de apresentarem maiores taxas de proliferação celular. Esse último dado favorece o uso de quimioterápicos e hormonioterapia como tratamentos complementares ao tratamento cirúrgico, neste subgrupo (GOLDHIRSCH et al., 2011). Os outros dois subtipos relevantes, pela sua frequência e evolução clínica, são o HER2 e basal-símile, respondendo por 15% dos carcinomas cada um. Ambos tem como característica marcante a não expressão de RE e RP. O primeiro se caracteriza por amplificação do oncogene HER2, que está associada ao perfil metastático, de maior agressividade clínica. Esses tumores apresentam em geral, alto grau histológico e nuclear, além de elevada taxa de proliferação celular. O subtipo basal-símile é considerado o mais agressivo clinicamente (SCHNITT ET AL., 2010; WOLFF ET AL., 2013). É representado por tumores com alto grau (histológico e nuclear) e altos índices de proliferação celular. Parte desses tumores são denominados de triplo negativos (TN), pois a maior parte deles não apresenta expressão IHQ de nenhum dos marcadores prognósticos, ou seja, RE, RP e HER2 negativos (SCHNITT ET AL., 2010 ; O'MALLEY et al., 2011).

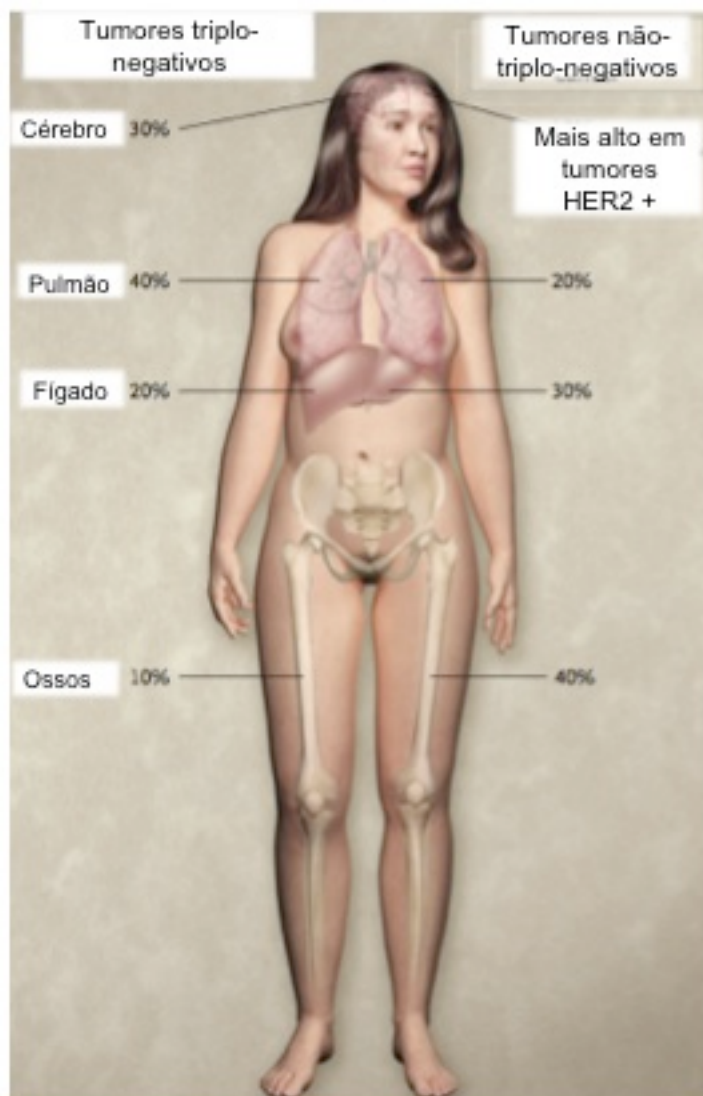
#### 1.6.1 Câncer de mama triplo-negativo (TN)

O câncer de mama exhibe marcadores específicos, os quais são utilizados para prever resposta da doença ao tratamento e planejar terapêutica (PAYNE et al 2008; MACIEJCZYK et al., 2013). O uso rotineiro dessa avaliação de marcadores prognósticos permitiu a identificação de um subgrupo especial de tumores, reconhecidos pela ausência de expressão de receptores hormonais (estrogênio e

progesterona) e de HER2, chamados carcinomas de mama triplo-negativos (TN) (MACIEJCZYK et al., 2013; CETIN et al., 2014).

O câncer de mama triplo negativo é definido como um carcinoma da mama que não apresenta expressão de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) nem de HER2 à imuno-histoquímica ou ao estudo citogenético. Entre 10 a 17% dos carcinomas de mama são triplo-negativos. Tais tumores representam um desafio terapêutico ao oncologista, uma vez que não são responsivos ao tratamento hormonal ou à terapia direcionada ao HER2 (trastuzumab), deixando o papel terapêutico principal à quimioterapia (BORI et al., 2008). O câncer de mama TN é mais frequente em pacientes jovens, em pacientes que possuem mutação no gene BRCA1 e em grupos étnicos específicos (mulheres afrodescendentes e hispânicas) (ENGEBRAATEN et al., 2013). O comportamento clínico do câncer de mama triplo-negativo (TN) é classicamente mais agressivo do que os demais tumores de mama ( MAHAMODHOSEN et., 2013). Geralmente, são tumores grandes, de alto grau histológico e de crescimento rápido. As diferenças entre o status nodal dos TN e dos não triplo-negativos (NTN) ainda não estão bem definidas. No entanto, sabe-se que os tumores TN apresentam mais metástases para órgãos sólidos do que os tumores NTN (Figura 3) (FOULKES et al., 2010 ; CETIN et al., 2014), conseqüentemente, a sobrevida dessas pacientes é inferior à daquelas com outras neoplasias mamarias (CETIN et al., 2014).

**Figura 3** – Sítios de metástases à distância em tumores triplo-negativos e não-triplo-negativos.



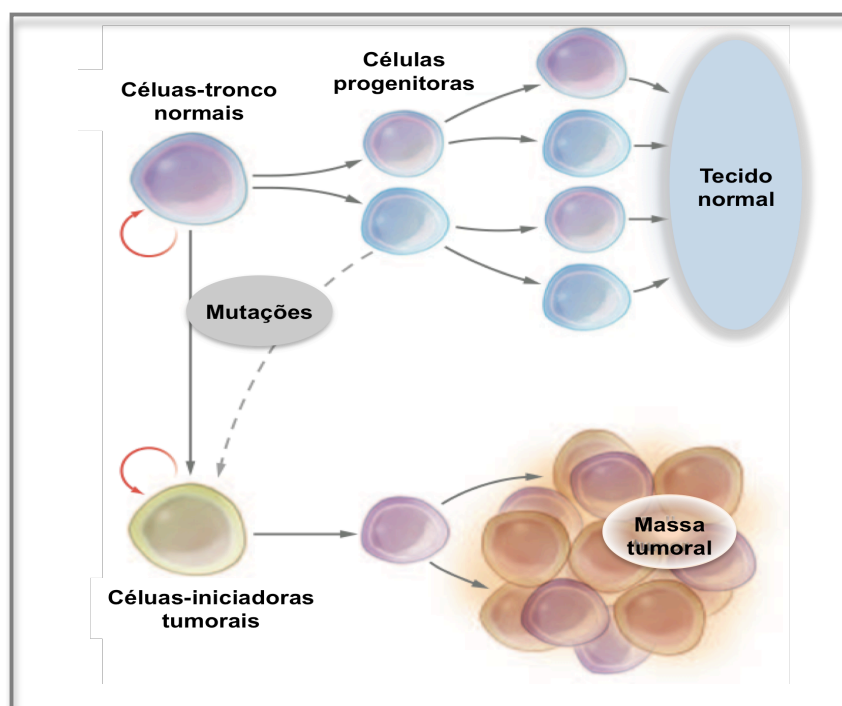
Fonte: modificado de FOULKES et al.

### 1.7 Células-Iniciadoras Tumorais (CITs)

Nos últimos 30 a 40 anos, vários estudos têm demonstrado que as características conhecidas das células-tronco, como capacidade de auto-renovação, capacidade de se desenvolver em múltiplas linhagens e alto potencial proliferativo, também podem ser encontradas em algumas células tumorais (JORDAN et al., 2006). O termo célula-iniciadora tumoral (ou célula-tronco tumoral) se refere à uma pequena proporção de

células tumorais que têm a capacidade de auto-renovação continuada, capacidade de formar outra massa tumoral e capacidade de originar diferentes tipos de células tumorais (MCDERMOTT et al., 2010). Sob esse conceito de carcinogênese, a capacidade de autorrenovação seria responsável pela manutenção (multiplicação e imortalidade) tumoral e a capacidade de diferenciação pela heterogeneidade (polimorfismo) de uma neoplasia desenvolvida (Figura 4).

**Figura 4.** Células-tronco - Tecidos normais são originados de células-tronco que crescem e se diferenciam para criarem populações de células progenitoras e células maduras. As principais características da célula-tronco são a habilidade de auto-renovação (seta vermelha curva), habilidade de originar células de linhagens diferentes (células de cores diferentes) e importante capacidade proliferativa. As células-troco tumorais são originadas de células-tronco ou células progenitoras e em seguida crescem e se diferenciam para criar o tumor.

