

SUSANA OLIVEIRA BOTELHO RAMALHO

**EXPRESSÃO DO HER-2 EM PACIENTES BRASILEIRAS COM
CARCINOMA DA MAMA RECEPTOR DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA NEGATIVO**

Dissertação de Mestrado

**ORIENTADOR: Prof. Dr GUSTAVO ANTONIO DE SOUSA
CO-ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN**

**Unicamp
2012**



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Médicas

**EXPRESSÃO DO HER-2 EM PACIENTES BRASILEIRAS COM
CARCINOMA DA MAMA RECEPTOR DE ESTRÓGENO E
PROGESTERONA NEGATIVO**

SUSANA OLIVEIRA BOTELHO RAMALHO

Dissertação de Mestrado apresentada
ao Programa de Pós-Graduação em
Tocoginecologia da Faculdade de Ciências
Médicas da Universidade Estadual de
Campinas para obtenção do Título de
Mestre em Ciências da Saúde, área de
concentração em Oncologia Ginecológica
e Mamária, sob orientação do Prof. Dr.
Gustavo Antonio de Sousa e co-orientação
da Prof^a. Dr^a. Sophie Françoise Mauricette
Derchain

Campinas, 2012

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA POR
ROSANA EVANGELISTA PODEROSO – CRB8/6652
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

R141e Ramalho, Susana Oliveira Botelho, 1977 -
Expressão do HER-2 em pacientes brasileiras com
carcinoma da mama receptor de estrógeno e progesterona
negativo. / Susana Oliveira Botelho Ramalho. -- Campinas,
SP : [s.n.], 2012.

Orientador: Gustavo Antonio de Sousa
Co-orientador: Sophie Françoise Mauricette Derchain
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de
Campinas, Faculdade de Ciências Médicas.

1. Neoplasias da Mama. 2. Análise de sobrevida. 3. Receptor
erbB-2. I. Sousa, Gustavo Antonio de. II. Derchain, Sophie
Françoise Mauricette. III. Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Ciências Médicas. VI. Título.

Informações para Biblioteca Digital

Título em inglês: HER-2 expression in Brazilian patients with estrogen and progesterone receptor-negative breast carcinoma

Palavra-chave em inglês:

Breast Neoplasms
Survival Analysis
Receptor, ebrB-2

Área de Concentração: Oncologia Ginecológica e Mamária

Titulação: Mestre em Ciências da Saúde

Banca examinadora:

Gustavo Antonio de Sousa [Orientador]
Luiz Carlos Zeferino
Daniel Guimarães Tiezzi

Data da defesa: 28-02-2012

Programa de Pós-Graduação: Tocoginecologia

Diagramação e arte-final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Aluna: SUSANA OLIVEIRA BOTELHO RAMALHO

Orientador: Prof. Dr. GUSTAVO ANTONIO DE SOUZA

Co-Orientadora: Prof^a. Dr^a. SOPHIE FRANÇOISE MAURICETTE DERCHAIN

Membros:

1.

2.

3.

**Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas**

Nome correto do orientador:

GUSTAVO ANTONIO DE SOUZA

Data: 28/02/2012


Prof. Dr. José Barreto Campello Carvalheira
Coordenador de Comissão de Pós-Graduação
FCM/UNICAMP
Matrícula 28611-0

Dedico este trabalho...

Aos meus pais,
A quem devo tudo o que sou.

Aos meus irmãos, Nana, Bê e Tico
“There’s no free lunch.”

À Maria
Pela alegria imensurável.

Ao meu esposo Ju
pelo amor e paciência

À Catarina
minha filhota e inspiração.

Agradecimentos

Ao meu orientador, Prof. Dr. Gustavo Antonio de Sousa, pelo apoio e competente orientação deste trabalho.

A minha co-orientadora, Profa. Dra. Sophie Françoise Mauricette Derchain, por ter me aceito como aluna, tornando este mestrado possível, e sendo um exemplo de professora e pesquisadora.

Ao Prof. Dr. Luis Otávio Sarian e ao Dr. Caio Augusto Hartman pelo incentivo e ajuda na finalização desta dissertação.

Aos membros da banca de qualificação, Prof. Dr. Luiz Carlos Teixeira e Prof Dr. Luiz Carlos Zeferino, que muito contribuíram para a elaboração final desta dissertação.

Ao Prof. Dr. José Vassallo pela paciência e contribuição essencial na avaliação dos casos desta dissertação.

À Dra. Glauce Aparecida Pinto pelo empenho e orientação na realização deste trabalho.

Ao Dr. Juvenal Antunes de Oliveira Filho e à Dra. Alice Helena Rosante Garcia pelo incentivo e otimismo durante toda esta jornada.

Aos Drs. Otávio Martucci, Guilherme Redi e Edra Domingues, pela amizade e companheirismo nos momentos difíceis.

Ao Dr. Carlos Augusto Beato, Dra. Ana Lucia Coradazzi e colegas da residência do Hospital Amaral Carvalho que me ensinaram a Oncologia Clínica com competência e dedicação .

A estatística Eliana Miranda pela paciência, amizade e dedicação na análise estatística deste trabalho.

Aos funcionários do SAME, da ASTEC e do ambulatório de quimioterapia do CAISM que, sempre solícitos, viabilizaram a finalização desta dissertação.

Agradecimentos Institucionais

Este estudo teve a participação dos:
Departamentos de Tocoginecologia e de Anatomia Patológica
da Faculdade de Ciências Médicas – UNICAMP.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas	viii
Resumo	x
Summary	xiii
1. Introdução	16
2. Objetivos	26
2.1. Objetivo geral	26
2.2. Objetivos específicos.....	26
3. Publicação.....	27
4. Conclusões.....	53
5. Referências Bibliográficas.....	54
6. Anexos	59
6.1. Anexo 1 – Parecer do CEP	59
6.2. Anexo 2 – Carta de pedido de dispensa do termo de consentimento	62
6.3. Anexo 3 – Ficha de Coleta de Dados.....	63

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

- AC-T** – Antraciclina mais Ciclofosfamida seguido de paclitaxel
- AC-TH** – Antraciclina mais Ciclofosfamida seguido de paclitaxel mais trastuzumab
- BRCA 1** – Gene do câncer da mama 1
- CAISM** – Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
- CEP** – Comitê de Ética em Pesquisa
- CK5/6** – Citoqueratina 5/6
- CMF** – Ciclofosfamida, Metotrexate e Fluorouracil
- DNA** – Ácido Desoxirribonucleico
- EGFR** – Receptor do fator de crescimento epidérmico
- Et al** – e colaboradores
- FAPESP** – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
- HER-2** – Receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
- NCCN** – Rede Nacional de estudo do Câncer (*National Comprehensive Cancer Network*)
- RE** – Receptor de Estrógeno

- RP** – Receptor de progesterona
- SLR** – Sobrevida Livre de Recidiva
- SG** – Sobrevida Global
- SPSS** – Pacote estatístico para ciências sociais (*statistical package for social sciences*)
- TCH** – Carboplatina mais docetaxel mais trastuzumab
- TN** – triplo negativo
- TMA** – Microarranjo de tecido (*Tissue Microarray*)
- TOP2A** – Topoisomerase II α

Resumo

Introdução: O câncer da mama é a segunda neoplasia mais frequente no mundo. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, é a neoplasia mais incidente no sexo feminino. No Brasil, a estimativa do câncer da mama para o ano de 2012 é de 52.608 novos casos. Os cânceres da mama que não expressam receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) apresentam uma sobrevida pior comparada aos cânceres da mama que expressam esses receptores. O *Human Epidermal growth factor Receptor 2* (HER-2) é uma oncoproteína cuja hiperexpressão ocorre em aproximadamente 20% dos carcinomas da mama e associa-se a um fenótipo mais agressivo. Nos carcinomas da mama RE e RP negativos, a expressão do HER-2 identifica dois grupos: os carcinomas da mama que hiperexpressam o HER-2, chamados duplo negativo com HER-2 hiperexpressado, e os carcinomas da mama que não hiperexpressam o HER-2, chamados triplo negativos. **Objetivo:** Avaliar a relação entre os fatores clínicos e patológicos e a sobrevida em pacientes com carcinomas da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo. **Sujeitos e Métodos:** Foram selecionadas as pacientes com carcinoma invasivo da mama diagnosticadas e tratadas no Hospital da Mulher Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti – Centro de Atenção Integral à Saúde

da Mulher da Universidade Estadual de Campinas (Unicamp), entre abril de 2004 e outubro de 2008, seguidas até outubro de 2010. A expressão dos RE e RP foi avaliada por imunoistoquímica (IIQ) em microarranjo de tecidos (TMA). A expressão de HER-2 foi avaliada por IIQ e Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH). A expressão do HER-2 foi classificada pela IIQ exclusiva nos casos HER-2 escore 0 ou 1+ e 3+. Nos casos em que a IIQ mostrou-se indeterminada (2+) foi realizado FISH. Assim, foram classificados como HER-2 negativos os casos escore 0 e 1+, e os casos escore 2+ com FISH negativo. Foram considerados HER-2 positivos os casos escore 3+ e os casos escore 2+ com FISH positivo. Foram incluídas no estudo 161 pacientes, sendo 58 duplo negativo HER-2 hiperexpressado (RE e RP negativos e HER-2 positivo) e 103 triplo negativo (RE, RP e HER-2 negativos). Foram avaliados: idade ao diagnóstico, estágio, grau nuclear, grau histológico, presença de invasão vascular e tipo histológico. Também foi avaliada utilização de quimioterapia adjuvante e neoadjuvante baseada em antraciclina, e se foi associado taxano. Foram calculados os *odds ratios* (OR) brutos e os *odds ratios* ajustados com os respectivos intervalos de confiança (IC95%) para as características clínicas e patológicas, comparando carcinomas da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo. Foram calculados os *Hazard Ratios* (HR) com os respectivos IC95% em relação à sobrevida geral, para as variáveis clínicas e patológicas. **Resultados:** Comparando as pacientes com carcinomas da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo, observou-se que as medianas da idade foram de 54 e 52, respectivamente. Não houve diferença na distribuição por idade em função da expressão do HER-2. Nesta

casuística, mais de 80% das pacientes apresentaram a doença em estádios II e III. Houve o predomínio do grau histológico III e do grau nuclear 3 em ambos os grupos. As pacientes com carcinomas da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado apresentaram invasão vascular em 27,5% dos casos quando comparadas com 14,5% nas pacientes triplo negativo ($p=0,06$). Nas pacientes com carcinoma da mama triplo negativo observou-se 11% de tipos histológicos mais indiferenciados. Em relação ao local das metástases, ambos os grupos tiveram um percentual maior que 50% de metástases viscerais. A mediana de seguimento foi de 36 meses (percentis 25/75: 25/78 meses). A expressão do HER-2 não interferiu com a sobrevida. O estágio III e a utilização de antraciclina aumentaram significativamente o risco de morte pela doença ($p<0,001$ e $p=0,007$ respectivamente). A presença de invasão vascular não se relacionou com a sobrevida ($p=0,05$). A sobrevida das pacientes com estádios I-II foi significativamente maior do que daquelas com estágio III, tanto para carcinomas duplo negativo com HER-2 hiperexpressado ($p<0,0001$) quanto para os triplo negativos ($p=0,03$). Não houve diferença na sobrevida das pacientes com carcinoma duplo negativo HER-2 hiperexpressado e carcinoma triplo negativo nos estádios I + II ($p=0,13$) e estádios III ($p=0,34$).

