



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA CELULAR**

**CYNTHIA MARA BRITO LINS PEREIRA**

**EXPRESSÃO DOS GENES *C-MYC*, *HER-2* E RECEPTORES HORMONAIIS COMO  
PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM  
CÂNCER MAMÁRIO**

**BELÉM  
2010**

**CYNTHIA MARA BRITO LINS PEREIRA**

**EXPRESSÃO DOS GENES *C-MYC*, *HER-2* E RECEPTORES HORMONAIS COMO  
PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM  
CÂNCER MAMÁRIO**

**Dissertação apresentada à Universidade Federal  
do Pará - Departamento de Neurociências e  
Biologia Celular, para obtenção do Título de  
Mestre em Biologia Celular.**

**Orientador:**

**Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano**

**Co-orientador:**

**Prof. Dra. Samia Demachki**

**Coordenador:**

**Prof. Dr. Cláudio Salgado**

**BELÉM  
2010**

---

### Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

---

Pereira, Cynthia Mara Brito Lins

Expressão dos genes *C-MYC*, *HER-2* e receptores hormonais como preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante em câncer mamário / Cynthia Mara Brito Lins Pereira; orientador., Rommel Mario Rodríguez Burbano. – Belém, 2010.

71 f.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2010.

1. Neoplasias da Mama 2. Neoplasias da Mama/quimioterapia 3. Genes *Myc* 4. Genes *erbB-2* 5. Marcadores Biológicos I. Burbano, Rommel Mario Rodríguez II. Título

CDU: 618.19-006.6

---

Catalogação na Fonte: Luciene Dias Cavalcante - CRB2/1076

**CYNTHIA MARA BRITO LINS PEREIRA**

**EXPRESSÃO DOS GENES *C-MYC*, *HER-2* E RECEPTORES HORMONAIIS COMO  
PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM  
CÂNCER MAMÁRIO**

Dissertação apresentada à Universidade Federal do Pará, Departamento de Neurociências e Biologia Celular, para obtenção do Título de Mestre em Biologia Celular.

Aprovada em: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**BANCA EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_ - Orientador

**Prof. Dr. Rommel Mario Rodríguez Burbano**  
Universidade Federal do Pará

\_\_\_\_\_

**Prof. Dr. André Salim Khayat**  
Universidade Federal do Pará

\_\_\_\_\_

**Prof. Dra. Patrícia Danielle Lima de Lima**  
Universidade do Estado do Pará

Aos meus pais, Carlindo e Cezarina, pelo amor, dedicação, e incentivo. Por acreditarem que a maior herança que poderiam me deixar, é a educação, pois a carregarei por toda a minha vida. Em especial a minha mãe, que me ajuda em todos os momentos desta minha caminhada. Mãe, sem você esta dissertação não existiria. Para vocês, minha eterna gratidão.

Ao meu marido, Edmilson, obrigada pelo seu incentivo, compreensão nas ausências, por acreditar e apoiar os meus projetos de vida e principalmente, por fazer parte da minha vida.

Ao meu filho Arthur, agradeço por você existir e me ensinar a cada dia o significado do amor, da dedicação e da alegria de ser mãe.

A minha irmã, Cybelle, obrigada pelas grandes ajudas nos momentos difíceis nesta minha jornada acadêmica e pelo carinho a mim dedicado

## AGRADECIMENTOS

A DEUS, que me guia em nesta minha estrada da vida, me dando sabedoria para alcançar meus ideais.

Ao Prof. Dr. ROMMEL MARIO RODRIGUÉZ BURBANO, exemplo a ser seguido pela sua dedicação e por seu espírito voltado à pesquisa e ao ensino. Agradeço principalmente pela sua amizade, por acreditar em meu ideal de pesquisa e pelo incentivo nos momentos difíceis desta jornada. Obrigada por sua orientação. A este grande doutor, meu eterno agradecimento.

À Profa. Dra. SÂMIA DEMACHKI, co-orientadora, profissional competente, dedicada, e incansável na pesquisa da patologia, sua grande paixão. Obrigada pelas sugestões oportunas, inteligentes neste trabalho, e pela amizade dentro e fora da área acadêmica. Agradeço suas análises imunohistoquímicas de grande importância para esta dissertação.

A Dra. DANIELLE CALCAGNO, pela ajuda indispensável desde o início desta pesquisa, por seu carinho, dedicação e exemplo de profissionalismo. A você, desejo uma carreira profissional brilhante.

Aos meus grandes mestres do Instituto Brasileiro de Controle do Câncer (IBCC), pela formação da mastologia e por despertarem em mim esta grande paixão.

Ao Dr. KLEBER REIS, competente, responsável, e que me orgulho de ter feito parte da sua formação profissional. Obrigada pela ajuda nas coletas de dados.

A Dra. VALÉRIA BARBOSA PONTES, minha irmã de coração, por ser minha maior incentivadora para o ingresso da vida acadêmica.

A Dra. MARIA VANDA CATÃO ARNAUD, chefe do Serviço de patologia do Hospital Ophir Loyola, pela confiança e permissão para levantamento do banco de dados.

A IVANILDE ARAUJO da ROSA e LUZIANE do CARMO SILVEIRA, técnicas de patologia do Hospital Ophir Loyola; e IRENILCE ARAUJO, técnica do Hospital João de Barros Barreto, pelo preparo das lâminas, ajuda na organização dos blocos de parafina, e pelo carinho a mim dispensado.

À LUCIENE DOS ANJOS PEREIRA COELHO, auxiliar administrativo do Serviço de Patologia do Hospital Ophir Loyola, por seu grande carinho, paciência na separação dos blocos de parafina das pacientes selecionadas para a pesquisa.

A todos os funcionários do DAME, do Hospital Ophir Loyola, em especial: ANTÔNIO CARLOS SILVA DE FREITAS, MARIA DE FÁTIMA NAKANO TAVARES de OLIVEIRA e MARCELO S. MONTEIRO, pela paciência e carinho.

As técnicas de enfermagem, VÂNIA CRISTINA BRITO de ARAÚJO e FERNANDA da CONCEIÇÃO CRUZ, pelo auxílio nos atendimentos as pacientes e na coleta de prontuários.

Ao FÁBIO CHAVES, estatístico, pela atenção dispensada na análise estatística do nosso material.

A todos os professores do Instituto de Ciências da Saúde, pelo aprendizado.

A todas as pacientes que fizeram parte deste estudo, que são exemplos de força, resignação e esperança; pela disponibilidade e paciência.

Agradeço a todos que fizeram parte de minha formação profissional e que me incentivaram para que chegasse até aqui.

Determinação, coragem e autoconfiança são fatores decisivos para o sucesso. Não importam quais sejam os obstáculos e as dificuldades, se estamos possuídos de uma inabalável determinação, conseguiremos superá-los. Independentemente das circunstâncias, devemos ser sempre humildes, recatados e despidos de orgulho.  
(Dalai Lama).

## RESUMO

PEREIRA, Cynthia Mara Brito Lins. **Expressão dos genes *C-MYC*, *HER-2* e receptores hormonais como preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante em câncer mamário**. 2010. 71 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2010.