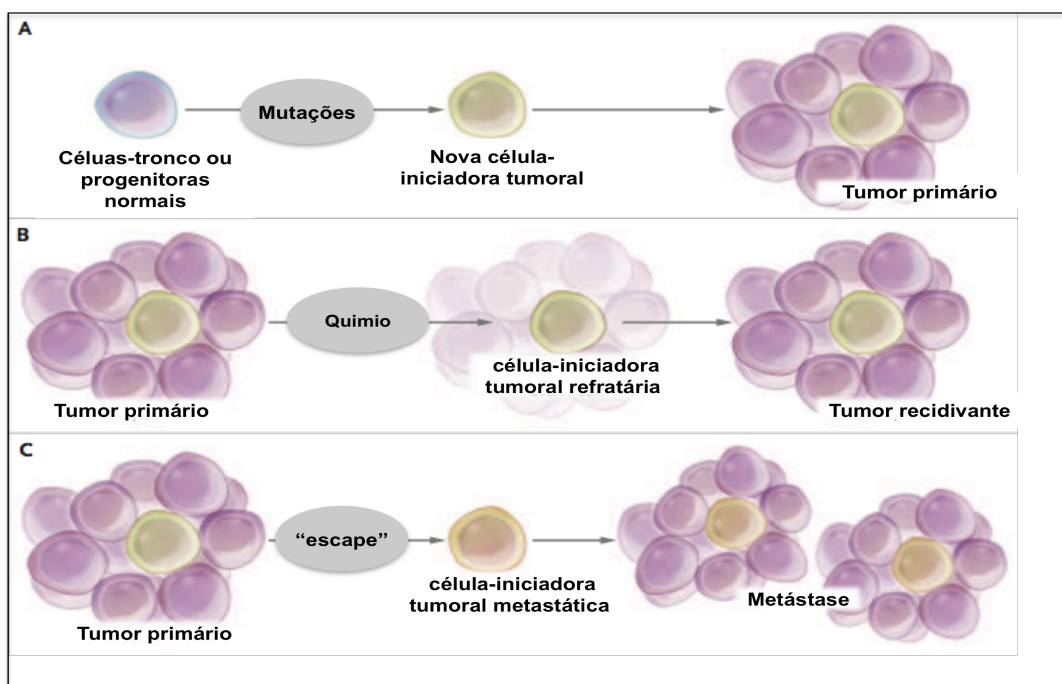


Fonte: modificada de JORDAN et al. (2006)

Vistos sob essa teoria, os tumores malignos devem conter vários tipos de células, desde células-iniciadoras tumorais, em pequena quantidade, até células cancerígenas em diversos graus de maturação, as quais comporiam a maior parte da massa celular de uma

neoplasia (JORDAN et al., 2006). O conceito de CITs pode variar em diferentes contextos. Podem, por exemplo, ser a fonte de todas as células malignas em um tumor primário, compondo um pequeno reservatório de células resistentes a fármacos, responsáveis por uma recidiva após tratamento quimioterápico, ou que podem dar origem a metástases a distancia (Figura 5). As características biológicas das CITs devem ser diferentes em cada uma destas circunstâncias, sugerindo que a aquisição de características associadas com a progressão do tumor (instabilidade genética e resistência a drogas) também estão associadas com as CITs (JORDAN et al., 2006).

**Figura 5.** Cenários envolvendo as células-iniciadoras tumorais (CITs) – Papel das CITs. Primeiro, mutação de uma célula-tronco normal ou célula progenitora podendo levar à uma CIT e posteriormente a geração de um tumor primário (A). Segundo, durante o tratamento quimioterápico, a maioria das células tumorais são destruídas, mas se a CIT não for destruída, pode ocorrer recidiva (B). Terceiro, CIT podem se “desprender” da massa tumoral primária e migrar para sítios distantes, criando uma nova massa tumoral, metastática (C).



Fonte: modificada de JORDAN (2006)



Inicialmente, estas células denominadas células-iniciadoras tumorais (CITs) foram observadas em doenças hematológicas, através de estudos com citometria de fluxo. Os tumores cerebrais e os tumores de mama foram os dois primeiros tumores sólidos em que as CITs foram descritas (BUENO et al., 2008). Em 2003, um trabalho científico pioneiro utilizando uma pequena população de carcinomas mamários humanos em cultura, pré-selecionadas por citometria de fluxo a partir do perfil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low/B38.1/ESA<sup>+</sup>/Lin<sup>-</sup>, demonstrou pela primeira vez, o desenvolvimento prospectivo experimental do carcinoma mamário humano a partir de CITs mamárias. O antígeno mamário B38.1, o antígeno epitelial específico (ESA) e os anticorpos marcadores de linhagem (Lin) foram utilizados para purificar as populações de células cancerígenas mamárias. Após essa purificação inicial, estabeleceram-se quatro grupos de acordo com a expressão de CD44 e CD24 e verificou-se que as células-tronco tumorais humanas, com fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low foram capazes de gerar novos tumores, com a semelhante heterogeneidade do tumor original, a partir de inoculação em ratos imunossuprimidos (NOD/SCOD mice) (AL-HAJJ et al., 2003). Neste mesmo estudo, as populações celulares com perfis diferentes do CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low praticamente não resultaram em crescimentos tumorais, ou seja, os autores conseguiram distinguir as células tumorigênicas (as CITs) daquelas não tumorigênicas através da expressão de um marcador de superfície e definiram um fenótipo para as CITs, o fenótipo CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup>/low (AL-HAJJ et al., 2003). A partir deste estudo, observou-se enriquecimento rápido da literatura médica sobre o tema das CITs e o câncer de mama, sendo o perfil CD44<sup>+</sup>/CD24<sup>-</sup> invariavelmente utilizado como “assinatura” para as CITs mamárias.

### 1.7.1 CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup>/low

Células tumorigênicas de câncer de mama com perfil de células tronco e com marcadores específicos exibem perfis genéticos específicos, sugestivos de uma associação com prognóstico adverso. Em 2007, Shipitsin et al., mostraram que células CD24<sup>+</sup> são mais diferenciadas e as CD44<sup>+</sup> têm características de células progenitoras. Subpopulações de CD44<sup>+</sup>CD24<sup>-</sup> parecem estar associadas ao período mais curto de sobrevida livre de doença e sobrevida global (SHIPITSIN et al., 2007) ou ao maior

índice de metástases à distância (ABRAHAM et al., 2005, GIATROMANOLAKI et al., 2010) e a expressão elevada de genes envolvidos com invasão (SHERIDAN et al., 2006). Honeth et al., em 2008, demonstraram uma associação entre a presença de CD44+/CD24- e o subtipo basalóide. No entanto, uma considerável heterogeneidade na frequência de expressão de CD44 e CD24 foi observada entre os tumores (ABRAHAM et al., 2005, MYLONA et al., 2008). A análise de vários marcadores de células-tronco em células em cultura e amostras de carcinoma de mama sugeriu que várias diferentes linhagens celulares podem diferir em seus perfis de marcadores de células tronco/progenitoras (HWANG-VERLUES et al., 2009).

### 1.7.2 ALDH

As aldeído desidrogenases (ALDH) são enzimas que catalisam a oxidação nucleotídeo-dependente (dependente de NAD - nicotinamida adenina dinucleotídeo) mediada por piridina (núcleo estrutural e ativo do NAD), de uma variedade de substratos aldeídos para os seus correspondentes ácidos carboxílicos (MARCATO et al., 2011; QIU et al., 2014). Estas enzimas são necessárias para que os aldeídos possam manter a homeostase e o crescimento celular normal, bem como permitir que as células se adaptem a um ambiente de estresse (MARCATO et al., 2011). Até hoje já foram descritos 19 membros da superfamília de ALDH, sendo que duas das isoenzimas humanas mais estudadas são as ALDH1 (ou ALDH1A1) e ALDH2. ALDH1 tem como função principal a oxidação do retinol (vitamina A) em ácido retinóico que tem um papel crucial na homeostase fisiológica de muitos órgãos e no desenvolvimento normal durante a embriogênese humana. ALDH1 também possui um papel na detoxificação de certos agentes alquilantes terapêuticos, e, portanto, parece contribuir com as propriedades inatas de resistência à radiação e detoxificação das células-tronco normais (MARCATO et al., 2011; QIU et al., 2014). A atividade da ALDH1 é avaliada em ensaios *in vitro*, como o Aldefluor® e o Aldecoum® (Stem Cell Technologies, Vancouver, Canada). Este último é aprovado para diagnóstico pelo FDA (Food and Drug Administration) para uso na detecção, quantificação e monitoramento de células-tronco/progenitoras do sangue periférico, cordão umbilical e de medula óssea. Utilizando o kit Aldefluor®, Ginestier et al. (2007) mostraram que células aldefluor+ de

câncer de mama são altamente tumorigênicas e possuem propriedades de células-tronco de auto-renovação e diferenciação. Dessa forma a ALDH1 é um marcador de células-tronco humanas normais e células-iniciadoras tumorais de mama, sendo considerado um marcador de pior prognóstico nestes tumores (GINESTIER et al., 2007).

## 2. Objetivos

---

### 2.1. Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho consistiu em revisar e integrar , por meio de meta-análise, os estudos que investigaram as possíveis associações entre células iniciadoras tumorais, definidas pelo fenótipo CD44+/CD24-/low e pela expressão de ALDH, e aspectos prognósticos do câncer de mama.

### 2.2. Objetivos específicos

- Identificar estudos que avaliaram a presença de células-iniciadoras tumorais CD44+/CD24-/low e ALDH nos tumores invasivos de mama, utilizando imuno-histoquímica.
- Identificar as associações entre o fenótipo CD44/CD24-/low e o fenótipo triplo negativo, a hiperexpressão de HER2 e o comprometimento linfonodal, utilizando o método de meta-análise.
- Identificar as associações entre a expressão de ALDH e o fenótipo triplo negativo, a hiperexpressão de HER2 e o comprometimento linfonodal, utilizando o método de meta-análise.
- Sistematizar os resultados encontrados, a fim de apresentá-los de maneira integrada.

### 3. Metodologia

---

A meta-análise é um procedimento destinado a examinar, de modo simultâneo, os resultados de várias investigações sobre um mesmo tópico. Esse tipo de estudo é bastante utilizado nas áreas médicas, pois, com o uso de numerosos dados, de diversos trabalhos sobre um mesmo assunto, aumenta-se o nível de confiança nas inferências estatísticas, para vários fins (SANTOS et al., 2013). A meta-análise se justifica porque muitos estudos sobre um determinado tema são concordantes, mas podem também apresentar discordância, fato que aumenta a necessidade de análises conjuntas para que se possam gerar conclusões com maior segurança (BARTOLUCCI, 2007). Os principais passos de uma meta-análise são: (1) a pesquisa bibliográfica, (2) a transformação dos resultados de cada estudo do agrupamento em uma medida comum, (3) a verificação da homogeneidade dos resultados, (4) a modelagem da variação entre estudos e, finalmente, (5) a análise de sensibilidade (GIANNOTTI et al., 2002).