Conclusão: Nesta casuística de 161 pacientes com carcinoma da mama RE e RP, independente da expressão do HER-2, houve um predomínio de estádios avançados e de tumores indiferenciados. A expressão do HER-2 não se associou com a sobrevida global. Apenas o estágio III e a utilização de antraciclina estiveram relacionados com maior probabilidade de óbito pela doença.

Summary

Introduction: Breast cancer is the second most common malignancy worldwide. Aside from non-melanoma skin cancers, breast cancer is the most common malignancy among women. In Brazil, approximately 52,608 new cases of breast cancer are predicted to occur in 2012. Breast cancers that do not express estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) have a worse survival rate, in comparison to breast cancers that express these receptors. Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 (HER2) is an oncoprotein that is overexpressed in approximately 20% of breast carcinomas and is associated with a more aggressive phenotype. In ER and PR receptor-negative breast carcinomas, HER2 expression identifies two groups: breast carcinomas that overexpress HER2, termed double negative HER2-overexpressing tumors and breast carcinomas that do not overexpress HER2, termed triple negative. **Objective:** To assess the relationship between clinical-pathological factors and survival in patients with double negative HER2-overexpressing and triple negative breast carcinomas. **Subjects and Methods:** Patients with invasive breast carcinoma diagnosed and treated in the Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti's Women's Hospital – Integrated Healthcare Center of the *Universidade Estadual de Campinas* (Unicamp) were

selected from April 2004 to October 2008, receiving follow-up care until October 2010. ER and PR expression was evaluated by immunohistochemistry (IHC) in tissue microarray (TMA). HER2 expression was evaluated by IHC and Fluorescent in situ Hybridization (FISH) analysis. HER2 expression was assessed exclusively by IHC in cases scored 0 or 1+ and 3+ HER2. If IHC test scored 2+ (equivocal), FISH analysis was performed. Thus, scores 0/1+, and 2+/FISH-negative were classified as HER2-negative. Score 3+, and score 2+/ FISH-positive cases were classified as HER2-positive. One hundred and sixty-one (161) patients were included in the study. Of these patients, 58 had double negative HER2-overexpressing (ER/PR-negative, HER2-positive) breast tumor and 103 had triple negative (ER-negative/PR-negative/HER2-negative) breast tumor. Age at the time of diagnosis, stage, nuclear grade, histologic grade, presence of vascular invasion and histologic type were evaluated. The use of adjuvant and neoadjuvant anthracycline-based chemotherapy was assessed and also whether this regimen was combined with taxane. The crude odds ratios (OR) and adjusted odds ratios with their respective confidence intervals (95%CI) for clinical and pathological characteristics were calculated, comparing double negative HER2-overexpressing breast carcinoma with triple negative breast carcinoma. The Hazard Ratio (HR) with the respective 95%CI in relation to overall survival was calculated for clinical and pathological variables. **Results:** Patients with double negative HER2-overexpressing breast tumors were compared to those with triple-negative breast tumors (median patient age: 54 and 52 years, respectively). There was no difference in age distribution according to HER2 expression. In this case study, more than 80% of patients had Stage II and III disease, with a predominance of histologic grade III and nuclear

grade 3 in both groups. Patients bearing double negative HER2-overexpressing breast carcinomas had vascular invasion in 27.5% of cases compared to 14.5% of triple negative patients ($p= 0.06$). In patients with triple negative breast carcinoma, more undifferentiated histologic types were observed in 11% of cases. Regarding metastasis site, the incidence of visceral metastasis was higher than 50% in both groups. The median follow-up period was 36 months (percentiles 25/75: 25/78 months). HER2 expression did not interfere with patient survival. Stage III disease and the use of anthracycline significantly increased the risk of death from the disease ($p<0.001$ and $p=0.007$, respectively). The presence of vascular invasion was not related to survival ($p=0.05$). Patients with Stage I-II disease survived significantly longer than those with Stage III disease in both double negative HER2-overexpressing tumors ($p<0.0001$) and triple negative tumors ($p=0.03$). There was no difference in survival of patients with double negative HER2-overexpressing carcinomas and triple negative carcinomas in Stages I + II ($p= 0.13$) and Stages III ($p= 0.34$). **Conclusion:** In this case study of 161 patients with ER/PR-negative breast carcinoma, there was a predominance of advanced stages. Virtually 50% of the patients seen in this service presented with Stage III disease. Regardless of HER2 expression, undifferentiated tumors (histologic grade III and nuclear grade 3 predominated. It was observed that triple negative carcinomas had a higher proportion of special histologic types. Vascular invasion was slightly more frequent in double negative HER2-overexpressing carcinoma and was not associated with survival. HER2 expression was not associated with overall survival. Only Stage III and the use of anthracycline were related to a higher probability of death due to the disease.

1. Introdução

O câncer da mama é a segunda neoplasia mais frequente no mundo. É o tipo de câncer que mais acomete as mulheres, tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. Para o ano de 2008 foi esperado 1,38 milhão de casos, o que representa 23% de todos os tipos de câncer (1). No Brasil a estimativa do câncer da mama para o ano de 2012 é de 52.608 novos casos. O risco estimado é de 52 casos a cada 100 mil mulheres. Na região Sudeste é a neoplasia mais frequente, com o risco estimado de 69 casos por 100 mil. O mesmo ocorre nas regiões Sul (65/100.000), Centro-Oeste (48/100.000) e Nordeste (32/100.000) (2). Também é a principal causa de morte por câncer em mulheres. Estima-se que ocorreram 269.000 óbitos em países desenvolvidos e 189.000 óbitos em países em desenvolvimento (1).

O câncer da mama é uma doença heterogênea cuja origem está intimamente, porém não exclusivamente, relacionada a alterações genéticas (3). Além das alterações genéticas, associam-se influências do meio ambiente que juntas podem inibir genes supressores tumorais e ativar oncogenes. A carcinogênese

mamária ocorre quando uma célula-tronco na unidade ducto-lobular, a partir da alteração inicial, multiplica-se com instabilidade genômica e perde sua capacidade de reconhecer, corrigir danos no DNA e defeitos de replicação (4).

Atualmente algumas alterações genéticas, como a amplificação do oncogene que codifica o Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano (HER-2) e a determinação da positividade para RE e RP, são utilizadas na avaliação do prognóstico e escolha do tratamento adjuvante (5).

Os RE e RP fazem parte de uma família de receptores hormonais nucleares. Eles agem como fatores de transcrição nuclear modulados por ligantes. A ligação do estrogênio no domínio do receptor sinaliza a via do receptor do fator de crescimento, ativando-o. Uma vez ativado, seus dímeros recrutam coativadores e intermediam a transcrição de genes através da ligação de elementos de resposta ao estrógeno em genes-alvo (6).

Os carcinomas da mama RE e RP positivos dependem destes hormônios para seu crescimento e têm melhor prognóstico do que tumores que não expressam esses marcadores, com taxas de sobrevida livre de recidiva (SLR) 5% a 10% maiores em cinco anos (7). Respondem a manipulação hormonal que tem como objetivo impedir que as células cancerosas da mama recebam estimulação endógena de estrogênio. O tamoxifeno é um modulador seletivo do RE que classicamente serve a este propósito e tem um efeito antiproliferativo por competir com o estrógeno na ligação com receptores proteicos, bloqueando o ciclo celular. Deste modo há um acúmulo de células em fase G1, com inibição da

proliferação celular. Uma metanálise recentemente atualizada confirma que o uso por cinco anos de tamoxifeno comparado com nenhuma terapia adjuvante diminui significativamente os riscos de recorrência e morte por câncer da mama. Este benefício não existe em carcinomas da mama que não expressam RE ou RP (8).

O HER-2, ou *Human Epidermal growth factor Receptor 2*, é uma glicoproteína transmembrana, membro da família dos *epidermal growth factor receptor* que inclui HER-1 (EGFR-1), HER-2, HER-3 e HER-4. A ativação do oncogene HER-2 no cromossomo 17 resulta na síntese da glicoproteína HER-2 cujo domínio intracelular possui atividade de tirosina kinase. A ligação dos fatores de crescimento ao domínio extracelular desencadeia a heterodimerização entre receptores. A heterodimerização ativa a via da tirosina kinase, levando à fosforilação de proteínas de sinalização celular que induzem a proliferação das células tumorais (9).

Aproximadamente 20% dos carcinomas da mama possuem a amplificação do gene HER-2 que leva à hiperexpressão do HER-2. Esta condição se associa a um fenótipo tumoral mais agressivo que frequentemente não expressa RE e apresenta níveis elevados de marcadores de proliferação tumoral (porcentagem alta de células em fase S do ciclo celular, MIB-1 e KI-67) A hiperexpressão do HER-2 também se associa com os altos riscos de recidiva e morte na ausência de uma terapia sistêmica adjuvante (9).

A expressão do HER-2 é muito importante na prática clínica. Pacientes cujos carcinomas hiperexpressam HER-2 (HER-2 positivos) beneficiam-se do tratamento com agentes que anulam a função do HER-2, como o Trastuzumabe e o Lapatinib (10).

A avaliação da expressão do HER-2 em carcinomas da mama recém-diagnosticados ou metastáticos é recomendada desde 2001. Existem várias maneiras de medir a atividade do oncogene HER-2 e identificar os carcinomas da mama que são HER-2 positivos. A avaliação pode ser feita principalmente com ensaios de imunoistoquímica que avaliam a expressão da proteína HER-2 ou com ensaios que avaliam a amplificação do gene HER-2 através da Hibridização Fluorescente *in situ* (FISH). O algoritmo da Sociedade Americana de Oncologia clínica (ASCO) e do Colégio Americano de Patologistas (CAP) indica primeiro a realização da imunoistoquímica. Um escore 3+ é considerado positivo, um escore 2+ é duvidoso e um escore 0 a 1+ é negativo. Os carcinomas HER-2 2+ devem ser complementados com FISH, sendo positivos se houver amplificação (11).