O câncer de mama é um dos tumores de maior incidência na mulher, e por isso, muitas pesquisas vêm sendo realizadas, desde a avaliação das características epidemiológicas, à dinâmica biocelular e o tratamento desta doença. Na avaliação de respostas ao tratamento, os fatores preditivos são marcadores que auxiliam na escolha da melhor droga a ser usada. Esta dissertação teve o objetivo de avaliar os genes de receptores de estrogênio e progesterona, *HER-2* e *C-MYC* em tumores localmente avançados da mama, como fatores preditivos de resposta à quimioterapia neoadjuvante. Estudaram-se fragmentos da neoplasia maligna mamária de 50 pacientes com carcinoma ductal infiltrativo, com estadiamento clínico E-III e tratadas com quimioterapia neoadjuvante. Utilizaram-se as técnicas de imunohistoquímica e de hibridização *in situ* por fluorescência (FISH). A análise dos receptores hormonais não apresentou diferença estatisticamente significativa comparando as pacientes com resposta satisfatória à quimioterapia, das insatisfatórias; a análise do *HER-2* apresentou significância apenas para as respostas satisfatórias, onde houve baixa amplificação deste gene. Em relação ao *C-MYC* observou-se uma diferença estatisticamente significativa comparando a alta amplificação deste gene a uma resposta insatisfatória à quimioterapia. O estudo concluiu que o gene *C-MYC* pode ser um importante marcador de predição nos tratamentos quimioterápicos neoadjuvantes usados em câncer mamário.

Palavras-chave: Neoplasias da Mama. Neoplasias da Mama/quimioterapia. Genes *Myc*. Genes *erbB-2*. Marcadores Biológicos.

## ABSTRACT

PEREIRA, Cynthia Mara Brito Lins. **Expression of *C-MYC* gene, *HER-2* and hormone receptors as predictors of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer.** 2010. 71 f. Thesis (MA) - University of Pará, Institute of Health Sciences, Department of Neuroscience and Cell Biology, Belém, 2010.

Breast cancer is a higher incidence of tumors in women, and therefore many studies have been performed since the assessment of the epidemiological characteristics, the dynamics biocelular and treatment of this disease. In evaluating responses to treatment, the risk factors are markers that help in choosing the best drug to use. This work aimed to evaluate the genes of estrogen and progesterone receptors, *HER-2* and *C-MYC* in locally advanced breast tumors as predictors of response to neoadjuvant chemotherapy. We studied fragments of mammary malignancy in 50 patients with infiltrating ductal carcinoma, with clinical stage III and E-treated with neoadjuvant chemotherapy. We used the techniques of immunohistochemistry and fluorescence in situ hybridization (FISH). The analysis of hormone receptors showed no statistically significant difference comparing patients with satisfactory response to chemotherapy, the poor and the analysis of *HER-2* showed significance only for satisfactory answers, where there was poor amplification of this gene. Regarding *C-MYC* was observed a statistically significant difference comparing the high amplification of this gene to a poor response to chemotherapy. The study concluded that the *C-MYC* gene may be an important marker for predicting the treatments used in neoadjuvant chemotherapy for breast cancer.

**Keywords:** Breast Neoplasms. Breast Neoplasms / drug therapy. Myc genes. Genes erbB-2. Biological Markers.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>FIGURA 1-</b> Estimativa de Câncer de Mama, em Porcentagem, Estabelecida pelo INCA, para o ano de 2010, nas Regiões do Brasil (por 100.000 habitantes) .....	14
<b>FIGURA 2</b> – Taxas de Mortalidade das 5 Localizações Primárias mais Frequentes em 2007, Ajustadas pela Idade, pela População Mundial, por 100.000 Mulheres, Brasil, entre 2000 a 2007 .....	15
<b>FIGURA 3</b> - A família do Gene HER (erb) .....	26
<b>FIGURA 4</b> - Processo Celular Controlado pelo MYC Durante Condições Normais e Durante a Gênese Tumoral .....	29
<b>FIGURA 5</b> - Estrutura, Funções e Ligantes da Proteína MYC .....	30
<b>FIGURA 6</b> – Percentual por Faixa Etária das Pacientes Analisadas .....	39
<b>FIGURA 7</b> – Percentual por Estadiamento das Pacientes Analisadas .....	40
<b>FIGURA 8</b> – Corte Histológico de Carcinoma Ductal Infiltrativo Mamário G3 .....	44
<b>FIGURA 9</b> – Percentual do G3 em Relação à Resposta da Quimioterapia .....	45
<b>FIGURA 10</b> – Corte Histológico de Tumor Mamário com Receptor de Estrogênio Positivo ...	46
<b>FIGURA 11</b> – Corte Histológico de Tumor Mamário com Receptor de Progesterona Positivo .....	46
<b>FIGURA 12</b> – Corte Histológico de Tumor Mamário com Gene HER -2, Escore 3 + .....	48
<b>FIGURA 13</b> – Amplificações Gênicas de C-MYC, pelo Método de FISH .....	50
<b>FIGURA 14</b> – Comparação das Medias de Amplificação dos Alelos do C-MYC .....	51

## LISTA DE SIGLAS

AC	Adriamicina e Ciclofosfamida
AJCC	American Joint Committee on Cancer
ASCO	Sociedade Americana de Oncologia Clínica
BI-RADS	Breast Imaging Reporting and Data System
CDIS	Carcinoma ductal <i>in situ</i>
CLI	Carcinoma lobular <i>in situ</i>
CLI	Carcinoma lobular invasivo
CMF	Ciclofosfamida, metrotexate e S-fluoracil
FISH	Hibridização <i>in situ</i> por Fluorescência
HE	Hemotoxilina e eosina
HOL	Hospital Ophir Loyola
IHC	Imunohistoquímica
IMC	Índice de massa corpórea
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LS	Linfonodo sentinela
NSABP	Nacional Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
NSABP	Nacional Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project
OMS	Organização Mundial de Saúde
OMS	Organização Mundial de Saúde
PAHs	Hidrocarbono aromático plinuclear
QT	Quimioterapia
RE	Receptor de estrogênio
RP	Receptor de progesterona
SBR	Scarft, Bloorn e Richardson
TH	Terapia hormonal
TNM	Tumor, linfonodo, metástase
TRH	Terapia de reposição hormonal
UFPA	Universidade Federal do Pará
UICC	União Internacional Contra o Câncer
WCRF	World Cancer Research Fund

# SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	13
1.1 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS .....	18
1.1.1 Tipo Histológico .....	18
1.1.2 Grau Histológico .....	20
1.1.3 Tamanho do Tumor.....	21
1.1.4 Comprometimento dos linfonodos regionais.....	22
1.1.5 Gene <i>p53</i> .....	23
1.1.6 Anticorpo Ki-67 .....	24
1.1.7 Receptores Hormonais .....	24
1.1.8 <i>HER-2</i> / <i>c-erbB2</i> .....	26
1.1.9 Gene <i>C-MYC</i> .....	28
1.2 ESTADIAMENTO TUMORAL .....	32
1.3 QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE .....	35
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	37
2.1. OBJETIVO GERAL.....	37
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	37
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	38
3.1 CASUÍSTICA.....	38
3.2 IDADE.....	38
3.3 HISTOPATOLÓGICO .....	39
3.4 ESTADIAMENTO .....	40
3.5 LÂMINAS COM CORTES HISTOLÓGICOS .....	40
3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA .....	41
3.7 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> POR FLUORESCÊNCIA (FISH) .....	42
3.8 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO .....	42
3.9 MÉTODO ESTATÍSTICO UTILIZADO .....	43
<b>4 RESULTADOS</b> .....	44
4.1. GRAU HISTOLÓGICO .....	44
4.2 RECEPTORES HORMONAIS .....	45
4.5 <i>HER-2</i> .....	47
4.6 <i>C-MYC</i> .....	49
4.7 RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA.....	51
<b>5 DISCURSSÃO</b> .....	52
<b>6 CONCLUSÃO</b> .....	55
REFERÊNCIAS .....	56
APÊNDICES .....	64
ANEXOS.....	70