Estudos relevantes em seres humanos foram identificados no banco de dados da PubMed do NCBI (*National Center for Biotechnology Information, USA*). A pesquisa combinou os unitermos “*CD44/CD24 and breast cancer*” e “*ALDH and breast cancer*”.

No contexto das meta-análises, é importantes avaliar a heterogeneidade entre os estudos agrupados, pois a natureza distinta dos diferentes estudos, em termos de delineamento e em relação aos métodos empregados em cada um é o principal obstáculo na combinação de resultados (DERSIMONIAN et al., 1986). Assim, a heterogeneidade pode ser de três tipos: clínica, metodológica ou estatística. Com o intuito de minimizar estes parâmetros, definem-se com alargada precisão os critérios de inclusão e exclusão (BERWANGER et al., 2007). Neste contexto, a seleção dos artigos seguiu os seguintes critérios de inclusão e exclusão: (1) foram publicados até o ano de 2014, (2) utilizavam imuno-histoquímica como método de avaliação das células-iniciadoras tumorais, (3) apresentavam números brutos dos casos avaliados.

Desta forma, os seguintes dados foram coletados: local onde o estudo foi realizado, ano da publicação, número de casos (positivos para CIT), número de controles (negativos para CIT), tumores triplo-negativos (TN), tumores não-triplo-negativos (NTN), tumores HER2-positivos, tumores HER2-negativos, metástase linfonodal (Linf+) e linfonodos sem metástase (Linf-).

Na busca com os unitermos “*CD44/CD24 and breast cancer*” foram encontrados 95 artigos, destes, foram selecionados 63 resumos, dos quais foram selecionados 25 artigos para leitura integral. Por fim, foram selecionados 13 artigos que correspondiam aos critérios de inclusão. Na busca com unitermos “*ALDH and breast cancer*” foram encontrados 103 artigos, destes, foram selecionados 45 resumos, dos quais foram selecionados 17 artigos para leitura integral. Por fim, foram selecionados 11 artigos que se enquadravam nos critérios de inclusão. Vale ressaltar que 4 artigos foram utilizados tanto na avaliação de ALDH1, quanto na avaliação do CD44/CD24 (Figura 6).

A heterogeneidade é definida como a diversidade entre os estudos, podendo interferir fortemente nos resultados. A diversidade então pode ser avaliada pelo teste do  $\chi^2$  de heterogeneidade (BERWANGER et al., 2007). Assim, os achados de todos os artigos foram agrupadas em tabela única e a diversidade foi avaliada com o emprego do teste do  $\chi^2$  de heterogeneidade em tabelas de contingência 2x2, para a comparação das diferentes Odds Ratios (ORs), com intervalo de confiança de 95%, determinadas em seus respectivos estudos (BÖHNING et al., 2002). Caso o teste do  $\chi^2$  de heterogeneidade revele um p-valor  $> 0,05$ , a hipótese nula é confirmada, ou seja, os estudos são homogêneos. Recomenda-se então utilizar os testes de efeito fixo que pressupõem que todos os estudos apontam em uma mesma direção (HIGGINS et al., 2008). Neste contexto, o mais utilizado é o teste de Mantel-Haenszel (AYRES et al., 2007). Por outro lado, se o teste do  $\chi^2$  de heterogeneidade resultar em um p-valor  $< 0,05$ , isso indica diversidade e heterogeneidade entre os estudos. Desta forma, recomenda-se o uso de testes de efeito randômico ou aleatório (ZHANG et al., 2008), como o testes de DerSimonian-Laird (BERMAN et al., 2002; JACKSON et al., 2009).

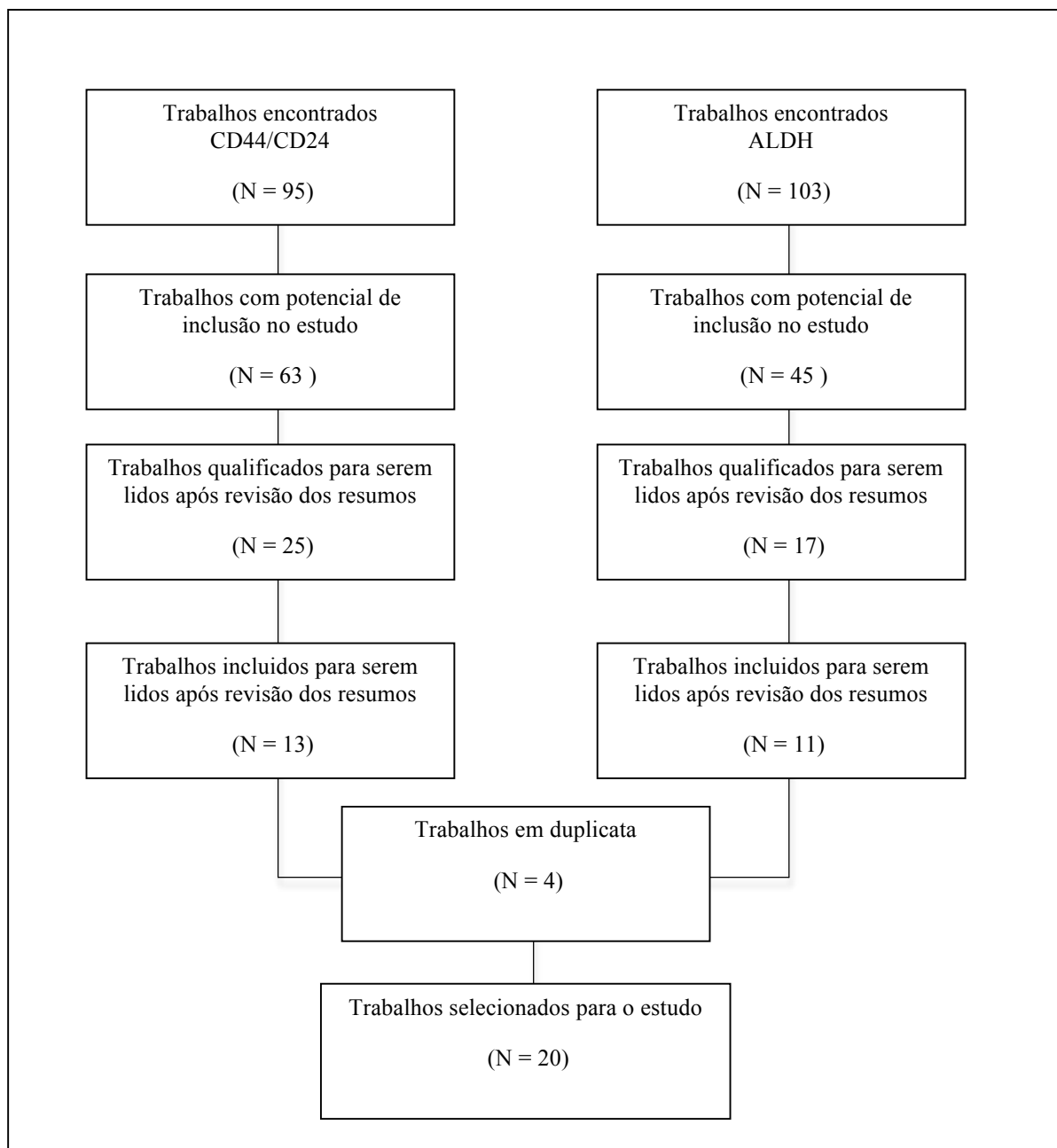
Testes globais de associação foram então utilizados para avaliar a significância das correlações e os valores de cada estudo foram combinados com testes de efeitos fixo e randômico utilizando o software BioEstat® 5.0 (AYRES et al., 2007).

Tanto para testes de efeito fixo quanto para os de efeito randômico, calculam-se as Odds Ratios, seus intervalos de confiança (95%) e os pesos para cada estudo individualmente e combinados, gerando a estimativa de efeito conjunto. Estudos com maior poder estatístico, ou seja, com maior população e maior efeito de intervenção, possuirão maior peso (BERWANGER et al., 2007). Adicionalmente, os testes elaboram gráficos do tipo forest plot. A vantagem destes gráficos é sumarizar no mesmo espaço todas as informações sobre o efeito e a contribuição de cada estudo para a análise.

Como o agrupamento de todos os estudos revelou homogeneidade, aplicou-se o teste de efeito randômico de *DerSimonian-Laird* para todas as possibilidades entre os parâmetros: (1) TN x NTN, (2) HER2+ x HER2- e (3) LINF+ x LINF- em relação ao fenótipo CD44+/CD24-/low e à expressão de ALDH.

Os estudos encontrados foram lidos por dois examinadores e avaliados quanto aos critérios de qualidade, à metodologia, à análise estatística e às conclusões apresentadas.

O presente estudo não foi submetido à aprovação de um comitê de ética em pesquisa, visto que os trabalhos selecionados já haviam sido devidamente aprovados pelos seus respectivos comitês.

**Figura 6** - Fluxograma da pesquisa de artigos científicos nas bases de dados disponíveis.



## 4. Resultados

---

### 4.1. Descrição dos estudos

Vinte estudos preencheram os critérios de inclusão para esta meta-análise, porém, um deles (Ginestier et al., 2007) avaliou dois grupos diferentes de pacientes e foi considerado como dois estudos distintos (Ginestier (a) e Ginestier (b), 2007) (Quadro 6). Dentre os estudos incluídos, 13 avaliaram o fenótipo CD44+/CD24-/low e 12 avaliaram a expressão de ALDH para caracterização de células-iniciadoras tumorais em carcinomas mamários, sendo que quatro estudos avaliaram tanto o fenótipo CD44+/CD24-/low como a expressão de ALDH. Os aspectos tumorais avaliados incluíram o fenótipo triplo-negativo (TN), a hiperexpressão de HER2 e o comprometimento de linfonodos regionais.