Além da avaliação dos RE e RP e da expressão do HER-2, estudos moleculares do carcinoma da mama permitem uma classificação de acordo com o perfil de expressão gênica. Os trabalhos de Perou e Sorlie (12,13) representaram um importante avanço quando descreveram quatro subtipos tumorais e os correlacionaram com a sobrevida. O subtipo luminal A apresenta frequentemente um fenótipo RE positivo e HER-2 negativo e um melhor prognóstico. O subtipo luminal B tem fenótipo RE positivo e HER-2 positivo. O subtipo que hiperexpressa HER-2 tem fenótipo RE negativo e HER-2 positivo, apresentando um comportamento mais agressivo pela falta de expressão de RE. O subtipo basal frequentemente apresenta fenótipo RE negativo e HER-2 negativo. É um

subtipo extremamente agressivo e de pior prognóstico. A ausência de um alvo terapêutico definido restringe seu tratamento à quimioterapia tradicional.

Na prática clínica, a decisão da terapêutica para um carcinoma da mama inclui, além da análise da expressão do HER-2 e dos RE e RP, a avaliação de outros fatores prognósticos. Os mais relevantes são o grau de envolvimento dos linfonodos axilares, o tamanho tumoral, o grau histológico, a presença de invasão vascular, o índice proliferativo e a idade do paciente. A metástase linfonodal, o maior tamanho tumoral, o grau histológico III, a presença de invasão vascular, o alto índice proliferativo e a menor idade da paciente são fatores de pior prognóstico (14). Também a classificação histológica do tumor tem valor prognóstico, influenciando a conduta clínica. Aproximadamente 85% dos carcinomas da mama são ductais. A maioria dos carcinomas ductais é classificada como invasivo, sem outra especificação, e a minoria é composta por tipos histológicos especiais. Os tipos histológicos especiais são os carcinomas tubulares, medulares, mucinosos e papilífero, além de outros subtipos mais raros como metaplásico e apócrino. Estes subtipos podem, dependendo do grau de diferenciação, ter melhor ou pior prognóstico (15).

A análise da expressão do HER-2 em carcinomas da mama que não expressam RE ou RP identifica dois grupos: os de carcinomas da mama que hiperexpressam HER-2, chamados duplo negativo HER-2 hiperexpressado e os de carcinomas da mama que não hiperexpressam HER-2, conhecidos como triplo negativo.

Os carcinomas da mama triplo negativo representam em torno de 15% dos carcinomas da mama. Possuem como características clínicas serem mais frequentes na pré-menopausa e em pacientes com mutação do gene do câncer da mama 1 (BRCA1). Usualmente são tumores de crescimento rápido, diagnosticados no intervalo entre mamografias, sem um prognóstico necessariamente relacionado ao tamanho tumoral e ao *status* linfonodal (16).

Estes carcinomas apresentam altos riscos de recorrência e óbito em 5 anos. As recorrências tendem a ser principalmente em vísceras, que são de metástases de pior prognóstico. Também apresentam uma propensão a metástases em sistema nervoso central (16,17,18). As características patológicas são de tumores de alto grau, com elevadas taxas de proliferação, histologias ductais na maioria, porém também prevalecem outras histologias agressivas como carcinomas metaplásicos, medulares típicos e medulares atípicos e tumores adenóide-cístico (19).

A quimioterapia adjuvante é a única modalidade terapêutica para diminuição de risco de recidiva em carcinomas da mama triplo negativos. Os carcinomas da mama triplo negativos são sensíveis à quimioterapia, apresentando altas taxas de resposta em protocolos de neoadjuvância (20). Estes protocolos foram baseados na quimioterapia convencional que utilizou antraciclinas e taxanos.

As antraciclinas (doxorrubicina, epirrubucina, daunorrubicina e idarrubicina) são antibióticos antitumorais derivados da actinobacteria *Streptomyces peucetius* var. *caesius*. No tratamento dos carcinomas da mama as antraciclinas mais

comumente usadas são a doxorubicina e a epirrubucina. Elas agem ligando-se diretamente ao DNA, sofrendo reação de transferência de elétrons, gerando radicais livres e lesando o DNA sob a forma de ruptura de filamentos únicos ou ligação cruzada (21)

Atualmente estes quimioterápicos são considerados o tratamento-padrão para os carcinomas da mama triplo negativo. Apesar das respostas iniciais às antraciclinas e taxanos, os carcinomas da mama triplo negativo ainda apresentam elevados riscos de recidiva e óbito (22).

Recentemente, alguns estudos retrospectivos (23,24) sugeriram que o protocolo CMF (ciclofosfamida, metotrexate e fluorouracil) seria superior aos protocolos com antraciclinas nos carcinomas da mama triplo negativo. Uma possível justificativa para esta hipótese é que as células BRCA1 deficientes, assim como muitas células dos carcinomas da mama triplo negativo, são muito sensíveis a agentes alquilantes. A ciclofosfamida presente no protocolo CMF é um agente alquilante que, ao modificar de modo covalente as bases do DNA, induz uma ligação cruzada de filamentos. Deste modo o DNA “quebrado” torna-se incapaz de completar a replicação ou divisão celular (25).

Estes estudos em conjunto geram hipóteses para novas pesquisas. O tratamento dos carcinomas da mama Triplo negativo é ainda um desafio, considerando agressividade e pior sobrevida comparadas com os carcinomas da mama não triplo negativo (22).

Os carcinomas da mama que hiperexpressam o HER-2 são associados a tumores de alto grau, pouco diferenciados, com alto nível de proliferação celular e envolvimento linfonodal (26). Este subgrupo de pacientes possui uma doença mais agressiva com pior sobrevida global e livre de doença, com pico de recidiva entre 18-24 meses pós-diagnóstico e uma tendência a recidivas mais frequentes em sistema nervoso central (27). O desenvolvimento de um anticorpo monoclonal humanizado chamado trastuzumab, associado à quimioterapia adjuvante, proporcionou uma diminuição importante do risco de recidiva e da mortalidade (22).

A maioria dos estudos de quimioterapia adjuvante associa o uso das antraciclinas nos carcinomas da mama que hiperexpressam o HER-2 com uma melhor sobrevida. Especificamente uma metanálise de oito estudos observou que a quimioterapia adjuvante baseada em antraciclina nos carcinomas da mama que hiperexpressam HER-2 leva à diminuição do risco de recidiva em 29% e do risco de óbito em 27%. Este benefício não foi observado nos carcinomas da mama HER-2 negativos (28).

Uma das hipóteses para este resultado seria que é possível que os carcinomas da HER-2 negativo não se beneficiem da quimioterapia baseada em antraciclina. O benefício da quimioterapia baseada em antraciclina pode estar restrito aos pacientes cujos carcinomas tenham amplificação de HER-2 e da Topoisomerase II α (TOP2A). A TOP2A, cujo gene é adjacente ao gene HER-2 no cromossomo 17, é uma enzima-chave para duplicação do DNA e um alvo molecular das antraciclinas. Encontra-se amplificada em 24% a 54% dos

carcinomas da mama que hiperexpressam HER-2. Apesar desta suspeita, não há consenso de que o verdadeiro alvo das antraciclinas seja a TOP2A e não a hiperexpressão do HER-2 (29).

Outro estudo que recentemente reviu esta hipótese foi o do Grupo Internacional de Estudo do Câncer da Mama (BCIRG 006)(30). Nesse trabalho, pacientes HER-2 positivo foram avaliados quanto à quimioterapia adjuvante baseada em antraciclina [doxorubicina e ciclosfosfamida, seguido de docetaxel com ou sem trastuzumab (AC-T ou ACTH)] e um terceiro grupo recebeu um protocolo sem antraciclina chamado TCH (docetaxel, carboplatina e trastuzumab). Os resultados mostraram que não houve diferença estatística na sobrevida global e livre de recidiva entre o protocolo TCH e o protocolo AC-TH. Assim os autores sugerem que considerando o benefício do protocolo TCH, provavelmente a antraciclina, não é necessária em pacientes com a amplificação da TPO2A e pode não ser efetiva em pacientes que não têm a amplificação da TOP2A.

O consenso atual é que a quimioterapia baseada em antraciclina seja recomendada para pacientes com carcinoma da mama que hiperexpressam HER-2, exceto se houver alguma contraindicação, como o uso prévio de antraciclina ou alto risco de toxicidade cardíaca (31).

Atualmente a determinação da positividade para os RE e RP e a amplificação do oncogene *Human Epidermal growth fator Receptor 2* (HER2) são utilizadas como fatores prognósticos e preditivos da resposta ao tratamento

sistêmico (5). Os carcinomas da mama que não expressam os RE e RP são mais indiferenciados e têm comportamento mais agressivo e pior prognóstico (7,32,33). São chamados triplo negativo (TN) quando não expressam o HER-2 e duplo negativo com HER-2 hiperexpressado, quando este receptor é positivo (33). Ainda não há consenso em relação ao efeito prognóstico da expressão do HER-2 nessas pacientes (34,35).

O melhor conhecimento do efeito prognóstico da expressão do HER-2 nos carcinomas da mama RE e RP negativo e a relação entre os fatores clínicos e patológicos e sobrevida das pacientes com carcinoma da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo será útil para decisão terapêutica e desenvolvimento de terapias mais eficazes.

2. Objetivos

2.1. Objetivo geral

Avaliar a relação entre os fatores clínicos e patológicos e a sobrevida em pacientes com carcinomas da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo.

2.2. Objetivos específicos

- Comparar as pacientes com carcinoma da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo segundo a idade, o estágio, graus histológico e nuclear, invasão vascular e quimioterapia.
- Avaliar a distribuição dessas pacientes segundo os tipos histológicos e o local da primeira metástase.
- Avaliar a sobrevida global em pacientes com carcinoma da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo segundo a idade, o estágio, graus histológico e nuclear, invasão vascular e quimioterapia.

3. Publicação

Submission to Acta Histochemica

Dear Dr Derchain

Thank you for submitting your manuscript for possible publication in Acta histochemica. It may speed up the editorial processing if you can send me a short list of potential referees. To 'Susana Ramalho'

From: Raymond Coleman (colemantx@technion.ac.il)

Sent: Wednesday, February 01, 2012 7:21:54 AM

To: 'Susana Ramalho' (susana_ramalho@hotmail.com)

Dear Dr Derchain

Thank you for submitting your manuscript for possible publication in Acta histochemica. It may speed up the editorial processing if you can send me a short list of potential referees. We do not always have sufficient members of the editorial board with the necessary expertise in specific topics and it is useful to obtain additional external input.

Best wishes

Raymond Coleman

Editor-in-Chief, Acta histochemica

Raymond Coleman, Ph.D.

Associate Professor

Department of Anatomy & Cell Biology

Rappaport Faculty of Medicine

Technion-Israel Institute of Technology

P.O.Box 9649, Haifa 31096, Israel

Tel: +972-4-8295395 Fax: +972-4-8295403

colemantx@technion.ac.il

HER2 EXPRESSION IN BRAZILIAN PATIENTS WITH ESTROGEN AND PROGESTERONE RECEPTOR-NEGATIVE BREAST CARCINOMA

Autores

Susana Ramalho¹, M.D.

Katia Piton Serra¹, M.D.

Jose Vassallo², M.D., PhD.

Fernando Augusto Soares³, M.D., PhD.