## 1 INTRODUÇÃO

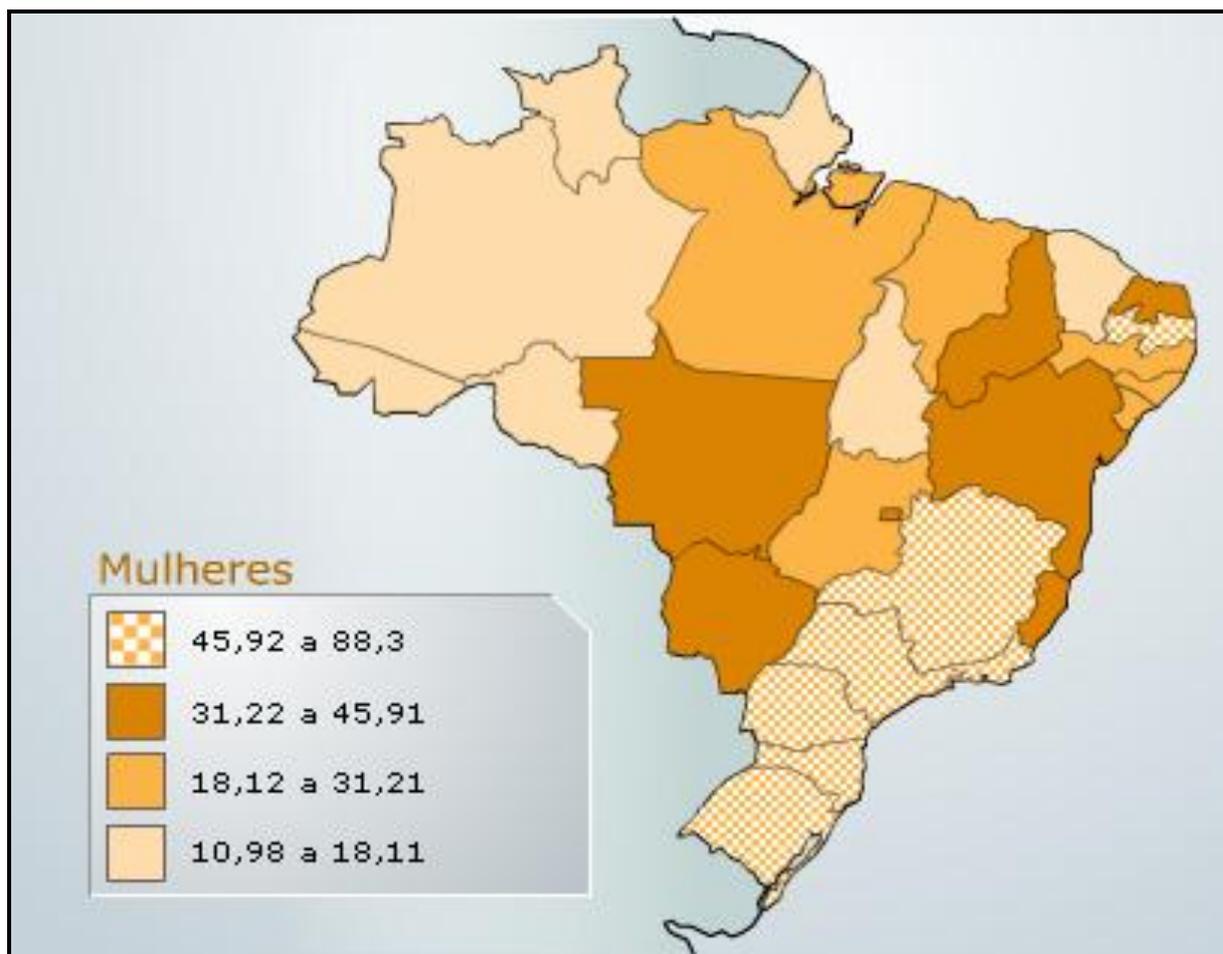
---

O câncer é uma doença caracterizada pelo crescimento celular desordenado, sendo resultado do acúmulo de alterações que favorecem a expressão ou repressão de genes vinculados ao controle do ciclo celular (CHIAO et al., 1990).

A transformação neoplásica consiste num processo multicausal no qual os controles normais da proliferação celular e da interação célula-célula são perdidos. A aberração dos proto-oncogenes em conjunto com a inibição não regulada dos genes supressores tumorais representam os fundamentos deste processo (FARIA; ROBENHORST, 2006).

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre mulheres em todo mundo, apresentando consideráveis variações em sua ocorrência entre as diferentes regiões geográficas. É considerado um problema de saúde pública, devido sua alta incidência, morbidade e mortalidade e, na América Latina, tem sido observado um aumento consistente nas taxas de mortalidade (GUERRA et al., 2009). As taxas de incidência são maiores nos Estados Unidos e Norte da Europa, intermediárias no Sul e Leste Europeu e também na América do Sul, e de valores mais baixos na Ásia (WILLETT et al., 2002).

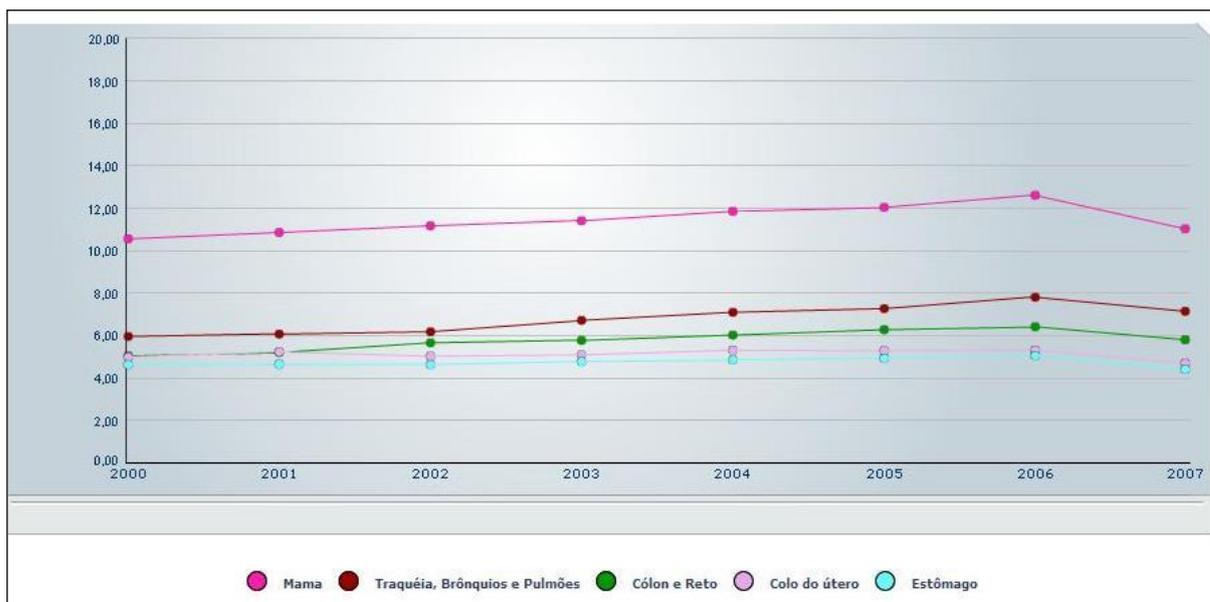
No Brasil, segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) para o ano de 2010, foram estimados 49.240 casos novos de câncer de mama. Esta incidência varia de acordo com as regiões brasileiras, conforme observado na figura a seguir. No estado do Pará os casos novos estimados foram de aproximadamente 640 para cada 100.000 habitantes correspondendo a uma taxa bruta de 16,77% do total de novos casos do Brasil. O câncer mamário é a segunda maior causa de morte em mulheres em todo o mundo (AMARAL et al, 2010).