Dados de metástase à distância foram investigados em cinco estudos que avaliaram o fenótipo CD44+/CD24-/low e em dois estudos que avaliaram a expressão de ALDH, entretanto, em função do baixo número de casos avaliados, tais dados não foram incluídos. Uma vez que os dados brutos de sobrevida não foram apresentados na maioria dos estudos, esse parâmetro também não foi avaliado nesta meta-análise.

Quadro 6 . Estudos que avaliaram o fenótipo CD44+/CD24-/low e a expressão de ALDH em carcinomas mamários, utilizando imuno-histoquímica

N	Referência	Ano	Local	Marcador
1	Abraham	2005	Alemanha	CD44/CD24
2	Ginestier (a)	2007	USA	ALDH1
3	Ginestier (b)	2007	USA	ALDH1
4	Honeth	2008	Suécia	CD44/CD24
5	Morimoto	2009	Japão	ALDH1
6	Resetkova	2010	USA	ALDH1
7	Giatromanolaki et al.	2011	Grécia	CD44/CD24
8	Park et al	2010	Coreia	CD44/CD24
9	Nalwoga	2010	Reino Unido	ALDH1
10	Charafe-Jauffret	2010	França	ALDH1
11	Bernardi et al.	2012	Brasil	CD44/CD24
12	Ricardo et al.	2011	Portugal	CD44/CD24 e ALDH
13	Ahmed. Et al	2012	Egito	CD44/CD24
14	Ali et al	2011	Reino unido	CD44/CD24 e ALDH
15	Idowu et al.	2012	USA	CD44/CD24
16	Tsang et al.	2012	Hong Kong	CD44/CD24 e ALDH
17	Currie et al.	2013	Nova Zelândia	CD44/CD24 e ALDH
18	Adamczyk et al.	2013	Polônia	CD44/CD24
19	Wu et al.	2013	USA	CD44/CD24
20	Zhong et al	2014	China	ALDH1
21	Qiu et al	2014	China	ALDH1

## 4.2. Associações entre os marcadores de células iniciadoras tumorais e os parâmetros clínicos

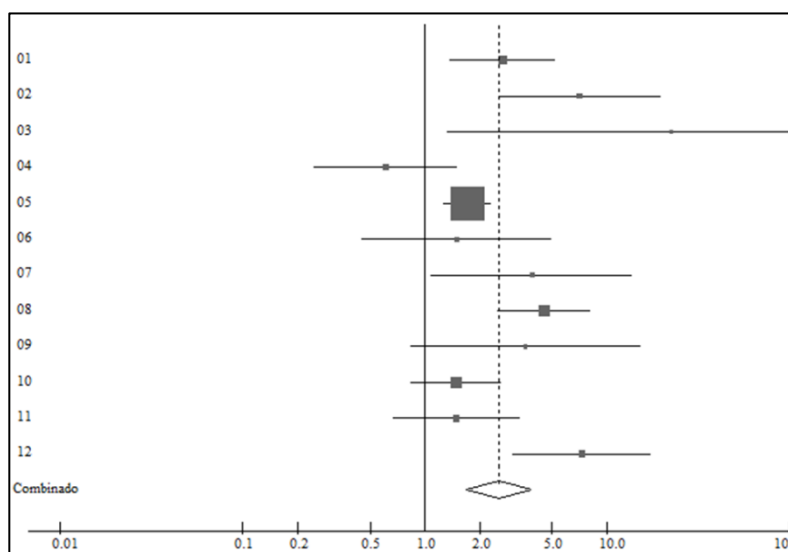
### 4.2.1. CD44+/CD24-/low e o fenótipo triplo-negativo

Doze estudos avaliaram a correlação do fenótipo CD44+/CD24-/low e o fenótipo triplo-negativo (Quadro 7 e Figura 7), demonstrando uma correlação significativa entre esses parâmetros (OR combinada = 2,548, 95% IC:1,683 – 3,856,  $p < 0,0001$ ).

Quadro 7. Estudos que avaliaram a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e o fenótipo triplo-negativo

N	Referência	Ano	Local	Caso		Controle		OR	IC	
				TN	NTN	TN	NTN		Inferior	Superior
1	Honeth	2008	Suécia	22	51	22	137	2,670	1,371	5,199
2	Giatromanolaki	2011	Grécia	13	27	6	93	7,062	2,527	19,736
3	Park	2010	Coreia	22	107	0	53	22,395	1,333	376,329
4	Ahmed	2012	Egito	5	42	135	638	0,610	0,246	1,511
5	Ali	2011	Reino Unido	98	160	186	518	1,706	1,262	2,307
6	Bernardi	2012	Brasil	5	10	13	38	1,494	0,448	4,978
7	Idowu	2012	USA	9	8	6	22	3,869	1,084	13,804
8	Ricardo	2011	Portugal	52	153	16	216	4,488	2,486	8,100
9	Currie	2013	Nova Zelândia	3	6	10	69	3,564	0,834	15,232
10	Tsang	2012	Hong Kong	22	150	33	332	1,484	0,841	2,618
11	Adamczyk	2013	Polônia	14	33	18	63	1,486	0,664	3,322
12	Wu	2013	USA	20	17	12	77	7,263	3,031	17,405
<b>Combinado (<math>p &lt; 0,0001</math>)</b>				<b>285</b>	<b>764</b>	<b>457</b>	<b>2256</b>	<b>2,548</b>	<b>1,683</b>	<b>3,856</b>

Figura 7. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e o fenótipo triplo-negativo (OR combinada = 2,548, 95% IC:1,683 – 3,856,  $p < 0,0001$ ).



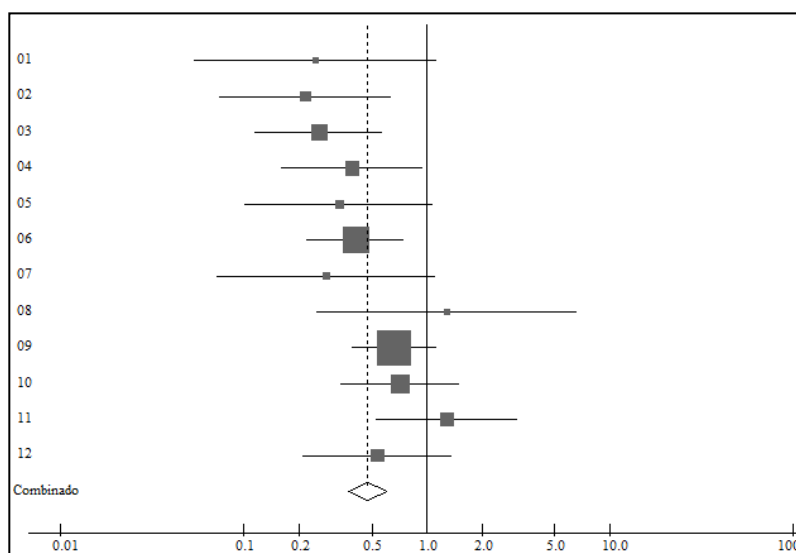
#### 4.2.2. CD44+/CD24-/low e hiperexpressão de HER2

Doze estudos avaliaram a associação do fenótipo CD44+/CD24-/low e a hiperexpressão de HER2 (Quadro 8 e Figura 8). Não foi descrita correlação significativa entre esses parâmetros nesta meta-análise (OR combinada = 0,475, 95% IC:0,372 – 0,606,  $p = 0,1989$ ).

Quadro 8 . Estudos que avaliaram a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a hiperexpressão de HER2

N	Referência	Ano	Local	Caso		Controle		OR	IC	
				HER2+	HER2-	HER2+	HER2-		Inferior	Superior
1	Abraham	2005	Alemanha	2	23	23	65	0,246	0,054	1,125
2	Honeth	2008	Suécia	4	71	34	131	0,217	0,074	0,636
3	Giatromanolaki	2011	Grécia	11	29	59	40	0,257	0,115	0,573
4	Park	2010	Coreia	12	117	11	42	0,392	0,161	0,954
5	Ahmed	2012	Egito	3	46	124	632	0,332	0,102	1,086
6	Ali	2011	Reino unido	14	115	81	271	0,407	0,222	0,748
7	Bernardi	2012	Brasil	3	12	24	27	0,281	0,071	1,117
8	Idowu	2012	USA	3	14	4	24	1,286	0,250	6,599
9	Ricardo	2011	Portugal	25	182	43	207	0,661	0,389	1,125
10	Tsang	2012	Hong Kong	10	162	29	336	0,715	0,340	1,503
11	Adamczyk	2013	Polónia	10	38	15	73	1,281	0,525	3,122
12	Wu	2013	USA	7	30	27	62	0,536	0,21	1,37
<b>Combinado (<math>p &lt; 0,0001</math>)</b>				<b>104</b>	<b>839</b>	<b>474</b>	<b>1910</b>	<b>0,475</b>	<b>0,372</b>	<b>0,606</b>

Figura 8. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a hiperexpressão de HER2 (OR combinada = 0,475, 95% IC:0,372 – 0,606, p = 0,1989).