Glauce Aparecida Pinto², PhD.

Luiz Carlos Teixeira¹, MD., PhD.

Isabela Werneck da Cunha³, M.D., PhD.

Sophie FM Derchain¹, M.D., PhD.

Gustavo de Souza¹, MD., PhD.

1. Department of Obstetrics and Gynecology, State University of Campinas – Unicamp, School of Medicine, Campinas, São Paulo, Brazil
2. Department of Anatomical Pathology, State University of Campinas – Unicamp, School of Medicine, Campinas, São Paulo, Brazil
3. Department of Pathology, Hospital do Cancer A.C. Camargo, Fundação Antônio Prudente, São Paulo, Brazil

Endereço para correspondência: derchain@fcm.unicamp.br

Sophie F. M. Derchain

Departamento de Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas, Caixa Postal 61, Universidade Estadual de Campinas – UNICAMP, CEP 13083-970, Campinas, SP, Brasil.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the relationship between clinical and pathological factors and survival in patients with double negative HER2-overexpressing carcinoma and triple negative carcinoma. **Subjects and Methods:** One hundred and sixty-one (161) patients diagnosed with breast cancer negative for estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PR) were included. Of the total, 58 patients had double negative HER2-overexpressing (ER/PR-negative and HER2-positive) and 103 had triple negative (ER-negative, PR-negative and HER2-negative). ER and PR expression was assessed through immunohistochemistry (IHC) and HER2 expression was measured by IHC and Fluorescent in situ Hybridization analysis in tissue microarray. **Results:** More than 80% had stages II and III disease and histologic grade III and nuclear grade 3. Patients with triple negative breast carcinoma had undifferentiated histologic types in 11% of cases and vascular invasion in 14.5%. Both groups had more than 50% visceral metastases. HER2 expression ($P=0.42$) and vascular invasion ($p=0.05$) did not interfere with survival. Survival of patients with Stages I-II disease was significantly longer than in those with Stage III disease both for double negative HER2-overexpressing carcinomas ($p<0.0001$) and triple negative carcinomas ($p=0.03$). **Conclusions:** Hormone receptor-negative breast carcinomas were undifferentiated and diagnosed at advanced stages. HER2 expression was not associated with overall survival.

Keywords: breast neoplasms, Receptor, erbB-2, survival analysis

Introduction

Breast cancer is the most common malignancy among women. Approximately 1.38 million new cases of breast cancer were predicted to occur worldwide in 2008, accounting for 23% of all types of cancer (Ferlay et al., 2010). In Brazil, the incidence of breast cancer for the year 2012 is expected to be 52.608 new cases, with an estimated risk of 52 cases per 100,000 women (INCA 2011). It is the leading cause of cancer death in women. Some estimates put the number of deaths at 269,000 in developed countries and 189,000 in developing countries (Ferlay et al., 2010).

Breast cancer is a heterogeneous disease. Its origin is closely related to alterations derived from signaling pathways of breast epithelial cells due to genetic and epigenetic changes in tumor suppressor genes, oncogenes and DNA repair genes (Pelekanou et al., 2011). Molecular biology studies (Perou et al., 2000; Sorlie et al., 2001;) have identified four subtypes of breast carcinomas: luminal A, luminal B, human epidermal growth factor receptor 2 (HER2)- overexpressing and basal-like. These subgroups were correlated with immunohistochemical phenotype. Luminal A is ER-positive and/or PR-positive/HER2-negative. Luminal B is ER-positive and/or PR-positive/HER2-positive. HER2-overexpressed molecular subtype is ER-negative/PR-negative/HER2-positive. Basal-like subtype does not express ER, PR or HER2.

ER and PR are members of the nuclear receptor superfamily that act as nuclear transcription factors modulated by ligands. Estrogen binding at the receptor domain signals growth factor receptor pathways, activating this receptor. Once activated, their dimers recruit coactivators and mediate gene transcription

by binding estrogen response elements to target genes (Hewitt et al., 2002). ER/PR-positive breast carcinomas have a better prognosis than tumors that do not express these markers, with a 5% to 10% increase in disease-free survival rate (DFS) in five years (Grann et al., 2005). These tumors respond to hormone manipulation aimed at preventing breast cancer cells from receiving estrogen endogenous stimulation.

Overexpression of HER2 is due to HER2 gene amplification and is present in approximately 20% of breast carcinomas. This condition is associated with a more aggressive tumor phenotype frequently exhibiting high levels of tumor proliferation markers. HER2 overexpression is also associated with a high risk of recurrence and death in the absence of adjuvant systemic therapy (Slamon et al., 1987; Dowset et al., 2000).

Determination of ER/PR positivity and human epidermal growth factor receptor 2 (HER2) oncogene amplification are currently used as prognostic and predictive factors for response to systemic treatment (Goldhirsch et al., 2009). Breast carcinomas that do not express ER and PR are more undifferentiated, exhibit a more aggressive behavior and a worse prognosis (Grann et al., 2005; Gruvberger et al., 2001; Hu et al., 2006). These tumors are termed triple negative (TN) when they fail to express HER2 and double negative with HER2-overexpression when this receptor is positive (Hu et al., 2006). No clear consensus exists about the prognostic effect of HER2 expression on these patients (Harris et al., 2007; Brown et al., 2008). Therefore, the aim of this study was to compare the relationship between clinical and pathological factors and survival in patients with double negative HER2-overexpressing carcinoma and triple negative breast carcinoma.

Materials and Methods

Patient selection

Patients selected for the study had been diagnosed with invasive non-metastatic breast carcinoma and treated from April 2004 to October 2008 in the Prof. Dr. José Aristodemo Pinotti Women's Hospital (Integrated Healthcare Center of the *Universidade Estadual de Campinas*), São Paulo, Brazil, with follow-up until October 2010. Paraffin-embedded blocks were identified and clinical-pathological and follow-up data were obtained after reviewing patient medical records. ER and PR expression was evaluated by immunohistochemistry (IHC) in tissue microarray (TMA). IHC analysis of HER2 expression was performed in all cases. Fluorescent in situ Hybridization (FISH) was used in patients with HER2 2+ IHC results (equivocal). One hundred and sixty-one (161) patients were included in the study. Fifteen cases with paraffin-embedded blocks considered inadequate for analysis were excluded from the study. The following variables were assessed: age at diagnosis, tumor stage at diagnosis (Sobin et al., 2009), nuclear grade, histologic grade and presence of vascular invasion. Histologic type was classified according to criteria of the World Health Organization (Tavassoli et al., 2003). The site of first metastasis was also evaluated. Adjuvant chemotherapy given after surgery and neoadjuvant chemotherapy given before surgery were analyzed according to drugs used. All patients who received neoadjuvant chemotherapy used anthracyclines (doxorubicin or epirubicin) combined or not with taxanes (paclitaxel or docetaxel). Adjuvant chemotherapy was performed with anthracycline (doxorubicin or epirubicin) or a combination of cyclophosphamide, methotrexate and 5-fluorouracil. The benefit of chemotherapy was the same whether it is

administered before or after surgery, as previously reported in a study by Rastogi et al (Rastogi et al., 2008). Therefore, patients receiving adjuvant and neoadjuvant chemotherapy were assigned together to the same group. For statistical analysis, the patients were divided into groups receiving or not receiving anthracycline, irrespective of whether the drug was used as an adjuvant or neoadjuvant agent. This study was approved by the Research Ethics Committee under number CEP 009/2010.

Specimens

Slides stained with Hematoxylin and eosin from the original paraffin blocks were analyzed for the selection of representative tumor regions. Tissue microarray (TMA, Beecher Instruments Microarray Technology, Silver Spring, CA, USA) was built and sections from TMA were placed on electrically charged slides for immunohistochemical and fluorescent in situ hybridization procedures.

Assay methods

Immunohistochemistry (IHC): Sections were deparaffinized with xylol and dehydrated in alcohol series. Washes in hydrogen peroxide were performed, followed by distilled water washes. For antigen retrieval, we used a commercially available pressure cooker (T-fal®), in which slides were immersed in citrate buffer pH 6.0 for 30 minutes. The slides were dried at room temperature and washed in distilled water. After that, the sections were incubated in a moist chamber, with the specific primary antibodies at 4°C, overnight (HER2: clone c-erbB2 Oncoprotein, Dako; ER: clone 1D5, Dako; PR: clone PgR 636, Dako). The slides

were then washed in PBS, pH 7.4. As detection system, the slides were incubated in ADVANCE™ HRP Detection System (Dako) at 37°C for 1 hour, and washed in PBS. After, DAB chromogenic substrate (3'-diaminobenzidine, SIGMA, St Louis, MA, USA) was applied at a proportion 0.06g to 100ml of PBS, 500µl hydrogen 3% peroxide and 1ml dimethylsulfoxide (DMSO) at 37°C for 5 minutes. Finally, the slide was washed in tap water and counterstained with Harris' hematoxylin for 30 to 60 seconds. After being dehydrated, the slide was mounted in resin (Entellan®, Merck, Darmstadt, Germany). Internal/external, positive/negative controls were used for validation of the reactions.

Fluorescent in situ hybridization (FISH): After deparaffinization, the slides were incubated at 56°C and dehydrated in alcohol series. The slides were washed in alcohol and incubated in 2xSSC at 75°C for 20 minutes. Proteinase K (0.25mg/mL) was used for digestion at 45°C for 20 minutes. The slides were washed in tap water and dehydrated in alcohol series. The HER2/neu (VYSIS 36-161060) probe and slides were denatured at 75°C and at 80°C, respectively, for 5 minutes. Dehydration was performed. The probe was applied to the slides, which were sealed with rubber cement and placed in an oven at 37°C overnight. Post-hybridization washes were performed in 1.5M Urea/1xSSC for 30 minutes and 2xSSC for 5 minutes. After dehydration, the slides were counterstained with DAPI and visualized under fluorescence microscopy.

Image analysis

IHC staining was assessed by a single observer who was blinded to clinical characteristics and tumor histology. For ER/PR analysis, nuclear staining

was considered, using the criteria of staining intensity and percentage of stained cells (Hammond et al., 2010). Only patients who scored 0-2 were included in this study.