**FIGURA 1-** Estimativa de Câncer de Mama, em Porcentagem, Estabelecida pelo INCA, para o ano de 2010, nas Regiões do Brasil (por 100.000 habitantes).

**Fonte:** INCA (2010a).

As diferentes taxas internacionais na incidência e mortalidade do câncer de mama indicam a importância na diferença do nível hormonal endógeno, estilo de vida, fatores ambientais, susceptibilidade genética e atividade no rastreamento mamográfico através dos diferentes países. A figura 2 mostra os cinco tumores com maior mortalidade em mulheres no nosso país, em que se observa uma predominância das neoplasias mamárias (HULKA; MOORMAN, 2001).



**FIGURA 2** – Taxas de Mortalidade das 5 Localizações Primárias mais Frequentes em 2007, Ajustadas pela Idade, pela População Mundial, por 100.000 Mulheres, Brasil, entre 2000 a 2007. Fonte: INCA (2010b).

As taxas para o aparecimento do câncer mamário são similares em alguns países até os 35 a 40 anos, depois começam a divergir. Estas diferentes formas das curvas de incidência específicas em cada país são consistentes com diferentes interpretações. Diferentes níveis de hormônios endógenos podem ser mais pronunciados após a menopausa devido às diferenças da média do peso corporal. Quando a produção ovariana hormonal acaba, as células adiposas são importantes sítios de conversão de precursores androgênicos em estrona. Mulheres americanas apresentam níveis muito maiores de estrogênios do que as japonesas, na pós-menopausa; e a idade natural das americanas iniciarem o período de menopausa também é mais elevada quando comparadas com as japonesas, devido a isso, ficam por mais tempo expostas a ação hormonal (HULKA; MOORMAN, 2001).

Muitos estudos epidemiológicos vêm demonstrando a associação entre o consumo excessivo de álcool e um risco maior para o câncer de mama (NAGATA et al., 2007). Esta associação aparece ser a mais consistente quando se compara com os fatores dietéticos e o risco de câncer de mama. Em estudos de intervenção, o consumo de aproximadamente dois drinques por dia demonstrou um aumento nos níveis de estrogênio total e biodisponível, e que doses únicas aumentavam fortemente os níveis de estradiol no plasma. A redução do consumo alcoólico diário parece ser um dos poucos métodos de redução ativa do risco de câncer mamário (FUNCHS et al., 1995).

O papel da dieta na etiologia do câncer tem sido sugerido, em parte, devido às altas variações internacionais nas taxas de incidência de câncer, e podem ser atribuída às propriedades antioxidantes de alguns nutrientes selecionados, influenciando no reparo e mutação de DNA, estimulação de fatores de crescimento, e no potencial antiestrogênico de alguns nutrientes. Evidências epidemiológicas consistentemente demonstram que o aumento dos níveis de peso e índice de massa corpórea (IMC) e o aumento da circunferência abdominal estão relacionados ao aumento de risco para câncer mamário. Alguns resultados de estudos sugerem que o risco de desenvolvimento de câncer mamário é 30% maior em mulheres na pós-menopausa e que apresentam um  $IMC > 31 \text{ kg/m}^2$  (AMARAL, 2010; MICHELS et al., 2007;).

Em 1997, uma revisão realizada pelo World Cancer Research Fund (WCRF) concluiu que a alta ingestão de frutas e verduras tem a probabilidade de diminuir o risco de câncer de laringe, pâncreas, mama e bexiga (RIBOLI; NORAT, 2003). Esta proteção conferida pela ingestão de frutas e vegetais é realizada através da ação de seus antioxidantes, fibras e outros nutrientes (MICHELS et al., 2007).

Um dos fatores ambientais com ampla relevância no câncer mamário tem sido o cigarro; o hábito de fumar está relacionado com aumento de risco de cânceres em vários órgãos, mesmos naqueles que não apresentam contato direto com o cigarro. As substâncias carcinogênicas passam através da membrana alveolar para a corrente sanguínea e podem ser transportadas para a mama por via de lipoproteínas no plasma. Estudos experimentais indicam que o cigarro contém potentes substâncias carcinogênicas como: hidrocarbono aromático plinuclear (PAHs), N-nitrosaminas, aminas aromáticas e alta prevalência de mutações do gene *p53* em tabagistas quando comparadas a não tabagistas (TERRY; ROHAN, 2002).

A glândula mamária é muito sensível a radiações tendo associação com o desenvolvimento da carcinogênese, principalmente quando exposta em idade jovem. O acúmulo no conhecimento sobre radiação levando ao risco de câncer mamário se deve principalmente a estudos epidemiológicos de pacientes expostas a radiação diagnóstica ou terapêutica em sobreviventes do ataque de bombas atômicas. As exposições à radiação, seja no monitoramento ou tratamento de doenças, é na atualidade, a maior causa de indução à carcinogênese radio-induzida (SINGLETERY, 2003). Estas exposições ocorrem em monitoramentos com Raios-X em escoliose ou tuberculose; crianças submetidas à radioterapia para desordens benignas; sobreviventes de câncer na infância expostas a altas doses de radiação no tórax; adultas tratadas com radioterapia. O risco de câncer mamário é proporcional à dose da radiação recebida e também a idade em que o indivíduo é exposto; quanto mais jovem, maior será o risco (RONCKERS et al., 2005).

Famílias com duas ou mais pessoas diagnosticadas com câncer mamário ou outras neoplasias relatadas, como de ovário, têm risco aumentado para o desenvolvimento da neoplasia maligna mamária. Recentes avanços em técnicas de biologia molecular têm contribuído bastante para o entendimento da susceptibilidade da herança para o câncer de mama. Estima-se que aproximadamente 7% de todas estas neoplasias sejam de causas hereditárias, podendo chegar até 27% quando associadas a fatores ambientais. Mutações envolvendo os genes supressores de tumor, BRCA-1 e BRCA-2, são responsáveis pelo desenvolvimento de neoplasias mamárias principalmente em idade precoce, abaixo dos 50 anos, podendo também induzir a tumorigênese mamária em idades mais tardias. Mulheres com mutações nesses genes têm 80 a 85% de probabilidade de adquirir neoplasia. (HULKA; JAMES et al., 2007; MOORMAN, 2001).