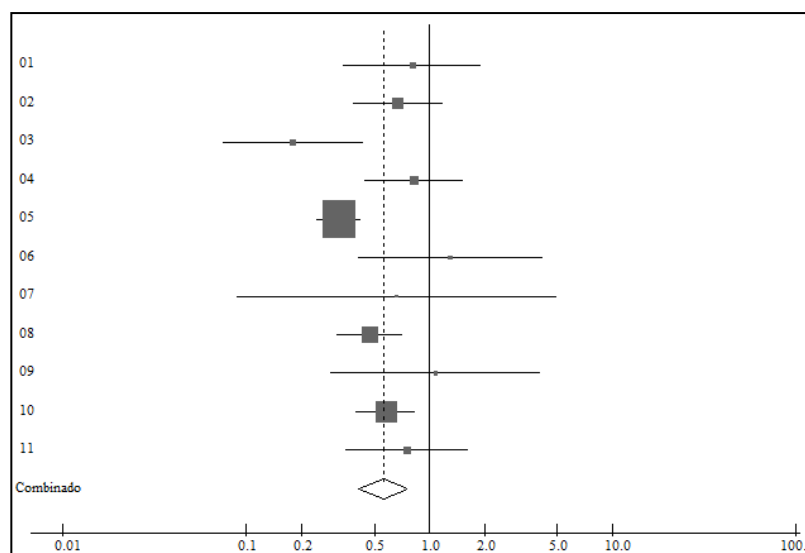
#### 4.2.3. CD44+/CD24-/low e metástase linfonodal

Onze estudos avaliaram a associação do fenótipo CD44+/CD24-/low e a presença de metástases linfonodais (Quadro 9 e Figura 9). Uma associação significativa, porém, inversa, entre esses parâmetros foi detectada nesta meta-análise (OR combinada = 0,558, 95% IC: 0,411 – 0,758, p = 0,0047).

Quadro 9 . Estudos que avaliaram a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e metástase linfonodais

N	Referência	Ano	Local	Caso		Controle		OR	IC	
				Linf(+)	Linf(-)	Linf(+)	Linf(-)		Inferior	Superior
1	Abraham	2005	Alemanha	16	11	61	34	0,805	0,340	1,903
2	Honeth	2008	Suécia	45	30	114	51	0,671	0,382	1,180
3	Giatromanolaki	2011	Grécia	7	33	55	44	0,180	0,074	0,435
4	Ahmed	2012	Egito	15	32	293	507	0,825	0,443	1,536
5	Ali	2011	Reino unido	86	184	783	533	0,319	0,242	0,422
6	Bernardi	2012	Brasil	10	5	34	23	1,300	0,409	4,137
7	Idowu	2012	USA	1	16	3	25	0,662	0,089	4,946
8	Ricardo	2011	Portugal	79	90	127	68	0,472	0,310	0,719
9	Currie	2013	Nova Zelândia	5	4	42	37	1,078	0,288	4,041
10	Tsang	2012	Hong Kong	63	100	186	170	0,588	0,396	0,842
11	Wu	2013	USA	18	18	49	37	0,758	0,35	1,639
<b>Combinado (<math>p=0,0002</math>)</b>				<b>345</b>	<b>523</b>	<b>1747</b>	<b>1529</b>	<b>0,558</b>	<b>0,411</b>	<b>0,758</b>

Figura 9. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre o fenótipo CD44+/CD24-/low e a presença de metástases linfonodais (OR combinada = 0,558, 95% IC: 0,411 – 0,758,  $p = 0,0047$ ).



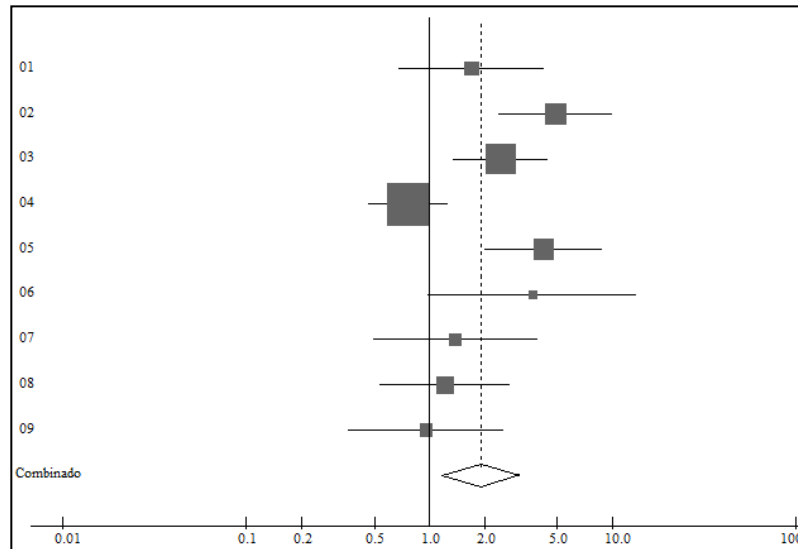
#### 4.2.4. ALDH e o fenótipo triplo-negativo:

Nove estudos avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e o fenótipo triplo-negativo (Quadro 5 e Figura 5), demonstrando uma associação significativa entre esses parâmetros (OR combinada = 1,911, 95% IC:1,162 – 3,142,  $p = 0,0004$ ).

Quadro 10. Estudos que avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e o fenótipo triplo-negativo

N	Referência	Ano	Local	Caso		Controle		OR	IC	
				TN	NTN	TN	NTN		Inferior	Superior
1	Morimoto	2009	Japão	8	13	49	133	1,698	0,678	4,253
2	Resetskova	2010	USA	21	24	24	136	4,889	2,376	10,059
3	Nalwoga	2010	Reino Unido	47	41	30	65	2,458	1,351	4,472
4	Ali	2011	Reino Unido	22	68	289	677	0,768	0,468	1,262
5	Ricardo	2011	Portugal	13	20	55	353	4,194	1,995	8,818
6	Currie	2013	Nova Zelândia	4	8	10	72	3,655	0,983	13,591
7	Tsang	2012	Hong Kong	4	28	52	460	1,385	0,492	3,897
8	Zhong	2014	China	50	15	41	15	1,217	0,539	2,749
9	Qiu	2014	China	12	70	7	40	0,957	0,358	2,562
<b>Combinado (<math>p=0,0107</math>)</b>				<b>181</b>	<b>287</b>	<b>557</b>	<b>1951</b>	<b>1,911</b>	<b>1,162</b>	<b>3,142</b>

Figura 10. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre a expressão de ALDH e o fenótipo triplo-negativo (OR combinada = 1,911, 95% IC:1,162 – 3,142,  $p = 0,0004$ ).



#### 4.2.5. ALDH e hiperexpressão de HER2

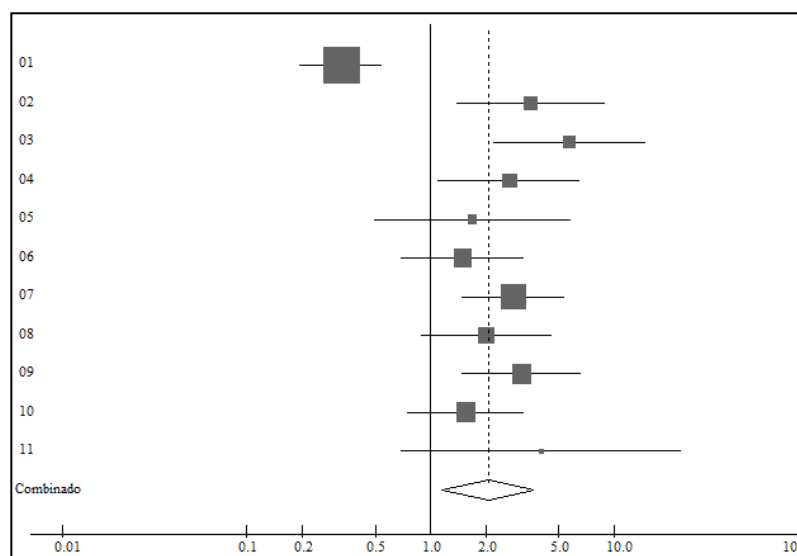
Onze estudos avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e a hiperexpressão de HER2 (Quadro 11 e Figura 11). Uma associação significativa entre esses parâmetros foi demonstrada nesta meta-análise (OR combinada = 2,062, 95% IC: 1,155 – 3,682,  $p < 0,0001$ ).



Quadro 11. Estudos que avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e a hiperexpressão de HER2

N	Referência	Ano	Local	Caso		Controle		OR	IC	
				HER2+	HER2-	HER2+	HER2-		Inferior	Superior
1	Ginestier (a)	2007	USA	61	39	198	41	0,326	0,193	0,548
2	Ginestier (b)	2007	USA	10	14	19	94	3,509	1,382	8,911
3	Morimoto	2009	Japão	9	12	21	161	5,709	2,194	14,852
4	Resetskova	2010	USA	9	25	18	133	2,688	1,104	6,544
5	Charafe-Jauffret	2010	França	8	5	20	22	1,696	0,497	5,793
6	Nalwoga	2010	Reino Unido	17	71	13	82	1,496	0,687	3,254
7	Ali	2011	Reino Unido	17	28	86	397	2,822	1,489	5,346
8	Ricardo	2011	Portugal	8	25	60	366	2,019	0,887	4,596
9	Tsang	2012	Hong Kong	12	20	84	434	3,135	1,494	6,578
10	Zhong	2014	China	29	36	19	37	1,554	0,748	3,230
11	Qiu	2014	China	9	73	1	46	4,007	0,689	23,307
<b>Combinado</b> ( $p=0,0144$ )				<b>189</b>	<b>348</b>	<b>539</b>	<b>1813</b>	<b>2,062</b>	<b>1,155</b>	<b>3,682</b>

Figura 11. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a associação entre a expressão de ALDH e a hiperexpressão de HER2 (OR combinada = 2,062, 95% IC: 1,155 – 3,682,  $p < 0,0001$ ).