For IHC analysis of HER2, membrane staining was considered (Wolff et al., 2007) and reactivity scores were classified as 0= negative without staining of invasive tumor cells; 1= weak and incomplete staining of the membrane in any proportion of invasive tumor cells/or weak and complete staining in less than 10% of these cells; 2= complete membrane staining that is not uniform/or weak staining, but with obvious circumferential distribution, in at least 10% of cells/or intense and complete membrane staining in 30% or less of invasive tumor cells and 3=uniform and intense membrane staining in more than 30% of invasive tumor cells (Middleton et al., 2009). HER2 IHC scoring was reported as negative (0/1+), equivocal (2+) and positive (3+). FISH was performed in HER2 2+ IHC results. In FISH analysis, the signals observed were evaluated as <2, 2 or >2, and gain or loss status was inferred from these results. Results were considered positive if >2. For statistical purposes, a dichotomous final HER2 status was defined by combining IHC and FISH results: *Positive HER2: 1) IHC 2+ / FISH positive; or 2) IHC 3+. Negative HER2: 1) IHC 0 or 1+ or 2) IHC 2+ / FISH negative.*

Statistical analysis

Initially, a descriptive analysis of all collected variables was carried out. The crude odds ratio (OR) and adjusted odds ratios with their respective confidence intervals (95% CI) were calculated for the clinical-pathological characteristics, comparing double negative HER2-overexpressing breast carcinoma with triple negative breast carcinoma. For overall survival (OS), time of survival was estimated

in months, from the date of diagnosis to the last follow-up visit or death. The median follow-up period was 36 months (percentiles 25/75: 25/78 months). In the final analysis, there were 23 (39.6%) deaths in the double negative HER2-overexpressing group and 28 (27.1%) deaths in the triple negative group. The adjusted Hazard Ratios (HR) with their respective 95% CI in relation to OS were calculated for clinical-pathological variables. The curves were estimated by the Kaplan-Meier method and compared by using the Log-Rank test. A p-value lower than 0.05 was considered significant. All analyses were performed using SPSS software (Statistical Package Social Science).

Results

Table 1 presents the description of the clinical-pathological characteristics of patients with double negative HER2-overexpressing breast carcinoma and triple negative breast carcinoma. The age of the patients was similar in both groups. There was a predominance of Stages II and III in patients with double negative HER2-overexpressing breast carcinoma and in those with triple negative breast carcinoma (80% vs 92%). Histologic grade III and nuclear grade 3 tumors predominated in both groups. Patients with double negative HER2-overexpressing breast carcinoma had vascular invasion in 27.5% of cases compared to 14.5% in patients with triple negative carcinoma, although this was not a significant difference.

In patients with triple negative breast carcinoma, it was observed that more undifferentiated histologic types occurred in 11% of cases. Concerning metastasis site, the incidence of visceral metastasis was higher than 50% in both groups (Table 2).

Table 3 showed that HER2 expression did not interfere with survival. After multivariate analysis, only Stage III and the use of anthracycline significantly increased the risk of death due to the disease ($p<0.001$ and $p=0.007$ respectively). The presence of vascular invasion was not related to survival ($p=0.05$). Figure 1 illustrates overall survival of patients with double negative HER2-overexpressing breast tumor and triple negative (TN) breast tumor, according to Stage (I + II vs III). The survival of patients with Stages I-II disease was significantly longer than of those with Stage III disease both in double negative HER2-overexpressing breast tumors ($p<0.0001$) and in triple negative breast tumors ($p=0.03$). There was no difference in survival of patients with double negative HER2-overexpressing tumor and triple negative tumor in Stages I + II ($p=0.13$) and Stages III ($p=0.34$).

Discussion

In our case study of 161 patients with ER-negative/PR-negative breast carcinomas there was a predominance of advanced stages. Virtually 50% of the patients seen in this service presented with Stage III disease. Regardless of HER2 expression, undifferentiated tumors (histologic grade III and nuclear grade 3) were predominant. It was observed that triple negative carcinomas had a higher proportion of special histologic types. Vascular invasion was slightly more common in double negative HER2-overexpressing breast carcinoma and was not associated with survival. HER2 expression was not associated with overall survival. Only Stage III tumor and the use of anthracycline were related to a higher probability of death due to the disease.

In this case study of Brazilian women with ER/PR negative tumors, we observed a small percentage of women with Stage I disease at the time of diagnosis. Dunnwald et al (Dunnwald et al., 2007) observed that hormone receptor expression was not associated with diagnosis of far-advanced disease in American women. The large proportion of women with locally advanced disease in our case study was probably due to failure of Brazilian screening programs (INCA 2011).

In our study, almost all cases consisted of undifferentiated tumors, regardless of HER2 expression. In a case study of more than 31,000 patients with ER- and PR-negative breast tumors, Grann et al (Grann et al., 2005) observed that only 5% of tumors were well-differentiated. Breast carcinomas that do not express ER and PR have distinct gene expression profile and are not regulated by estrogen. As a result, these tumors lose an important regulatory element of growth and differentiation of mammary gland cells. This may be the reason why these tumors are all undifferentiated (Gruvberger et al., 2001).

In our study, we found a lower percentage of vascular invasion (from 14.5 to 27.5%) in both groups, compared to other series reporting 31-35% of vascular invasion (Ejlertsen et al., 2009; Rakha et al., 2011) reaching 55%, when evaluating only women with axillary node-positive breast cancer (Ragage et al., 2010). In our cases, vascular invasion was assessed by hematoxylin-eosin only. It is known that immunohistochemistry increases sensitivity for the detection of vascular invasion (de Mascarel et al., 2009). Vascular invasion was most frequent in women whose tumors overexpressed HER2. This association was described by other authors and may explain the increasing aggressiveness of these tumors that tend to have more lymph node metastases (Burststein, 2005; Rakha et al., 2011).

Triple negative tumors had a higher proportion of special histologic types as previously reported by other authors (Putti et al., 2005; Weigelt et al., 2008). We found 5% of atypical medullary carcinoma which is consistent with a case series by Putti et al who identified 8% of atypical medullary carcinoma among ER-negative breast carcinoma. Atypical medullary carcinoma is a common tumor in BRCA-1-related breast carcinoma that frequently displays a basal-like profile (Rodrigues-Pinilla et al., 2007). In our case study, there were 4% of metaplastic carcinomas correlating with 1.9% found in a series of 1797 triple negative carcinomas studied by Iwase et al (Iwase et al., 2010). Metaplastic carcinomas have a more aggressive histologic type that is more common among triple negative tumors (Korsching et al., 2008; Reis-Filho et al., 2006; Iwase et al., 2010). A series by Bae et al (Bae et al., 2011) reported that among metaplastic carcinomas, 95% of tumors were ER-negative, 100% were HER2-negative and Stage III tumors had a worse prognosis compared to other triple negative carcinomas.

In the present study, triple negative carcinomas and double negative carcinomas that overexpressed HER2 had a high incidence of visceral metastasis, particularly lung metastasis. These results were consistent with those of other studies that identified roughly 50% of visceral metastasis and also a strong association with lung metastasis, particularly in triple negative tumors (Kennecke et al., 2010; Minn et al., 2007). In the triple negative carcinomas of our study, the first site of tumor relapse was the brain, occurring in about 20% of cases. These results are consistent with those of other studies, describing an incidence of 6 to 11% of brain metastasis (Kennecke et al., 2010; Dawood et al., 2009). The majority of breast carcinomas that develop brain metastasis are triple negative

tumors or tumors that overexpress HER2 (Kennecke et al., 2010; Gaedcke et al., 2007). The incidence of brain metastasis in double negative HER2-overexpressing breast carcinoma was 12.6% and consistent with a study by Kenneck et al. (2010) who found 14.3% of brain metastasis at the time of diagnosis. Although our patients did not receive trastuzumab as adjuvant treatment, other studies have shown that the use of targeted systemic therapy did not modify the incidence of brain metastasis (Leyland-Jones, 2009).

In these ER-negative/PR-negative women treated with and without anthracycline in Stages I and II, the survival was 75% over a five-year follow-up period, regardless of HER2 expression. Other authors assessing ER-negative/PR-negative patients diagnosed with early-stage disease have also reported a survival rate between 75-80% (Grann et al., 2004; Brown et al., 2008; Chia et al., 2008) in a series of patients who did not receive trastuzumab. The use of trastuzumab in current protocols decreased the risk of recurrence and death (Perez et al., 2011). In Stages III, mortality in patients with double negative HER2-overexpressing breast carcinoma was 70%, in agreement with Slamon et al who reported a mortality rate of about 60% in 5 years for HER2-positive patients with axillary node-positive breast carcinoma. We thus concluded that HER2-positive patients with Stage III disease would benefit from molecular target therapy (trastuzumab). In a study by Perez et al (Perez et al., 2011), trastuzumab promoted a 7.4% increase in overall survival with a 27% gain in disease-free survival in patients with more than 10 axillary nodes affected.

Anthracycline did not contribute to improved survival neither in patients with triple negative carcinomas nor in those whose double negative HER2-

overexpressing carcinomas. More recent studies have corroborated our findings (Falo et al., 2007; Colleoni et al., 2010) and reported improved clinical response and better survival rates in patients with triple negative tumors using a protocol without anthracycline. A combination of antimetabolite and alkylating agents such as cyclophosphamide, 5-fluorouracil and methotrexate (CMF) would be more effective in carcinomas that do not express ER (Lehmann-Che et al., 2010). A retrospective analysis of a randomized study (Cheang et al., 2009) also suggested that protocols with anthracycline may be inferior to CMF-based chemotherapy in patients with basal-like phenotype. Recently, Slamon et al (Slamon et al., 2011) proposed two adjuvant chemotherapy protocols using trastuzumab with or without anthracycline in patients whose tumors overexpressed HER2. The authors concluded that there was no difference in overall survival and disease-free survival between the group receiving anthracycline and the group that did not receive anthracycline, when trastuzumab was used. Thus, our data indicated that patients receiving only anthracycline did not decreased the risk of death due to the disease.

This study has limitations because it was a retrospective evaluation performed in a single institution that did not assess basal biomarkers. Nevertheless, to the best of our knowledge, this is the largest case study in Brazilian patients with ER/PR-negative breast carcinoma, in which all cases were reviewed by the same pathologist, HER2 status was confirmed by FISH analysis and survival rate was assessed.

In conclusion, there was a predominance of advanced tumor stages in this case study of 161 patients with ER/PR-negative breast carcinoma. Virtually 50% of the patients seen in this service presented with Stage III disease.

Undifferentiated tumors predominated (histologic grade III and nuclear grade 3), regardless of HER2 expression. It was observed that triple negative carcinomas had a higher proportion of special histologic types. Vascular invasion was slightly more common in double negative HER2-overexpressing breast carcinoma and was not associated with survival. HER2 expression was not associated with overall survival. Only Stage III tumor and the use of anthracycline were related to a higher probability of death from the disease.

Acknowledgements

Study partially financed by the Research Support Foundation of the State of São Paulo - Fapesp: number 2009/17097-1.

References

1. Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Coordenação nacional de prevenção e vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil (online only), Rio de Janeiro:INCA, 2011 (Last access November 30, 2011).A available online in :<http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/versaofinal.pdf>.
2. Bae SY, Lee SK, Koo MY, Hur SM, Choi M, Cho DH et al. The prognoses of metaplastic breast cancer patients compared to those of triple-negative breast cancer patients. *Breast Cancer Res Treat.* 2011;126:471-478.
3. Brown M, Tsodikov A, Bauer KR, Parise CA, Caggiano V. The role of human epidermal growth factor receptor 2 in the survival of women with estrogen and progesterone receptor-negative invasive breast cancer. *Cancer* 2008;15: 737-47.