A densidade mamográfica é uma expressão usada na avaliação da quantidade dos componentes teciduais: epiteliais e conjuntivos mamários. Apresenta uma associação positiva entre o aumento na densidade e o risco de câncer mamário (ATTAM et al., 2008) Estudos vêm repetidamente demonstrando que com tecido mamário denso em mais de 75% da mama apresentam 4 a 6 vezes um aumento no risco de desenvolver câncer de mama, quando comparadas com mulheres com pouca densidade mamária. Outros estudos sugerem que o câncer mamário está diretamente associado com a densidade e que este achado pode ser um fator preditivo para o câncer (DOUGLAS et al, 2008). Os critérios de avaliação da densidade mamográfica podem ser realizados através do BI-RADS (Breast Imaging Reporting and Data System), método visual e categoria de Wolfe (HOWELL; CUZICK, 2009).

A terapia de reposição hormonal (TRH), atualmente chamada de terapia hormonal (TH), começou a ser utilizada no início da década de 1970, para controle de sintomas e prevenção da osteoporose, nas mulheres na pós-menopausa (SINGLETERY, 2003). O objetivo da terapia hormonal é obter um novo equilíbrio no organismo, procurando evitar as conseqüências da privação dos hormônios endógenos (LIMA; BOTOGOSKI, 2009). A estrogênio terapia, terapia hormonal apenas com reposição estrogênica, é considerada a terapia mais efetiva no manejo dos sintomas da menopausa. Nas mulheres que não foram submetidas à exérese cirúrgicas do útero, a TH é associada à progesterona natural ou aos progestágenos (LIMA; BOTOGOSKI, 2009). Evidências sugerem que uso de estrogênios na menopausa está associado a um aumento de 30 a 50% no risco de desenvolvimento do câncer mamário, quando usado por um longo período de tempo (05 anos ou mais). Outros estudos sugerem que este aumento do risco seria um tanto maior em certos subgrupos, como nas mulheres com história familiar de câncer mamário (HULKA; MOORMAN, 2001). O estrogênio tem efeito na

progressão de alterações celulares nas glândulas mamárias que evoluirão para neoplasias. Este conceito é comprovado nas observações epidemiológicas em que, menarca tardia e menopausa precoce têm efeito contrário ao câncer mamário (RONCKERS et al., 2005).

## 1.1 FATORES PROGNÓSTICOS E PREDITIVOS

O tratamento do câncer mamário, na atualidade, está baseado em um conjunto de características do paciente e do tumor, os chamados fatores prognósticos e preditivos do câncer de mama. Conceitua-se como fator prognóstico qualquer marcador, à época do diagnóstico ou do tratamento cirúrgico, que possa ser associado ao tempo livre de doença ou sobrevida global na ausência de terapia sistêmica adjuvante. Esses fatores podem ser usados para prever a história natural da doença (BOFF; WISINTAINER, 2006). Os fatores preditivos, por outro lado, são parâmetros que auxiliam na previsão da obtenção de sucesso, ou não, com determinada modalidade terapêutica. Muitos dos fatores prognósticos são preditivos de resposta e vice-versa (BARROS; BUZAID, 2007).

### 1.1.1 Tipo Histológico

Os fatores de risco melhor estabelecidos para câncer de mama, associados a lesões benignas, são histopatológicos. A categorização correta dessas lesões é ferramenta importante na prática clínica e se aplica na identificação de subgrupos de pacientes com riscos diferenciados para o desenvolvimento subsequente de câncer de mama. (BOFF; WISINTAINER, 2006). Indivíduos que tem história pregressa de carcinoma invasor, carcinoma *in situ* ou hiperplasia atípica na mama tem aumento significativo no risco de um futuro desenvolvimento de carcinoma invasivo mamário. A incidência de um segundo câncer invasivo, para um indivíduo que apresentou uma lesão invasora anteriormente, aumenta próximo de 1% ao ano. Nas lesões lobulares *in situ* ou hiperplasias atípicas, este risco aumenta em toda a mama, não somente na região anteriormente afetada. As hiperplasias típicas e atípicas são associadas com o aumento de câncer mamário invasivo (SINGLETERY, 2003). Pacientes com diagnóstico de carcinoma ductal *in situ* (CDIS) têm risco aumentado para

recorrências de nova lesão de CDIS, carcinoma invasor e até metástase à distância. Anteriormente, os CDIS, apresentavam uma porcentagem pequena de lesões com este diagnóstico, porém nos últimos 20 anos, houve aumento no seu diagnóstico baseada em uma melhor prevenção (PARTRIDGE et al., 2008).

Existe um grupo de tumores invasivos que tem um comportamento peculiar e por isso são considerados como tumores especiais, pois estão associados com um menor potencial de malignidade. Estes correspondem a uma incidência de 10% dos tumores invasivos, porém apesar da baixa incidência, o estudo destes tipos histológicos tem importância por serem tumores com características clínicas bem específicas. Normalmente são tumores bem diferenciados, expressando receptores hormonais, com reduzida taxa de comprometimento axilar, e com acometimento de mulheres em idades mais avançadas (BLAND; COPELAND, 2000).

O carcinoma lobular invasivo (CLI) constitui aproximadamente 10% de todos os carcinomas invasivos da mama, sendo o segundo tipo mais comum desta doença maligna. Apresenta características bem distintas e que diferem dos carcinomas ductais. Normalmente inicia-se em mulheres com idades mais avançadas, é diagnosticado mais tardiamente, associando com tumores de grandes tamanhos e são mais propensos a multifocalidade e multicentricidade, com risco maior de bilateralidade (LEE et al., 2010; LOPEZ; BASSETT, 2009). No carcinoma lobular invasivo, o tamanho tumoral e conseqüentemente o estadiamento clínico no momento do diagnóstico, apresentam taxas ligeiramente maiores que o principal tipo histológico dos tumores mamários, o carcinoma ductal (LOPEZ; BASSETT, 2009).

Normalmente as células destes tumores lobulares são associadas com a presença de receptores de estrogênio e progesterona e ausência de super-expressão ou amplificação do gene *HER-2*. O prognóstico é ainda controverso, com muitos estudos mostrando prognóstico semelhante comparado com o carcinoma ductal, no mesmo estágio e com o mesmo grau histológico, porém alguns autores apresentam opiniões divergentes considerando o prognóstico melhor ou pior que o CDI (ORNIVETO et al., 2008).

Os achados mamográficos no CLI apresentam altas taxas de falso negativo (maiores que 19%), em relação a outros tipos de tumores malignos mamários por oferecer dificuldade no diagnóstico mamográfico; os achados mais comuns encontrados são presença de massa usualmente com espículas ou com margens mal definidas, distorções da arquitetura do parênquima mamário, densidades assimétricas e microcalcificações (LOPEZ; BASSETT, 2009).

O carcinoma adenóide cístico da mama é uma neoplasia rara constituindo 0,1% dos tumores mamários e é mais comumente encontrado nas glândulas salivares, sendo uma doença com curso agressivo, contrastando com a doença mamária que apresenta excelente prognóstico. Ocorrem predominantemente em mulheres com média de idade entre 50 e 64 anos, raramente são bilaterais e não tem predileção por um determinado lado da mama. A incidência de metástases linfonodais é rara, e as metástases à distância incomuns. Normalmente apresentam receptores de estrogênio e progesterona negativos (LAW et al., 2009).