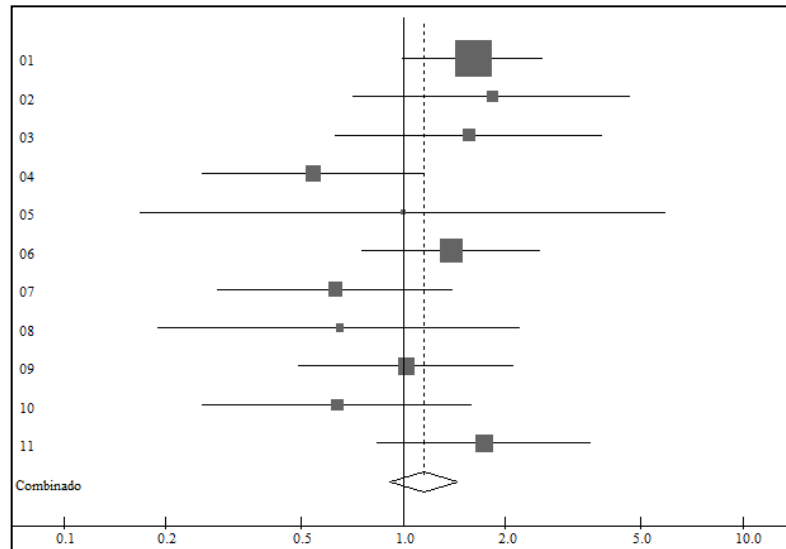
## 4.2.6. ALDH e metástase linfonodal:

Onze estudos avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e a presença de metástases linfonodais (Quadro 12 e Figura 12). Associação significativa entre esses parâmetros não foi demonstrada nesta meta-análise (OR combinada = 1,151, 95% IC: 0,916 – 1,446,  $p = 2019$ ).

Quadro 12 . Estudos que avaliaram a associação entre a expressão de ALDH e a presença de metástases linfonodais

N	Referência	Ano	Local	Caso		Controle		OR	IC	
				Linf(+)	Linf(-)	Linf(+)	Linf(-)		Inferior	Superior
1	Ginestier (a)	2007	USA	55	43	107	134	1,602	0,998	2,571
2	Ginestier (b)	2007	USA	13	9	42	53	1,823	0,711	4,673
3	Morimoto	2009	Japão	10	11	67	115	1,560	0,629	3,868
4	Resetskova	2010	USA	19	16	105	48	0,543	0,257	1,146
5	Charafe-Jauffret	2010	França	20	2	40	4	1,000	0,169	5,931
6	Ali	2011	Reino Unido	20	23	669	1064	1,383	0,754	2,538
7	Ricardo	2011	Portugal	12	14	194	143	0,632	0,284	1,407
8	Currie	2013	Nova Zelândia	5	7	43	39	0,648	0,190	2,209
9	Tsang	2012	Hong Kong	15	16	239	260	1,020	0,493	2,108
10	Zhong	2014	China	50	15	47	9	0,638	0,255	1,597
11	Qiu	2014	China	40	45	17	33	1,725	0,837	3,558
<b>Combinado (<math>p=0,2019</math>)</b>				<b>259</b>	<b>201</b>	<b>1570</b>	<b>1902</b>	<b>1,151</b>	<b>0,916</b>	<b>1,446</b>

Figura 12. *Forest plot* para a meta-análise que avaliou a c associação entre a expressão de ALDH e a presença de metástases linfonodais (OR combinada = 1,151, 95% IC: 0,916 – 1,446,  $p = 2019$ ).



## 5. Discussão

---

Esta meta-análise revisou e selecionou 20 estudos que investigaram a associação entre marcadores característicos de células iniciadoras tumorais, CD44+/CD24-/low e ALDH, analisados por imuno-histoquímica, e as características prognósticas dos carcinomas mamários, incluindo o fenótipo triplo-negativo, a hiperexpressão de HER2 e o comprometimento de metástases linfonodais. O grande número de estudos que investigou esta associação e as divergências entre métodos e resultados apresentados justificaram a realização desta meta-análise, que combinou os dados disponíveis e investigou, por métodos estatísticos apropriados, as possíveis associações combinadas entre os marcadores característicos das células iniciadoras tumorais e os aspectos prognósticos dos carcinomas mamários.

Uma meta-análise sobre o papel prognóstico das células iniciadoras tumorais nos carcinomas de mama foi publicada em 2010 (ZHOU et al., 2010). Entretanto, somente 12 estudos estavam disponíveis naquela época e tais estudos utilizaram métodos diferentes de análise dos marcadores celulares, incluindo imuno-histoquímica, imunofluorescência e análise de expressão gênica por microarranjos. Nossa meta-análise selecionou e analisou somente estudos que empregaram a imuno-histoquímica como método de análise da marcação de CD44+/CD24-/low e ALDH, sendo que a imuno-histoquímica é a metodologia mais empregada nos artigos publicados nos últimos anos. Além disso, a imuno-histoquímica é o método mais acessível e mais amplamente utilizado nos laboratórios de histopatologia clínica, permite a análise retrospectiva de séries de tumores e a avaliação da arquitetura tecidual do tumor o que confere aos resultados desta meta-análise uma maior aplicabilidade clínica.

Vários trabalhos demonstram que nos carcinomas mamários, a presença de células iniciadoras tumorais é caracterizada pelo fenótipo CD44+/CD24-/low e pela expressão de ALDH (AL-HAJJ et al., 2003; GINEISTIER et AL., 2007; ). Nesta meta-análise, 12 estudos investigaram a associação entre o fenótipo triplo negativo e o perfil de expressão CD44+/CD24-/low (Quadro 7) e onze estudos avaliaram a associação entre o fenótipo triplo negativo e a expressão de ALDH (Quadro 10). Associações

estatisticamente significativas foram demonstradas entre os dois parâmetros, incluindo tanto o fenótipo CD44+/CD24-/low (OR combinada = 2,548, 95% IC:1,683 – 3,856,  $p < 0,0001$ ), como a expressão de ALDH (OR combinada = 1,911, 95% IC:1,162 – 3,142,  $p = 0,0004$ ).

A associação entre o fenótipo triplo negativo e os marcadores de células iniciadoras tumorais é relevante e pode justificar o pior prognóstico descrito para os carcinomas triplo negativos (GIATROMANOLAKI et AL., 2011) Estudos *in vitro* demonstram que as células iniciadoras tumorais apresentam características agressivas importantes, como capacidade de auto-renovação, alto potencial proliferativo, maior resistência aos agentes genotóxicos e maior resistência aos quimioterápicos (LI et al., 2008; RESETKOVA et al., 2009; MARCATO et al., 2011) Tais características devem explicar o comportamento mais agressivo dos carcinomas triplo negativos que cursam com pior prognóstico e menor sobrevida (RUIJTER et al., 2010; CETIN et al., 2014). Por outro lado, terapias baseadas em marcadores de células iniciadoras tumorais vem sendo desenvolvidas, criando novas perspectivas importantes para o tratamento dos carcinomas mamários triplo negativos que geralmente não apresentam opção terapêutica satisfatória (RUIJTER et al., 2010).

Associações entre a hiperexpressão de HER2 e o fenótipo CD44+/CD24-/low foram investigadas em 12 estudos (Quadro 8), enquanto 11 estudos investigaram as associações entre a hiperexpressão de HER2 e a expressão de ALDH (Quadro 11). Resultados divergentes foram obtidos para esses dois marcadores, sendo que fenótipo CD44+/CD24-/low não foi associado de forma significativa à hiperexpressão de HER2 (OR combinada = 0,475, 95% IC:0,372 – 0,606,  $p = 0,1989$ ), enquanto a expressão de ALDH esteve significativamente associada à hiperexpressão de HER2. Os doze estudos que investigaram a associação entre a hiperexpressão de HER2 e o fenótipo CD44+/CD24-/low (Quadro 8) falharam nesta constatação. Entretanto, a literatura apresenta achados controversos sobre a associação entre a hiperexpressão de HER2 e o fenótipo CD44+/CD24-/low, sendo positiva em alguns estudos (AULMANN et al.) e negativa em outros (LIN et al., 2012). Dentre os onze estudos que investigaram a associação entre a hiperexpressão de HER2 e a expressão de ALDH (Quadro 11), cinco (GINESTIER et al., 2007; MORIMOTO et al., 2009; RESETKOVA et al., 2009; ALI et

al., 2011; TSANG et al., 2012) demonstraram uma associação significativa positiva entre a hiperexpressão de HER2 e a expressão de ALDH, enquanto um estudo (GINESTIER et al., 2007a ) apresentou uma associação significativa negativa entre os dois parâmetros. Os tumores que apresentam hiperexpressão de HER2 são descritos como mais agressivos e de pior prognóstico (GOWN et al., 2008) entretanto, são tumores mais responsivos ao tratamento com drogas dirigidas ao HER2, como o Transtuzumab (Herceptin) (WOLFF et al., 2013).

Estudos comparando a eficiência do fenótipo CD44+/CD24-/low e da expressão de ALDH na caracterização de células iniciadoras tumorais tem sido desenvolvidos e sugerem que a população de células CD44+/CD24-/low seja diferente daquela que expressa ALDH, apesar de existir uma sobreposição entre as duas populações (ZHOU et al., 2010; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2010).

Associações entre o comprometimento de metástases linfonodais e o fenótipo CD44+/CD24-/low foram investigadas em 11 estudos (Quadro 10) e 11 estudos também avaliaram as associações entre metástases linfonodais e a expressão de ALDH (Quadro 7). Uma associação inversa, porém, estatisticamente significativa foi observada entre a presença de metástases linfonodais e o fenótipo CD44+/CD24-/low, quando os dados foram analisados de forma combinada. Esta associação inversa foi constatada em quatro (GIATROMANOLAKI et al., 2010; ALI et al., 2011; RICARDO et al., 2011; TSANG et al., 2012) dos 11 estudos revisados (Quadro 4). Dentre os 11 estudos que avaliaram o comprometimento de linfonodos regionais em relação à expressão de ALDH, nenhum constatou associação estatisticamente significativa (OR combinada = 1,151, 95% IC: 0,916 – 1,446, p = 0,2019). Há que se ressaltar que, de maneira geral, o aumento do número de linfonodos comprometidos agrava o prognóstico dos carcinomas de mama (BOER et al., 2010) e que nos estudos avaliados a estratificação dos tumores em relação ao número de linfonodos comprometidos não foi realizada. A discordância observada em relação aos dois marcadores de células iniciadoras tumorais aqui avaliadas, CD44+/CD24-/low e ALDH, e o comprometimento de linfonodos regionais reforça a hipótese de existirem duas subpopulações de células progenitoras que, embora possam ser sobrepostas, não são idênticas (ZHOU et al., 2010; ZHONG et al., 2014). Além disso, alguns estudos evidenciam a associação entre CITs positivas para o fenótipo

CD44+/CD24-/low com metástase à distancia, sugerindo uma característica de invasão preferencialmente hematogênica e não linfática ( AULMANN et al., 2010; ABRAHAM et al., 2005). Vale ressaltar, ainda, que a marcação imuno-histoquímica de CD44+/CD24-/low é mais heterogênea do que a de ALDH, sendo que há autores que consideram apenas marcação nuclear, enquanto outros consideram tanto marcação nuclear quanto citoplasmática (ADAMCZYK et al., 2014). Já na interpretação de ALDH, todos consideram apenas marcação nuclear. Desta forma, a avaliação do CD44+/CD24-/low torna-se mais heterogênea e controversa.