4. Burstein HJ. The distinctive nature of HER2-positive breast cancers. *N Engl J Med* 2005; 353:1652-1654.
5. Cheang M, Chia SK, Tu S, Jiang S, Shepherd LE, Pritchard KI et al. Anthracyclines in basal breast cancer: the NCICCTG trial MA5 comparing adjuvant CMF to CEF. *J Clin Oncol* 2009; 27: 15s.
6. Chia S, Norris B, Speers C, Cheang M, Gilks B, Gown AM et al. Human epidermal growth factor receptor 2 overexpression as a prognostic factor in a large tissue microarray series of node-negative breast cancers. *J Clin Oncol* 2008;26:5697-5704.
7. Coleoni M, Cole BF, Viale G, Regan MM, Price KN, Maiorano E. Classical cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil chemotherapy is more effective in triple-negative, node-negative breast cancer: results from two randomized trials of adjuvant chemoendocrine therapy for node-negative breast cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:2966-2973.
8. Dawood S, Broglio K, Esteva FJ, Yang W, Kau SW, Islam R ET al. Survival among women with triple receptor-negative breast cancer and brain metastases. *Ann Oncol.* 2009;20:621-627.
9. de Mascarel I, MacGrogan G, Debled M, Sierankowski G, Brouste V, Mathoulin-Pélissier S et al. D2–40 in breast cancer: should we detect more vascular emboli? *Mod Pathol.* 2009;22:216-222.
10. Dowsett M, Cooke T, Ellis I, Gullick WJ, Gusterson B, Mallon E et al. Assessment of HER2 status in breast cancer: why, when and how? *Eur J Cancer* 2000;36:170-176.

11. Dunnwald LK, Rossing MA, Li C. Hormone receptor status, tumor characteristics, and prognosis: a prospective cohort of breast cancer patients. *Breast Cancer Res.* 2007, 9:R6.
12. Ejlertsen B, Jensen MB, Rank F, Rasmussen BB, Christiansen P, Kroman N et al. Population-based study of peritumoral lymphovascular invasion and outcome among patients with operable breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009; 101:729-735.
13. Falo C, Moreno A, Varela M, Lloveras B, Figueras A, Escobedo A. Her-2/neu status and response to CMF: retrospective study in a series of operable breast cancer treated with primary CMF chemotherapy. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2007; 133: 423-429.
14. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. GLOBOCAN 2008 v1.2, Cancer Incidence and Mortality Worldwide: IARC CancerBase No. 10 [Internet]. Lyon, France: International Agency for Research on Cancer; 2010. Available from: <http://globocan.iarc.fr>, accessed on 30 November 2011.
15. Gaedcke J, Traub F, Milde S, Wilkens L, Stan A, Ostertag H et al. Predominance of the basal type and HER-2/neu type in brain metastases from breast cancer. *Mod Pathol.* 2007;20:864-870.
16. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. *Ann Oncol.* 2009; 20:1319-1329.

17. Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer* 2005;103(11):2241-2251.
18. Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res.* 2001;61(16):5979-5984.
19. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer (unabridged version). *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134:e48-72.
20. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S et al. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5287-5312.
21. Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. *Rev Endocr Metab Disord* 2002;3:193-200.
22. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved across microarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7:96.
23. Iwase H, Kurebayashi J, Tsuda H, Ohta T, Kurosumi M, Miyamoto K et al. Clinicopathological analyses of triple negative breast cancer using surveillance data from the Registration Committee of the Japanese Breast Cancer Society. *Breast Cancer* 2010;17:118-124.

24. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, Cheang M, Voduc D, Speers C et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;28:3271-3277.
25. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol*. 2008;61:553-560.
26. Lehmann-Che J, André F, Desmedt C, Mazouni C, Giacchetti S, Turpin E et al. Cyclophosphamide dose intensification may circumvent anthracycline resistance of p53 mutant breast cancers. *Oncologist*. 2010;15:246-252.
27. Leyland-Jones B. Human epidermal growth factor receptor 2–positive breast cancer and central nervous system metastases. *J Clin Oncol*, 2009;27:5278-86.
28. Middleton LP, Price KM, Puiq P, Hevdon LJ, Tarco E, Sneige N et al. Implementation of American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists HER2 Guideline Recommendations in a tertiary care facility increases HER2 immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization concordance and decreases the number of inconclusive cases. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:775-780.
29. Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D et al. Lung metastasis genes couple breast tumor size and metastatic spread. *Proc Natl Acad Sci USA* 2007;104:6740-5.
30. Pelekanou V, Leclercq G. Recent insights into the effect of natural and environmental estrogens on mammary development and carcinogenesis. *Int J Devel Biol* 2011; 55: 869-78.

31. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Davidson NE, Geyer CE et al. Four-year of Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable human epidermal growth factor receptor2-positive breast cancer: Joint analysis of data from NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol*. 2011;29:3366-3373.
32. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000;406:747-752.
33. Putti T, El-Rehim DM, Rakha EA, Paish CE, Lee AHS, Pinder SE et al. Estrogen receptor-negative breast carcinomas: a review of morphology and immunophenotypical analysis. *Mod Pathol* 2005;18:26-35.
34. RagageF, Debled M, MacGrogan G, Brouste V, Desrousseaux M, Soubeyran I et al. Is it useful to detect lymphovascular invasion in lymph node-positive patients with primary operable breast cancer? *Cancer* 2010;116:3093-3101.
35. Rakha E, Martin S, Lee A, Morgan D, Pharoah P, Hodi A, et al. The Prognostic Significance of Lymphovascular invasion in invasive breast carcinoma. *Cancer*. 2011 Dec 16. doi: 10.1002/cncr.26711. [Epub ahead of print].
36. Rastogi P, Anderson SJ, Bear HD, Geyer CE, Kahlenberg MS, Robidoux A et al. Preoperative chemotherapy: updates of National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project Protocols B-18 and B-27. *J Clin Oncol*. 2008;26:778-785.
37. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 2006; 49;10–21.
38. Rodríguez-Pinilla SM, Rodríguez-Gil Y, Moreno-Bueno G, Sarrió D, Martín-Guijarro Mdel C, Hernandez L et al. Sporadic invasive breast carcinomas with

- medullary features display a basal-like phenotype: an immunohistochemical and gene amplification study. *Am J Surg Pathol*. 2007;31:501-508.
39. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL.. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
40. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med*. 2011;365(14):1273-1283.
41. Sobin LH, Gospodarowics MK, Wittekind C. TNM: classification of malignant tumours, 7th edition. New Jersey: Wiley, 2009.
42. Sørlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001;98:10869-74.
43. Tavassoli FA, Devilee P. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Breast and Female Genital Organs, 3rd ed. Lyon: IARC Press, 2003.
44. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008; 216: 141-50.

TABLE 1. Distribution of women with triple negative and double negative HER2-overexpressing breast carcinoma, according to clinical-pathological characteristics

Clinical-pathological characteristics	DN HER-2 overexpressing		TN		Crude OR	95% CI	Adjusted OR	95% CI
	N	(%)	N	(%)				
Age in complete years								
52 years or less	28	(48.0)	51	(49.5)	Reference		Reference	
Over 52 years	30	(52.0)	52	(50.5)	0.95	(0.50-1.46)	1.0	(0.52-1.91)
Stage								
I	11	(20)	8	(8)	Reference		Reference	
II	19	(32)	50	(48.5)	2.1	(1.22-3.61)	0.99	(0.5-1.95)
III	28	(48)	45	(43.5)	1.51	(0.93-2.44)	0.99	(0.5-1.95)
Histologic Grade								
II	1	(1.7)	8	(7.8)	Reference		Reference	
III	54	(93.1)	89	(86.4)	0.20	(0.02-1.69)	1.02	(0.25-4.13)
Not assessable	3	(5.2)	6	(5.8)				
Nuclear grade								
2	1	(1.7)	7	(6.8)	Reference		Reference	
3	55	(94.9)	89	(86.4)	0.23	(0.02-1.93)	0.97	(0.22-4.28)
Not assessable	2	(3.4)	7	(6.8)				
Vascular invasion								
Absent	42	(72.5)	88	(85.5)	Reference		Reference	
Present	16	(27.5)	15	(14.5)	2.23	(1.01-4.94)	1.0	(0.44-2.27)
Chemotherapy#								
Without anthracycline	23	(39.6)	46	(44.7)	Reference		Reference	
With anthracycline	35	(60.4)	57	(55.3)	1.22	(0.63-2.36)	0.99	(0.52-1.90)
Total	58	(100)	103	(100)				

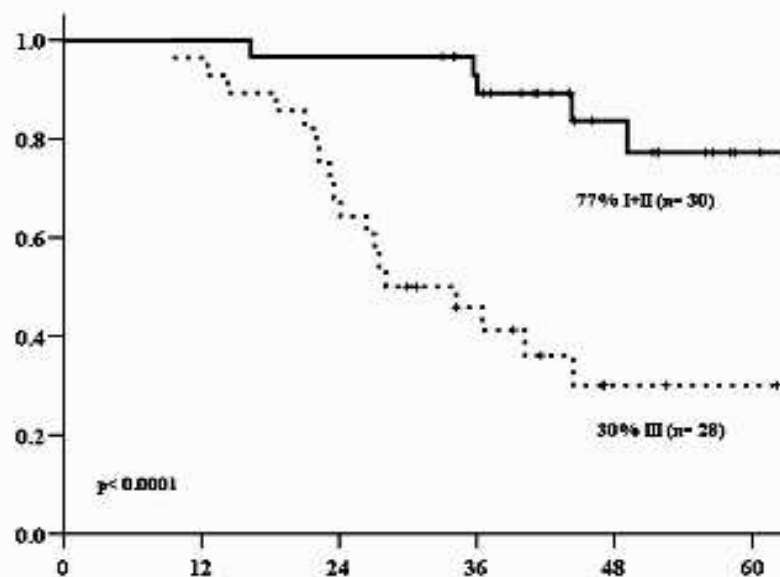
DN=Double negative HER2-overexpressing, TN=Triple negative. #11 cases also used taxane. OR=odds ratio, 95% CI=95% confidence interval; NC = not calculable.