O carcinoma tubular é um tipo especial de tumor mamário composto de estruturas tubulares bem distintas e por células bem diferenciadas que compreendem ao menos 90% do carcinoma. Constituem menos de 2% de todos os carcinomas e tendem a ser diagnosticados em estágios iniciais, em torno de 7% ainda em Estadiamento T1, tumores menores que 1 cm. O seu prognóstico depende da pureza do padrão histológico (SHING et al., 2007).

O carcinoma mucinoso mamário é uma doença incomum ocorrendo entre 1 a 6% nos cânceres mamários, caracteriza-se pela grande produção de mucina que formam aglomerados extracelulares e em geral apresenta 50% ou mais de componente de mucina. Ocorrem principalmente em mulheres na pós-menopausa, com média de idade de 60 anos. Apresenta características clinicopatológicas bem favoráveis, como: baixo grau histológico, pouca incidência de comprometimento axilar, alta expressão de receptores de estrogênio e progesterona e grau bem diferenciado. As taxas de sobrevida em 10 anos ultrapassam 80% (PARK et al., 2010).

O carcinoma medular corresponde a 5% das neoplasias malignas da mama, incidindo principalmente em mulheres mais jovens, principalmente se pertencerem a famílias com alterações genéticas nos genes BRCA-1 e BRCA-2. Podem estar associados com a presença do carcinoma ductal *in situ* em 50% dos casos. Normalmente são associados com receptores negativos tanto para estrogênio como para progesterona. Apresentam bom prognóstico com 80% de sobrevida em 5 anos (BLAND; COPELAND, 2000).

### **1.1.2 Grau Histológico**

Entre os fatores aceitos como indicadores de prognóstico, a determinação do grau histológico é um dos principais e mais fáceis a serem acessados na rotina diagnóstica. Bloom e Richardson (1957) contribuíram para a melhora no sistema de graduação em carcinoma de

mama, adicionando uma escala numérica aos critérios histológicos inicialmente descritos por Patey e Scarff (1928). Estes criaram uma nova classificação denominada Scarff, Bloom e Richardson (SBR), adotada oficialmente pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 1968 (SCARFF; TORLONI, 1968). Recentemente, o grupo de Nottingham introduziu algumas modificações no método de SBR, na tentativa de tornar ainda mais objetivos os padrões de avaliação histológica (ELSTON; ELLIS, 1991).

O sistema SBR considera três variáveis: grau de diferenciação (mede a capacidade do tumor em originar formações tubulares, glandulares e papilares), pleomorfismo nuclear e índice mitótico (número de mitoses). Cada variável é pontuada numa escala de 1 a 3, e os tumores classificados como bem diferenciados (escores de 3 a 5), moderadamente diferenciados (escores 6 e 7) e fracamente diferenciados (escores de 8 e 9). De acordo com os dados da literatura para pacientes com tumores menores de 1 cm e axila negativa, o alto grau histológico pode ser considerado o fator mais consistente na associação com pior prognóstico, principalmente se estiver associada à invasão linfovascular (BOFF; WISINTAINER, 2006).

A correlação entre o grau histológico determinado pela SBR e tempo livre de doença em cinco anos foi demonstrada num estudo envolvendo 1.262 mulheres. Pacientes com um escore de 3 têm um risco relativo de recorrência de 4,4 vezes maior quando comparadas com aquelas com um SBR de 1 (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

### **1.1.3 Tamanho do Tumor**

O tamanho tumoral é considerado um importante fator prognóstico, de maior importância após o *status* dos linfonodos. As chances de recorrência aumentam quanto maior for o tamanho do tumor e sua repercussão clínica é maior nos casos de axila negativa, onde nestes casos passa a ser o fator prognóstico de maior relevância, e rotineiramente usado nas decisões da terapia adjuvante (BARROS; BUZAID, 2007, CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

Um estudo realizado por Rosen e col. (1993), que correlacionou o tamanho do tumor com a sobrevida livre de doença num período de 20 anos, verificou-se que a sobrevida de pacientes foi de 88% para aqueles com tumores menores ou iguais a 1,0 cm; 72% para aqueles com tumores entre 1,1 cm e 3,0 cm, e 59% para os que apresentavam tumores entre 3,1 cm e

5,0 cm. A média de tempo para o desenvolvimento de metástases à distância foi menor, quanto maior o tamanho tumoral (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

Atualmente, está estabelecido que no geral, toda paciente portadora de tumores maiores de 1 cm a 2 cm e com risco de recorrência a distância maior de 20%, independentemente de outros fatores, merece ser submetida a alguma forma de tratamento sistêmico, porque os tumores maiores de 1 cm têm maior chance de apresentar células metastáticas circulantes e metástases não detectadas clinicamente (BOFF; WISINTAINER, 2006).

#### **1.1.4 Comprometimento dos linfonodos regionais**

A presença de metástases para os linfonodos axilares ainda é considerada o maior indicador prognóstico de pacientes com câncer mamário invasivo. Quanto maior for o número de linfonodos comprometidos maior será a chance do surgimento de metástases, por isso, se faz necessário a avaliação do *status* axilar. É bem conhecido que a avaliação clínica realizada manualmente apresenta uma sensibilidade e especificidade pobres. A dissecação dos gânglios axilares se faz necessária para determinar o comprometimento axilar (BARROS; BUZAID, 2007; LEE et al., 2010).

Estudos clínicos a respeito do comprometimento linfonodal axilar têm estratificado os pacientes em três grupos quanto aos linfonodos: os com linfonodos negativos, os com um a três linfonodos positivos e os com quatro ou mais linfonodos positivos. Vários estudos demonstram uma relação direta entre o número de linfonodos acometidos e o prognóstico clínico e também com o tamanho tumoral, onde tumores maiores de dois centímetros têm chance maior de estarem comprometidos no momento do diagnóstico (WILLETT et al., 2002; MARINHO et al., 2008). A sobrevida em cinco anos de pacientes com ausência de comprometimento dos linfonodos é de 82,8% comparada com 73% dos que apresentam um a três linfonodos positivos, 45,7% dos com quatro a doze linfonodos e 28,4% com mais de 13 linfonodos acometidos (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

O estudo do linfonodo sentinela (LS) foi introduzido na prática clínica em 1990 e é considerado um método extremamente sensível e específico na predição de algumas neoplasias malignas, tais como a mamária. De acordo com Sociedade Americana de Oncologia Clínica

(ASCO) a biópsia do linfonodo sentinela é um método seguro na identificação nos casos de tumores mamários precoces e sem comprometimento axilar clínico (CARVALHO et al., 2010).

Os métodos de análise para avaliação do LS vêm sendo aperfeiçoados, no intuito de aumentar a acurácia e reduzir as taxas de falso-negativos; os estudos do LS consistem na sua multisseccção e coloração com a hematoxilina e eosina (HE) e também o uso da imunohistoquímica nos casos onde o resultado com o HE for negativo e se queira afastar a presença de pequenos depósitos. A maioria dos casos é classificada como positivos ou negativos, de acordo com a presença ou ausência de macrometástases. A edição de 2003 da classificação TNM (tumor, linfonodo e metástase) usou o tamanho de dois milímetros como corte para distinguir entre a presença de micro ou macrometástase (CARVALHO et al., 2010).