Uma limitação importante desta meta-análise consistiu na impossibilidade de se investigar a relação entre os marcadores de células iniciadoras tumorais e a sobrevida das pacientes. A falta de dados brutos de sobrevida nos estudos avaliados impediu esta análise. ZHOU et al. (2010), utilizando o programa GetData Graph Digitizer 2.24, digitalizou as curvas de sobrevida apresentadas nos diferentes artigos revisados em sua meta-análise e calculou as possíveis associações entre os marcadores de células iniciadoras tumorais e a sobrevida das pacientes avaliadas. Nossa meta-análise não usou tal estratégia, mas, consideramos a possibilidade de conhecer melhor esta ferramenta e utilizá-la em estudos futuros.

Com base nas análises realizadas neste estudo, concluímos que os marcadores CD44+/CD24-/low e ALDH representam uma importante ferramenta na identificação de células-iniciadoras tumorais nos carcinomas mamários. A possibilidade de se utilizar a imuno-histoquímica para a análise desses marcadores torna-os especialmente importantes em estudos retrospectivos que utilizam espécimes biológicos incluídos em parafina. As associações estatísticas significativas observadas entre a presença desses marcadores de células-iniciadoras tumorais em carcinomas triplo negativos abrem perspectivas importantes para o desenvolvimento de fármacos baseados na presença de CD44+/CD24-/low e de ALDH nesses tumores.

## 6. Conclusões e perspectivas futuras

---

Com base nos resultados obtidos nesta meta-análise, é possível concluir:

- a) No câncer de mama, o fenótipo triplo negativo está significativamente associado à presença das células iniciadoras tumorais, caracterizadas tanto pelo fenótipo CD44+/CD24-/low, como pela expressão de ALDH.
- b) Associações entre a hiperexpressão de HER2 e a presença de células iniciadoras tumorais apresentaram resultados divergentes, vez que o fenótipo CD44+/CD24-/low não foi associado de forma significativa à hiperexpressão de HER2, enquanto a expressão de ALDH esteve significativamente associada à hiperexpressão de HER2.
- c) Associações entre o comprometimento de metástases linfonodais e as células iniciadoras tumorais também apresentaram resultados divergentes, vez que uma associação inversa, porém, estatisticamente significativa foi observada entre a presença de metástases linfonodais e o fenótipo CD44+/CD24-/low, enquanto o comprometimento de linfonodos regionais não esteve significativamente associado à expressão de ALDH.
- d) As discordâncias observadas em relação aos dois marcadores de células iniciadoras tumorais aqui avaliados, CD44+/CD24-/low e ALDH, sugerem a hipótese de existirem duas subpopulações de células progenitoras que, embora possam ser sobrepostas, não são idênticas.
- e) O fenótipo CD44+/CD24-/low e expressão de ALDH representam uma importante ferramenta na identificação de células iniciadoras tumorais nos carcinomas mamários e as associações estatísticas observadas geram perspectivas importantes para o desenvolvimento de terapias moleculares baseadas na presença desses marcadores especialmente no tratamento dos carcinomas triplo negativos.



## 9. Referências

---

1. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athelougou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. **Clin Cancer Res.** 2005 Feb 1;11(3):1154-9
2. Adamczyk A, Niemiec JA, Ambicka A, Mucha-Małecka A, Mituś J, Ryś. CD44/CD24 as potential prognostic markers in node-positive invasive ductal breast cancer patients treated with adjuvant chemotherapy. **J Mol Histol.** 2014 Feb; 45(1):35-45. doi: 10.1007/s10735-013-9523-6. Epub 2013 Jul 9.
3. Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZ, Benhasouna A, Nolan C, Green AR, Ilyas M, Ellis IO. A CD44<sup>-</sup>/CD24<sup>+</sup> phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2012 Jun;133(3):979-95. doi: 10.1007/s10549-011-1865-8. Epub 2011 Nov 27.
4. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2003 Apr 1;100(7):3983-8. PubMed PMID: 12629218. Epub 2003/03/12. eng.
5. Ali HR, Dawson SJ, Blows FM, Provenzano E, Pharoah PD, Caldas C. Cancer stem cell markers in breast cancer: pathological, clinical and prognostic significance. **Breast Cancer Res.** 2011;13(6):R118. doi: 10.1186/bcr3061. Epub 2011 Nov 23.
6. Aulmann S, Waldburger N, Penzel R, Andeulis M, Schimacher P, Sinn HP. Reduction of CD44+/CD24-/low breast cancer cells by conventional cytotoxic chemotherapy. **Human Pathology.** 2010 41, 574-581.
7. Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, Brentani MM. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. **Oncol Rep.** 2012 Jan;27(1):28-38. doi: 10.3892/or.2011.1477. Epub 2011 Sep 28
- 8.
9. Bori R, Cserni G. Basal phenotype in breast carcinoma occurring in women aged 35 or younger. **Pathol. Oncol. Res.** 2008.

10. Cetin I, Topcul M. Triple negative breast cancer. **Asian Pac J Cancer Prev.** 2014;15(6):2427-31.
11. Charafe-Jauffret E(1), Ginestier C, Iovino F, Tarpin C, Diebel M, Esterni B, Houvenaeghel G, Extra JM, Bertucci F, Jacquemier J, Xerri L, Dontu G, Stassi G, Xiao Y, Barsky SH, Birnbaum D, Viens P, Wicha MS. Aldehyde dehydrogenase 1-positive cancer stem cells mediate metastasis and poor clinical outcome in inflammatory breast cancer. **Clin Cancer Res.** 2010 Jan 1;16(1):45-55. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1630. Epub 2009 Dec 22.
12. Croce CM. Oncogenes and cancer. **N Engl J Med.** 2008 Jan 31;358(5):502-11. doi: 10.1056/NEJMra072367. Review. No abstract available.
13. Currie MJ, Beardsley BE, Harris GC, Gunningham SP, Dachs GU, Dijkstra B, Morrin HR, Wells JE, Robinson BA. Immunohistochemical analysis of cancer stem cell markers in invasive breast carcinoma and associated ductal carcinoma in situ: relationships with markers of tumor hypoxia and microvasculature. **Hum Pathol.** 2013 Mar;44(3):402-11. doi: 10.1016/j.humpath.2012.06.004. Epub 2012 Oct 1.
14. de Boer M, van Dijck JA, Bult P, Borm GF, Tjan-Heijnen VC. Breast cancer prognosis and occult lymph node metastases, isolated tumor cells, and micrometastases. **J Natl Cancer Inst.** 2010 Mar 17;102(6):410-25. doi: 10.1093/jnci/djq008. Epub 2010 Feb 26. Review.
15. de Ruijter TC, Veeck J, de Hoon JP, van Engeland M, Tjan-Heijnen VC. Characteristics of triple-negative breast cancer. **J Cancer Res Clin Oncol.** 2011 Feb;137(2):183-92. doi: 10.1007/s00432-010-0957-x. Epub 2010 Nov 11.
16. Figueiredo E, Monteiro M, Ferreira A. **Tratado de Oncologia.** 2013. Aerinca. 1<sup>a</sup>. Ed. Revinter.
17. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med.** 2010 Nov 11; 363 (20):1938-48. PubMed PMID: 21067385. Epub 2010/11/12. eng.
18. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. **N Engl J Med.** 2010 Nov 11;363(20):1938-48. doi: 10.1056/NEJMra1001389. Review
19. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. **Med Oncol.** 2011 Sep;28(3):745-52. doi: 10.1007/s12032-010-9530-3. Epub 2010 Apr 20.

20. Ginestier C(1), Hur MH, Charafe-Jauffret E, Monville F, Dutcher J, Brown M, Jacquemier J, Viens P, Kleer CG, Liu S, Schott A, Hayes D, Birnbaum D, Wicha MS, Dontu G. ALDH1 is a marker of normal and malignant human mammary stem cells and a predictor of poor clinical outcome. **Cell Stem Cell**. 2007 Nov;1(5):555-67. doi: 10.1016/j.stem.2007.08.014.
21. Gobbi H. Classification of tumours of the breast: and update based on the new 2012 World Health Organization Classification. **J Bras Patol Med Lab**. 2012; 48, no.6:463-474.
22. Goldhirsch A, Wood WC, Coates AS, Gelber RD, Thürlimann B, Senn HJ; Panel members. Strategies for subtypes--dealing with the diversity of breast cancer: highlights of the St. Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2011. **Ann Oncol**. 2011 Aug;22(8):1736-47. doi: 10.1093/annonc/mdr304. Epub 2011 Jun 27.
23. Gown AM. Current issues in ER and HER2 testing by IHC in breast cancer. **Mod Pathol**. 2008 May;21 Suppl 2:S8-S15. doi: 10.1038/modpathol.2008.34. Review
24. Hammond ME, Fitzgibbons PL, Compton CC, Grignon DJ, Page DL, Fielding LP, Bostwick D, Pajak TF. College of American Pathologists Conference XXXV: solid tumor prognostic factors--which, how and so what? Summary document and recommendations for implementation. Cancer Committee and Conference Participants. **Arch Pathol Lab Med**. 2000 Jul;124(7):958-65. Review.
25. Honeth G, Bendahl PO, Ringnér M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lövgren K, Grabau D, Fernö M, Borg A, Hegardt C. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. **Breast Cancer Res**. 2008; 10(3):R53. doi: 10.1186/bcr2108. Epub 2008 Jun 17.
26. Idowu MO<sup>1</sup>, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, Manjili MH. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. **Hum Pathol**. 2012 Mar;43(3):364-73. doi: 10.1016/j.humpath.2011.05.005. Epub 2011 Aug 10.
27. Instituto Nacional do Câncer (INCA). Estimativas da incidência e mortalidade por câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Ministério da Saúde**. 2012