TABLE 2. Distribution of women with triple negative carcinoma and double negative HER2-overexpressing carcinoma according to histologic types and first site of metastasis

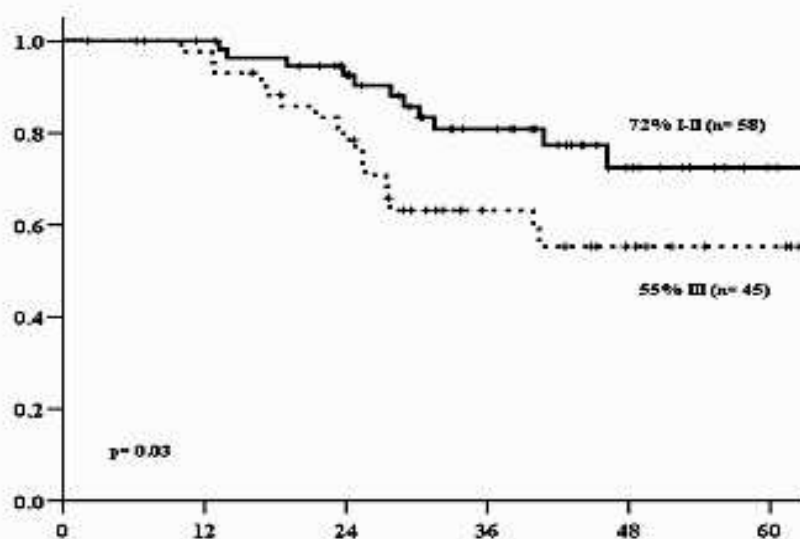
Variables	Breast carcinoma	
	DN HER2-overexpressing N (%)	Triple negative N (%)
Histologic type		
Invasive Ductal Carcinoma	58 (100)	91 (88.5)
Medullary (Atypical) Carcinoma	–	5 (4.8)
Metaplastic Carcinoma	–	4 (3.9)
Invasive Pleomorphic Lobular Carcinoma	–	2 (1.9)
Undifferentiated Carcinoma	–	1 (0.9)
First metastasis		
No	36	69
Yes	22	34
Lung/Pleural	7 (31.8)	20 (58.8)
Liver	5 (22.7)	1 (2.9)
Brain	3 (13.6)	7 (20.6)
Bone	5 (22.7)	6 (17.7)
Distant Nodal	2 (9.2)	--
Total	58 (100)	103 (100)

Table 3. Evaluation of overall survival according to clinical-pathological characteristics of triple negative and double negative HER2-overexpressing breast carcinoma after multiple regression analysis.

	<i>Hazard Ratios</i>	<i>95% CI</i>	<i>Adjusted p-value</i>
Histologic type			
Triple negative	Reference		
HER2-positive	1.25	(0.72 to 2.17)	0.42
Stage			
I – II	Reference		
III	3.47	(1.91 to 6.30)	<0.0001
Vascular invasion			
Present	Reference		
Absent	1.88	(0.99 to 3.56)	0.05
Chemotherapy#			
Without anthracycline	Reference		
With anthracycline	2.35	(1.27 to 4.37)	0.007



(A) Double negative HER2-overexpressing breast carcinoma



(B) Triple negative breast carcinoma

Figure 1: Overall survival of patients with double negative breast carcinoma that overexpressed HER2 and triple negative carcinoma according to Stage (I + II vs III). (A) Double negative HER2-overexpressing breast carcinoma ($p < 0.0001$) (B) triple negative carcinoma ($p = 0.03$). Observation: there was no difference in survival of women with double negative carcinoma that overexpressed HER2 and triple negative carcinoma in Stages I + II ($p = 0.13$) and Stages III ($p = 0.34$).

4. Conclusões

- Comparando as pacientes com carcinoma da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado e triplo negativo não houve diferença na distribuição por idade. Independente da expressão do HER-2 houve um predomínio de estádios avançados e de tumores indiferenciados. As pacientes com carcinomas da mama duplo negativo HER-2 hiperexpressado apresentaram um percentual maior de invasão vascular, porém sem significância estatística.
- As pacientes com carcinomas da mama triplo negativo apresentaram tipos histológicos mais indiferenciados. Em ambos os grupos houve um predomínio de metástases viscerais.
- A expressão do HER-2 não se associou com a sobrevida global. O estágio III e a utilização de antraciclina relacionaram-se com maior probabilidade de óbito pela doença.

5. Referências Bibliográficas

1. IARC - International Agency for Research on Cancer. World Health Organization. Globocan 2008. Cancer incidence and mortality worldwide in 2008. <http://globocan.iarc.fr>, Acessado em 30 de novembro de 2011.
2. INCA - Instituto Nacional do Câncer. Ministério da Saúde. Coordenação nacional de prevenção e vigilância. Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/versaofinal.pdf>. Acessado em 30 de novembro.
3. Dickson RB, Pestell RG, Lippman ME. Cancer of the Breast. In: De Vita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA. Cancer Principles & Practice of Oncology 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
4. Kakarala M, Wicha MS. Implications of the cancer stem cell hypothesis for breast cancer prevention and therapy. J Clin Oncol 2008;26(17):2813-20.
5. Goldhirsch A, Ingle JN, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ et al. Thresholds for therapies: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the primary therapy of early breast cancer 2009. Ann Oncol 2009; 20:1319-1329.
6. Hewitt SC, Korach KS. Estrogen receptors: structure, mechanisms and function. Rev Endocr Metab Disord 2002;3:193-200.

7. Grann VR, Troxel AB, Zojwalla NJ, Jacobson JS, Hershman D, Neugut AI. Hormone receptor status and survival in a population-based cohort of patients with breast carcinoma. *Cancer* 2005;103(11):2241-2251.
8. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG), Davies C, Godwin J, Gray R, Clarke M, Cutter D, Darby S, et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;378(9793):771-784.
9. Slamon DJ, Clark GM, Wong SG, Levin WJ, Ullrich A, McGuire WL. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER2-2/neu oncogene. *Science* 1987;235:177-182.
10. Arteaga CL, Sliwkowski MX, Osborne CK, Perez EA, Puglisi F, Gianni L.. Treatment of HER2-positive breast cancer: current status and future perspectives. *Nat Rev Clin Oncol* 2011;9(1):16-32.
11. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Alred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologist guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol* 2007;25:118-125.
12. Perou CM, Sørli T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA et al. Molecular portraits of human breast tumors. *Nature* 2000;406:747-752.
13. Sørli T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(19):10869-10874.
14. Weigel MT, Dowsett M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. *Endocr-Relat Cancer* 2010; 17(4): R245–R262.

15. Edge SB, Byrd DR, Compton CC, Fritz AG, Greene F, Trotti A. AJCC Cancer Staging Manual, 7th edition. New York: Springer, 2010.
16. Perez EA, Moreno-Aspitia A, Aubrey AE, Andorfer CA. Adjuvant Therapy of triple negative breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2010;120(2):285-291.
17. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K et al. Race, Breast Cancer Subtypes, and Survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006; 295(21):2492-2502.
18. Anders CK, Deal AM, Miller CR, Khorram C, Meng H, Burrows E, et al. The prognostic contribution of clinical breast cancer subtype, age, and race among patients with breast cancer brain metastases. *Cancer* 2011;117(8): 1602-1611.
19. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol* 2008; 61(5):553-560.
20. Hugh J, Hanson J, Cheang MC, Nielsen TO, Perou CM, Dumontet C et al. Breast Cancer subtypes and response to docetaxel in node-positive breast cancer: use an immunohistochemical definition in the BCIRG 001 trial. *J Clin Oncol* 2009;27(8):1168-1176.
21. Chu E. Pharmacology of Cancer Chemotherapy. In: De Vita VTJ, Hellman S, Rosenberg SA. *Cancer. Principles & Practice of Oncology* 7th edition. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005:384-390.
22. Perez EA, Romond EH, Suman VJ, Jeong JH, Davidson NE, Geyer CE, Martino S, Mamounas EP et al. Four-year of Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable Human Epidermal Growth Factor Receptor2 – Positive Breast Cancer: Joint Analysis of Data From NCCTG N9831 and NSABP B-31. *J Clin Oncol* 2011;29(25):3366-3373.

23. Cheang M, Chia SK, Tu D, Jiang S, Shepherd LE, Pritchard KI et al. Anthracyclines in basal breast cancer: the NCIC-CTG trial MA5 comparing adjuvant CMF to CEF. *J Clin Oncol* 2009; 27:15s.
24. Colleoni M, Cole BF, Viale G, Regan MM, Price KN, Maiorano E et al. Classical Cyclophosphamide, Methotrexate, and Fluorouracil Chemotherapy is More Effective in triple-Negative, Node-negative Breast Cancer: Results from two randomized Trials of Adjuvant Chemoendocrine Therapy for Node-negative Breast Cancer. *J Clin Oncol* 2010; 28:2966-2973.
25. James CR, Quinn JE, Mullan PB, Johnston PG, Harkin DP. BRCA1, a potencial predictive biomarker in the treatment of breast cancer. *Oncologist* 2007;12:142-150.
26. Burstein HJ. The Distinctive Nature of HER2-Positive Breast Cancers. *N Engl J Med* 2005;353(16):1652-1654.
27. Pestalozzi BC, Zahrieh D, Price KN, Holmberg SB, Lindtner J, Collins J et al. Identifying breast cancer patients at risk for Central Nervous System (CNS) metastases in trials of the International Breast Cancer Study Group (IBCSG). *Ann Oncol* 2006;17:935–944.
28. Gennari A, Sormani MP, Pronzato P, Puntoni M, Colozza M, Pfeffer U et al. HER2 status and efficacy of adjuvant anthracyclines in early breast cancer: a pooled analysis of randomized trials. *J Natl Cancer Inst.* 2008;100(1):14-20.
29. Desmedet C, Di Leo A, Azambuja E, Larsimont D, Haibe-Kains B, Selleslags J et al. Multifactorial Approach to Predicting Resistance to Anthracyclines. *J Clin Oncol* 2011;29(12):1578-1585.
30. Slamon D, Eiermann W, Robert N, Pienkowski T, Martin M, Press M et al. Adjuvant trastuzumab in HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med.* 2011;365(14):1273-1283.

31. National Comprehensive Cancer Network (NCCN) guidelines(on-line). (acesso 30 de novembro de 2011). Disponível em: www.nccn.org.
32. Gruvberger S, Ringnér M, Chen Y, Panavally S, Saal LH, Borg A et al. Estrogen receptor status in breast cancer is associated with remarkably distinct gene expression patterns. *Cancer Res.* 2001;61(16):5979-5984.
33. Hu Z, Fan C, Oh DS, Marron JS, He X, Qaqish BF et al. The molecular portraits of breast tumors are conserved acrossmicroarray platforms. *BMC Genomics* 2006; 7:96.
34. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S et al. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2007;25(33):5287-5312.
35. Brown M, Tsodikov A, Bauer KR, Parise CA, Caggiano V. The Role of Human Epidermal Growth Factor Receptor 2 inthe Survival of Women with Estrogen and Progesterone Receptor-negative Invasive Breast Cancer. *Cancer* 2008;15(112):737-747.