### 1.1.5 Gene *p53*

O *p53* é um gene de supressão tumoral que codifica uma proteína nuclear que inibe a progressão das células da fase G1 até a fase S do ciclo celular. As mutações deste gene estão entre as mais comumente observadas nos tumores humanos, principalmente nos carcinomas mamários onde se evidencia um percentual variável entre 30 a 55% destas mutações (AMADORI et al., 2002). A transcrição deste gene é ativada geneticamente pelo meio ambiente e também por estímulos metabólicos, nas quais as células podem seguir diferentes vias, como: parada no ciclo celular, reparo do DNA e apoptose (TANEJA et al., 2010).

As mutações moleculares no gene *p53* levam a um aumento na expressão da proteína *p53* que pode ser detectada através do estudo imunohistoquímico. A proteína *p53* supressora de tumor é uma proteína multifuncional que regula o crescimento celular e morte, respondendo a vários estresses genotóxicos e oncogênicos. A rigorosa regulação do *p53* é essencial na manutenção do crescimento celular normal e na prevenção da tumorigenese (KUO et al., 2010). A amplificação do *p53* está associada a um menor tempo livre de doença e sobrevida global, principalmente para tumores com comprometimento axilar; porém sua utilização clínica como fator prognóstico é questionável (BOFF; WISINTAINER, 2006). Entretanto, grandes estudos retrospectivos em pacientes com câncer de mama que apresentaram ou não, comprometimento axilar com a presença da amplificação do *p53*, sugerem que este gene pode ser considerado um marcador de pior prognóstico, isoladamente (RAVIOLI et al., 1998).

### 1.1.6 Anticorpo Ki-67

O Ki-67 é um anticorpo monoclonal, identificado por Gerdes e col. (1983) após imunização de ratos com linfoma de Hodgkin e expresso apenas em células nas fases de proliferação do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose), seja em células normais ou tumorais. O Ki-67 é vital na proliferação celular. Bridger e col. (1998) sugeriram que o papel do Ki-67 na organização do DNA baseia-se em sua localização em sítios extranucleares durante a fase G1 inicial, estes sítios contém centrômeros e DNA satélite, é também um ligante para DNA. MacCallum e Hall (2000) sugerem um papel estrutural para o Ki-67 com os nucléolos baseado em sua habilidade para interagir com outras proteínas e ligar-se com o RNA e DNA. Ambos os autores sugerem que Ki-67 é um fator essencial na síntese de ribossomos durante a divisão celular (TANEJA et al., 2010).

A expressão do Ki-67 tem relação direta com o tamanho tumoral, grau histológico, invasão vascular e *status* axilar. Por outro lado, tem relação inversa com os níveis de receptores hormonais. Vários estudos tentam determinar o poder prognóstico do Ki-67, porém a falta da metodologia nos ensaios e na padronização das técnicas impede a comparação adequada e, conseqüentemente, sua utilização rotineira na prática clínica (BOFF; WISINTAINER, 2006). Entretanto, em um estudo realizado no Hospital Universitário de Modena, Itália, onde se avaliou a expressão do Ki-67, *status* axilar e doença residual, em pacientes que receberam quimioterapia neoadjuvante para tratamento de neoplasia maligna mamária, demonstraram que pacientes com alta expressão do Ki-67 após tratamento quimioterápico apresentam tempo livre de doença e sobrevida global diminuídos, e que níveis de Ki-67 após tratamento sistêmico pode ser usado como um marcador substituto para avaliação de eficácia de tratamento (GUARNERI et al., 2009).

### 1.1.7 Receptores Hormonais

Os dois fatores preditivos mais amplamente usados em câncer são os receptores de estrogênio (RE) e receptores de progesterona (RP). Ambos RE e RP são fatores de transcrição ligante-acionada pertencente à família de receptores nucleares hormonais (DUFFY, 2005). A ação de estrogênio tem sido implicada no desenvolvimento e progressão do câncer mamário

desde o início do século XIX. O receptor de estrogênio foi identificado no início de 1950 e purificado alguns anos mais tarde. Entretanto, só em 1980, a primeira molécula de RE foi clonada, e em meados de 1990 clonaram a segunda molécula. Estes dois receptores relatados anteriormente são agora chamados de RE $\alpha$  e RE $\beta$ , respectivamente. (HERYNK; FUQUA, 2004).

Nas atividades fisiológicas na reprodução, do sistema esquelético e nervoso central, os estrogênios fazem parte de um importante papel na proliferação celular aberrante, como aquelas observadas no câncer de mama e no trato reprodutivo (MCDONNELL, 2005). Receptores de estrogênio  $\alpha$  e  $\beta$ , são codificados por genes independentes, e são localizados nos braços cromossômicos 6q e 14q, respectivamente. Os REs apresentam estruturas com alta homologia entre si (95%): um domínio central responsável pela ligação do receptor com seqüências de DNA em regiões reguladoras de genes alvos, e um domínio para a ligação com o hormônio (BARROS; BUZIAD, 2007).

A determinação de receptores hormonais (estrogênio e progesterona) é uma estratégia fundamental para estabelecer um tratamento adequado para pacientes com câncer mamário, estando estes receptores presentes em 75 a 80% nos tumores mamários (BOFF; WISINTAINER, 2006). Análises multivariadas demonstram que os receptores de estrogênio e progesterona são fortes fatores prognósticos em câncer mamário, principalmente em pacientes com linfonodos axilares negativos (RAVIOLI et al., 1998). Nas amostragens em que estes receptores encontram-se positivos, observa-se um grande benefício ao uso de hormonioterapia, em relação às amostras com *status* negativo. (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

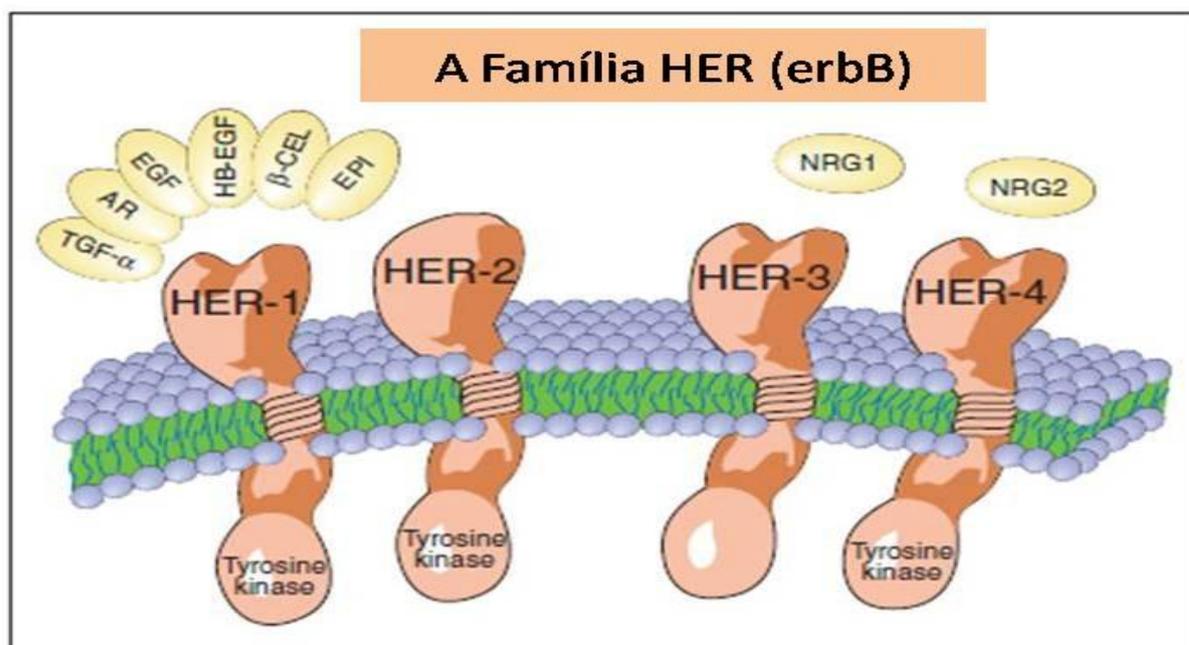
A super-expressão do RE $\alpha$  é um fator prognóstico bem estabelecido em pacientes com câncer mamário, estes receptores normalmente são associados com tamanhos tumorais pequenos, baixo grau tumoral, diploidia do DNA e um melhor prognóstico total, porém o significado prognóstico do RE $\beta$  ainda não está bem definido (TANEJA et al., 2010).