28. Irvin Jr WJ, Carey LA. What is triple-negative breast cancer? **European Journal of Cancer**. 2008; 2799-2805.
29. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. **N Engl J Med**. 2006 Sep 21;355(12):1253-61. Review.
30. Li X, Lewis MT, Huang J, et al. Intrinsic resistance of tumorigenic breast cancer cells to chemotherapy. **J Natl Cancer Inst** 2008; 100: 672-9.
- 31.
32. Liu C, Lou Y, Liu X, Lu P, Zhao Z,. Clinical Implication of CD44+/CD24-/low – Tumor cell ratio in breast cancer. **Cancer Biotherapy and Radiopharmaceutical**. 2012 27(8): 324-328. Doi 10.1089/cbr:2011.1155.
33. Lønning PE. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? **Ann Oncol**. 2007 Sep;18 Suppl 8:viii3-7. Review
34. Maciejczyk A. New prognostic factors in breast cancer. *Adv Clin Exp Med* 2013. 22, 1, 5-15.
35. Mahamodhossen YA, Liu W, Rong-Rong Z. Triple-negative breast cancer: new perspectives for novel therapies. **Med Oncol**. 2013;30(3):653. doi: 10.1007/s12032-013-0653-1. Epub 2013 Jul 4.
36. Marcato P, Dean CA, Giacomantonio CA, Lee PW. Aldehyde dehydrogenase: its role as a cancer stem cell marker comes down to the specific isoform. **Cell Cycle**. 2011 May 1;10(9):1378-84. Epub 2011 May 1. Review.
37. McDermott SP, Wicha MS . Targeting breast cancer stem cells. *Mol Oncol*. 2010 Oct;4(5):404-19. doi: 10.1016/j.molonc.2010.06.005. Epub 2010 Jun 17. Review.
38. Morimoto K(1), Kim SJ, Tanei T, Shimazu K, Tanji Y, Taguchi T, Tamaki Y, Terada N, Noguchi S. Stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1-positive breast cancers are characterized by negative estrogen receptor, positive human epidermal growth factor receptor type 2, and high Ki67 expression. **Cancer Sci**. 2009 Jun; 100(6):1062-8. doi: 10.1111/j.1349-7006.2009.01151.x. Epub 2009 Mar 9.
39. Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakos E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and

- CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. **Hum Pathol**. 2008 Jul;39(7):1096-102. PubMed PMID: 18495204. Epub 2008/05/23. eng.
40. Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakos E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, Nakopoulou L. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. **Hum Pathol**. 2008 Jul;39(7):1096-102. doi: 10.1016/j.humpath.2007.12.003. Epub 2008 May 20.
41. Nalwoga H, Arnes JB, Wabinga H, Akhlen LA. Expression of aldehyde dehydrogenase 1 (ALDH1) is associated with basal-like markers and features of aggressive tumours in African breast cancer. **Br J Cancer**. 2010 Jan 19;102(2):369-75. doi: 10.1038/sj.bjc.6605488. Epub 2009 Dec 15.
42. O'Malley FP, Pinder SE, Mulligan AM. 2011, **Breast Pathology** (Foundations in Breast Pathology) . 2a. Ed. Elsevier Saunders.
43. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. **Clin Cancer Res**. 2010 Feb 1;16(3):876-87. doi: 10.1158/1078-0432.CCR-09-1532. Epub 2010 Jan 26.
44. Payne SJL, Bowen RL, Jones JL, Wells CA. Predictive markers in breast cancer – the present. **Histopathology**. 2008. **52**; 82-90.
45. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602. Epub 2000/08/30. eng.
46. Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. **Eur J Cancer**. 2006 Jun;42(9):1219-24. Epub 2006 Apr 19.
47. Qiu Y, Pu T, Li L, Cheng F, Lu C, Sun L, Teng X, Ye F, Bu H. The expression of aldehyde dehydrogenase family in breast cancer. **J Breast Cancer**. 2014 Mar;17(1):54-60. doi: 10.4048/jbc.2014.17.1.54. Epub 2014 Mar 28.
48. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. **Pathology**. 2009 Jan;41(1):40-7. PubMed PMID: 19089739. Epub 2008/12/18. eng.
49. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal

- subtypes. **Clin Cancer Res.** 2009 Apr 1;15(7):2302-10. PubMed PMID: 19318481. Epub 2009/03/26. eng.
50. Rakha EA, Reis-Filho JS, Baehner F, Dabbs DJ, Decker T, Eusebi V, Fox SB, Ichihara S, Jacquemier J, Lakhani SR, Palacios J, Richardson AL, Schnitt SJ, Schmitt FC, Tan PH, Tse GM, Badve S, Ellis IO. Breast cancer prognostic classification in the molecular era: the role of histological grade. **Breast Cancer Res.** 2010;12(4):207. doi: 10.1186/bcr2607. Epub 2010 Jul 30. Review.
51. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. **Lancet.** 2011 Nov 19;378(9805):1812- 23. PubMed PMID: 22098854. Epub 2011/11/22. eng.
52. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. **Histopathology.** 2008 Jan;52(1):108-18. PubMed PMID: 18171422. Epub 2008/01/04. eng.
53. Resetkova E, Reis-Filho JS, Jain RK, Mehta R, Thorat MA, Nakshatri H, Badve S. Prognostic impact of ALDH1 in breast cancer: a story of stem cells and tumor microenvironment. **Breast Cancer Res Treat.** 2010 Aug;123(1):97-108. doi: 10.1007/s10549-009-0619-3. Epub 2009 Nov 13.
54. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitão D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, Milanezi F, Schmitt F, Paredes J. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. **J Clin Pathol.** 2011 Nov;64(11):937-46. doi:10.1136/jcp.2011.090456. Epub 2011 Jun
55. Santos EJJ, Cunha M. Critical interpretation of statistical results of a meta-analysis: methodological strategies. *Millennium.* 2013 Jan; 44:85.
56. Schnitt SJ. Classification and prognosis of invasive breast cancer: from morphology to molecular taxonomy. **Mod Pathol.** 2010 May;23 Suppl 2:S60-4. doi: 10.1038/modpathol.2010.33. Review.
57. Sinn HP, Kreipe H. A Brief Overview of the WHO Classification of Breast Tumors, 4th Edition, Focusing on Issues and Updates from the 3rd Edition. **Care (Basel).** 2013 May;8(2):149-54. doi: 10.1159/000350774. Review
58. Tsang JY, Huang YH, Luo MH, Ni YB, Chan SK, Lui PC, Yu AM, Tan PH, Tse GM. Cancer stem cell markers are associated with adverse biomarker profiles and molecular subtypes of breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.** 2012 Nov;136(2):407-17. doi: 10.1007/s10549-012-2271-6. Epub 2012 Sep 30.

59. Tiezzi DG, Valejo FAM, Marana HRC, Carrara HHA, Antonio MMR, Sicchieri RD, Milanez CM, Silva JS, Andrade JM. CD44+/CD24-/low cells and lymphnode metastasis in stage I and II invasive ductal carcinoma.
60. Velasco-Velázquez MA, Homsí N, De La Fuente M, Pestell RG. Breast cancer stem cells. **Int J Biochem Cell Biol.** 2012 Apr;44(4):573-7. doi: 10.1016/j.biocel.2011.12.020. Epub 2012 Jan 9. Review.
61. Verma S, Miles D, Gianni L, Krop IE, Welslau M, Baselga J, Pegram M, Oh DY, Diéras V, Guardino E, Fang L, Lu MW, Olsen S, Blackwell K; EMILIA Study Group. Trastuzumab emtansine for HER2-positive advanced breast cancer. **N Engl J Med.** 2012 Nov 8;367(19):1783-91. doi: 10.1056/NEJMoa1209124. Epub 2012 Oct 1. Erratum in: *N Engl J Med.* 2013 Jun 20;368(25):2442.
62. Wolff AC, Hammond ME, Hicks DG, Dowsett M, McShane LM, Allison KH, Allred DC, Bartlett JM, Bilous M, Fitzgibbons P, Hanna W, Jenkins RB, Mangu PB, Paik S, Perez EA, Press MF, Spears PA, Vance GH, Viale G, Hayes DF; Recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer: American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists clinical practice guideline update. American Society of Clinical Oncology; **College of American Pathologists.** **J Clin Oncol.** 2013 Nov 1;31(31):3997-4013. doi: 10.1200/JCO.2013.50.9984. Epub 2013 Oct 7.
63. Wu Y, Sarkissyan M, Elshimali Y, Vadgama JV. Triple negative breast tumors in African-American and Hispanic/Latina women are high in CD44+, low in CD24+, and have loss of PTEN. **PLoS One.** 2013 Oct 22;8(10):e78259. doi: 10.1371/journal.pone.0078259. eCollection 2013
64. Zhong Y, Shen S, Zhou Y, Mao F, Guan J, Lin Y, Xu Y, Sun Q. ALDH1 is a better clinical indicator for relapse of invasive ductal breast cancer than the CD44+/CD24- phenotype. **Med Oncol.** 2014 Mar;31(3):864. doi: 10.1007/s12032-014-0864-0. Epub 2014 Feb 12.
65. Zhou L, Jiang Y, Yan T, Di G, Shen Z, Shao Z, Lu J. The prognostic role of cancer stem cells in breast cancer: a meta-analysis of published literatures. **Breast Cancer Res Treat.** 2010 Aug;122(3):795-801. doi: 10.1007/s10549-010-0999-4. Epub 2010 Jun 23.