6. Anexos

6.1. Anexo 1 – Parecer do CEP



FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

CEP, 19/01/10
(Grupo III)

PARECER CEP: Nº 009/2010 (Este nº deve ser citado nas correspondências referente a este projeto)
CAAE: 0003.0.146.000-09

I - IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “IDENTIFICAÇÃO DOS CARCINOMAS BASAIS ATRAVÉS DO PERFIL IMUNO-HISTOQUÍMICO DE CINCO MARCADORES A PARTIR DE CARCINOMAS TRIPLO NEGATIVOS DA MAMA E SUA CORRELAÇÃO COM PROGNÓSTICO”.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Susana Oliveira Botelho Ramalho

INSTITUIÇÃO: CAISM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 07/01/2010

APRESENTAR RELATÓRIO EM: 19/01/11 (O formulário encontra-se no *site* acima)

II - OBJETIVOS

GERAL:

Correlacionar a expressão de citoqueratina 5/6 e do receptor do fator de crescimento epidérmico em carcinomas de mama triplo negativos com a sobrevida livre de recidiva sistêmica.

ESPECÍFICOS -

- Identificar a expressão da citoqueratina 5/6 e de receptor do fator de crescimento epidérmico em carcinomas de mama triplo negativo.
- Verificar se há associação da expressão da citoqueratina 5/6 e/ou do receptor do fator de crescimento epidérmico em carcinomas de mama triplo negativos com os seguintes fatores: menor idade ao diagnóstico, estágio mais avançado ao diagnóstico, grau nuclear 3, grau histológico III, presença de invasão vascular, com a realização de quimioterapia adjuvante e com a realização de quimioterapia adjuvante baseada em antraciclina.
- Verificar se há associação da expressão da citoqueratina 5/6 e/ou do receptor do fator de crescimento epidérmico em carcinomas de mama triplo negativos com a sobrevida livre de recidiva sistêmica.

III - SUMÁRIO

Introdução: Os cânceres da mama são tumores bastante heterogêneos. O subtipo triplo negativo é um subgrupo de pior prognóstico que não possui um perfil imuno-histoquímico que identifique entre os triplo negativos os que tem maior risco de recidiva sistêmica. **Objetivo:** Correlacionar a expressão de citoqueratina (CK) 5/6 e do receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) em carcinomas da mama triplo negativos com a sobrevida livre de recidiva sistêmica. **Sujeitos e Métodos:** Serão selecionadas pacientes com carcinoma da mama ductal invasivo no ambulatório de mama do CAISM e na clínica Oncocamp, estágio I a III, entre janeiro de 2004 e janeiro de 2008. Estima-se que serão incluídos cerca de 225 casos. Será avaliada a expressão de CK5/6 e EGFR e identificados 2 grupos: Um grupo com CK5/6 e EGFR positivos ou pelo menos um dos dois marcadores positivos, e o outro grupo com CK5/6 e EGFR



negativos. Estes grupos serão avaliados de acordo com idade ao diagnóstico, estágio ao diagnóstico, grau nuclear, grau histológico, invasão vascular, quimioterapia adjuvante, uso de antraciclina na quimioterapia adjuvante e sobrevida livre de recidiva sistêmica. Análise dos dados: Os dados serão digitados numa planilha do software SPSS versão 15.0. O cálculo da incidência acumulativa de recidiva sistêmica e da sobrevida livre de doença será através do método Kaplan-Meier, e para avaliação dos grupos o teste Log-Rank, cujo P-value ≤ 0.05 .

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

Trata-se de projeto de Mestrado que pretende avaliar uma coorte histórica de pacientes tratadas por câncer de mama e correlacionar alguns parâmetros imunohistoquímicos com o prognóstico. O projeto apresenta-se bem redigido, com metodologia adequada. Os critérios de inclusão e exclusão dos sujeitos estão bem definidos; cálculo do tamanho amostral e análise estatística bem embasados por cálculos estatísticos. Os aspectos éticos estão bem discutidos no corpo do projeto e solicita a dispensa da aplicação do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido a qual considera-se pertinente. Considero o projeto adequado a esse tipo de estudo.

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e complementares, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa, o pedido de dispensa do Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, bem como todos os anexos incluídos na pesquisa supracitada.

O conteúdo e as conclusões aqui apresentados são de responsabilidade exclusiva do CEP/FCM/UNICAMP e não representam a opinião da Universidade Estadual de Campinas nem a comprometem.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que o aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade do regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.



**FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

🌐 www.fcm.unicamp.br/pesquisa/etica/index.html

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatórios parciais e final devem ser apresentados ao CEP, de acordo com os prazos estabelecidos na Resolução CNS-MS 196/96.

VII – DATA DA REUNIÃO

Homologado na I Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 19 de janeiro de 2010.

Prof. Dr. Carlos Eduardo Steiner
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

6.2. Anexo 2 – Carta de pedido de dispensa do termo de consentimento

Campinas, 21 de dezembro de 2009

Ao Comitê de Ética e Pesquisa

Venho por meio desta solicitar dispensa do Termo de consentimento livre e esclarecido para meu projeto de pesquisa intitulado “**Seleção dos carcinomas basais com perfil imunohistoquímico de cinco marcadores em carcinomas triplo negativos da mama**”.

Tal pedido se justifica uma vez que a pesquisa utilizará dados de prontuário e análise de blocos de parafina. Estes procedimentos não irão alterar o acompanhamento das pacientes. Será respeitado ainda, o sigilo das informações, bem como os princípios enunciados na declaração de Helsinki (HELSINKI, 1986) e cumpridos os termos da resolução 196 (10/10/97) do Conselho Nacional de Saúde (Inf. Epidemiol. do SUS - Brasil, ano V, nº 02, 1996).

Esta análise dos blocos de parafina, por se tratar de uma análise retrospectiva, não modificará o padrão de tratamento já instituído e há ainda o fato de que muitas pacientes podem ter falecido ou abandonado o serviço, dificultando o uso de consentimento livre e esclarecido.

Sem mais, atenciosamente,

Susana Oliveira Botelho Ramalho

6.3. Anexo 3 – Ficha de Coleta de Dados

FICHA Nº

Nº prontuário(HC)

BIÓPSIA

Data de Nascimento(DN): dd/mm/aaaa

Data Diagnóstico(DD): dd/mm/aaaa

Idade ao Diagnóstico(ID): anos

Data da cirurgia(DC): dd/mm/aaaa

Estadiamento clínico(EC)

1- ☐ E I

2- ☐ E IIA

3- ☐ EII B

4- ☐ E III A

5- ☐ E III B

6- ☐ E III C

Grau histológico(GH):

1- ☐ I

2- ☐ II

3- ☐ III

4- ☐ Desc /NA

Grau nuclear(GN):

1- ☐ 1

2- ☐ 2

3- ☐ 3

4- ☐ Desc/NA

Invasão Vascular(IV):

1- ☐ Sim

2- ☐ Não

Tipo histológico (TH)

1- ☐ CDI

2- ☐ CLI

3- ☐ CA medular

4- ☐ Lobular pleomórfico

5- ☐ CA tubular

6- ☐ CA colóide

7- ☐ CAmetaplásico

8- ☐ CA indiferenciado

9- ☐ CA invasivo com aspectos medulares

10- ☐ CA invasivo com marcadores neuroendócrinos

11- ☐ CA adenoescamoso de alto grau

12- ☐ CA papilífero

13- ☐ CA apócrino invasivo

Cerb prontuário (HER2P):

1- ☐ 0 ou + 2- ☐ ++ 3- ☐ +++ 4- ☐ Não realizado

Cerb TMA (HER2TMA) :

0- ☐ negativo
1- ☐ não significativo considerar negativo
2- ☐ resultado duvidoso
3- ☐ positivo
9- ☐ NÃO TEM SPOT OU NÃO TEM TUMOR

CK 5/6(TMA):

INTENSIDADE DE COLORAÇÃO:

0=negativo
1=leve
2=moderado
3=intenso

PORCENTAGEM DE CÉLULAS CORADAS:

0=negativo
1= <1%
2= 2 a 10%
3= 11 a 34%
4= 35 a 70%
5= >70%

SOMATÓRIA DE INTENSIDADE + % DE CÉLULAS CORADAS= 0,1,2,3,4,5,6,7,8

9- NÃO TEM SPOT OU NÃO TEM TUMOR

EGFR(TMA) :

INTENSIDADE DE COLORAÇÃO:

0=negativo
1=leve
2=moderado
3=intenso

PORCENTAGEM DE CÉLULAS CORADAS:

0=negativo

1= <1%

2= 2 a 10%

3= 11 a 34%

4= 35 a 70%

5= >70%

SOMATÓRIA DE INTENSIDADE + % DE CÉLULAS CORADAS= 0,1,2,3,4,5,6,7,8

9- NÃO TEM SPOT OU NÃO TEM TUMOR

RE TMA :**INTENSIDADE DE COLORAÇÃO:**

0=negativo

1=leve

2=moderado

3=intenso

PORCENTAGEM DE CÉLULAS CORADAS:

0= negativo

1= <1%

2= 2 a 10%

3= 11 a 34%

4= 35 a 70%

5= >70%

SOMATÓRIA DE INTENSIDADE + % DE CÉLULAS CORADAS= 0,1,2,3,4,5,6,7,8

9- NÃO TEM SPOT OU NÃO TEM TUMOR

RP TMA :**INTENSIDADE DE COLORAÇÃO:**

0=negativo

1=leve

2=moderado

3=intenso

PORCENTAGEM DE CÉLULAS CORADAS:

0=negativo

1= <1%

2= 2 a 10%

3= 11 a 34%

4= 35 a 70%

5= >70%

SOMATÓRIA DE INTENSIDADE + % DE CÉLULAS CORADAS= 0,1,2,3,4,5,6,7,8

9- NÃO TEM SPOT OU NÃO TEM TUMOR

FISH

1-☐ POSITIVO

2-☐ NEGATIVO

3-☐ INDETERMINADO

Quimioterapia Sistêmica(QTS):

1-☐ Sim

2-☐ Não

Quimioterapia neoadjuvante(Qneo):

1-☐ Sim

2-☐ Não

Baseada em Antraciclina (QTantra):

1-☐ Sim

2-☐ Não

Baseada em Antraciclina e taxano(QTax):

1-☐ Sim

2-☐ Não

Recidiva Sistêmica(RS):

1-☐ Sim

2-☐ Não

Data recidiva Sistêmica(DR):dd/mm_/aaaa

Local da recidiva Sistêmica(local):

- | | | |
|---|---|---|
| 1- ☐ Pulmão | 2- ☐ Ossos | 3- ☐ Cerebral |
| 4- ☐ Pele | 5- ☐ Rim | 6- ☐ Meninge |
| 7- ☐ MO | 8- ☐ Pleura | 9- ☐ Suprarrenal |
| 10- ☐ Fígado | 11- ☐ Linfonodos | 12- ☐ Pericárdio |
| 13- ☐ Mama contralateral | | 14- ☐ Ovários |

Situação(situação):

1- ☐ vivo

2- ☐ morto

Data óbito(DO): ____/____/____

Causa: _____

Relacionado à doença(RDÇ):

1- ☐ Sim

2- ☐ Não

Data Última Consulta(DUC): dd_/mm_/aaaa_

Perda de seguimento(PDS):

1- ☐ Sim

2- ☐ Não