A análise do *status* dos receptores hormonais orienta o melhor regime terapêutico quimioterápico e hormonioterápico, avaliando também a sobrevida global, onde se observa uma associação entre *status* de receptores negativos com maior grau histológico tumoral (G3 ou tumores indiferenciados) e também com a presença de linfonodos positivos (BARNES et al., 2004). O método imunohistoquímico, principalmente após o desenvolvimento de anticorpos capazes de reconhecer epitopos que não se degradam durante o processamento histológico, tem, na prática, gradativamente, substituído o método bioquímico, antes tido como o padrão-ouro, para a avaliação dos receptores hormonais (ARIAS et al., 2003).

### 1.1.8 *HER-2* / *c-erbB2*

O gene *HER-2*, localizado no cromossomo 17q21, codifica um receptor transmembrana tirosina-quinase, membro da família dos receptores de crescimento epidérmico (EGFR) ou família *HER* (ROSS et al., 2003).

Esta família de receptores está envolvida na inter-relação célula-célula e célula-estroma, primariamente através da transdução de sinal, no qual fatores de crescimento epiteliais, ou ligantes, afetam a transcrição de vários genes pela fosforilação ou desfosforilação de uma série das proteínas transmembranas, e intermediários de sinalização intra-celular, onde por diversas vias culminará em alterações nos processos de proliferação, sobrevivência, motilidade e aderência celular (ZHOU; HUNG, 2003) (Figura 3). Outros membros desta família incluem: receptor de fator de crescimento epidérmico *HER-1*, *HER-3* e *HER-4* (DUFFY, 2005).



**FIGURA 3** - A família do Gene HER (erb).

**Nota:** *HER-2/neu* não tem ligantes conhecidos e que o *HER-3* não tem atividade intrínseca tirosina-quinase. Abreviações: TGF- $\alpha$ = fator de crescimento alfa transformante; AR= anfiregulina; EGF= fator de crescimento epidérmico; HB-EGF= ligante de heparina EGF;  $\beta$ -CEL= beta celulina; EPI= epinefrina; NRG1= neuregulina; NRG2= nereugulina 2.

Fonte: Adaptado de Ross et al., 2003.

Alterações no gene *HER-2* são responsáveis pela transformação celular *in vitro*, pelo desenvolvimento de neoplasias experimentais, assim como o surgimento de tumores em humanos (TEWARI et al., 2008). Amplificação de *HER-2* pode ser observada em muitos tipos

de tumores, ocorrendo com maior frequência nas neoplasias malignas da mama, observando-se uma amplificação entre 25 a 30% dos cânceres mamários na população em geral, principalmente nos carcinomas ductais invasivos (PRESS et al., 2005).

A super-expressão do gene *HER-2* é associada com aumento no número de mitoses, transformação maligna, aumento da motilidade celular, invasão e metástases em linhagens de células mamárias e sistemas de modelos tumorais (OLAYIOYE et al., 2000).

Os tumores malignos da mama que apresentam a amplificação do *HER-2* são associados com fenótipo mais agressivo, alto grau histológico, maior tamanho tumoral, aumento da atividade mitótica, níveis baixos de receptores hormonais e um pior prognóstico. Nestes pacientes observa-se uma diminuição nas taxas de sobrevida global (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; SLAMON et al., 1987). Estudos revelam que o efeito prognóstico do *HER-2* é forte tanto para a sobrevida global como para a recorrência local (ROSS et al., 2003; SCHLOTTER et al., 2003, TEWARI et al., 2008).

Relatos na literatura demonstram a associação da positividade do gene *HER-2* em tumores mamários com a resposta ao esquema quimioterápico CMF (ciclofosfamida, metotrexate e 5-fluoracil) e aos regimes de quimioterapia contendo antracíclicos, nestes, a resposta ao tratamento foi mais eficaz em relação ao uso do esquema de CMF (CIANFROCCA; GOLDDSTEIN, 2004; PUSZTAI, 2008). Dois amplos estudos randomizados para adjuvância associou o achado de amplificação do *HER-2* com maior resistência aos regimes quimioterápicos baseados no CMF (RAVIOLI et al., 1998).

Com base nas evidências avaliadas a respeito dos esquemas quimioterápicos, a Sociedade Americana de Oncologia Clínica concluiu que altos níveis de expressão do gene *HER-2* pode individualizar aqueles pacientes que irão se beneficiar do regime terapêutico contendo antracíclicos; porém que a expressão normal de *HER-2* não poderia ser usada isoladamente na exclusão do tratamento com os antracíclicos (HARRIS et al., 2007, PUSZTAI, 2008).

Técnicas baseadas na morfologia celulares e análises moleculares têm sido usadas para avaliação do *status* do *HER-2* em amostras de câncer de mama. A análise imunohistoquímica (IHC) do gene é o método predominantemente utilizado. Na interpretação do *HER-2*, pelo método imunohistoquímico, se faz necessário estabelecer a relação entre o número de receptores de *HER-2* na superfície das células, e a distribuição e intensidade da coloração na amostra de tecido examinada. Este procedimento foi normatizado, e de acordo com a percentagem de células coradas (ou marcadas) se classifica o material examinado em zero

(ausência de marcação) 1+ (marcação fraca), 2+ (marcação moderada), ou 3+ (marcação forte) (ANDRÉ et al. 2005; ROSS et al., 2003).

Exames patológicos para estabelecer o *status* do gene *HER-2* podem ser realizados no início do tratamento e assim determinar o protocolo a ser usado. Nos casos da presença de *HER-2* (3+), ou FISH (Hibridização *in situ* por Fluorescência) positivo para os resultados *HER-2* (2+), o uso do anticorpo anti-monoclonal Transtuzumab tem indicação como uma combinação de quimioterapia (HATAKE et al., 2007).

Outra forma de avaliação é a hibridização *in situ* ou FISH, é um método superior a IHC, sendo mais fiel para a marcação da amplificação do gene, tem vantagem de ser quantitativa, porém é uma técnica mais sofisticada. A concordância entre os testes de FISH ou reação de IHC é de 90%, quando a IHC mostrar aumento da expressão 3+. Apenas em reações por IHC em que os resultados forem 2+, recomenda-se o método de FISH (BARROS; BUZAID, 2007).

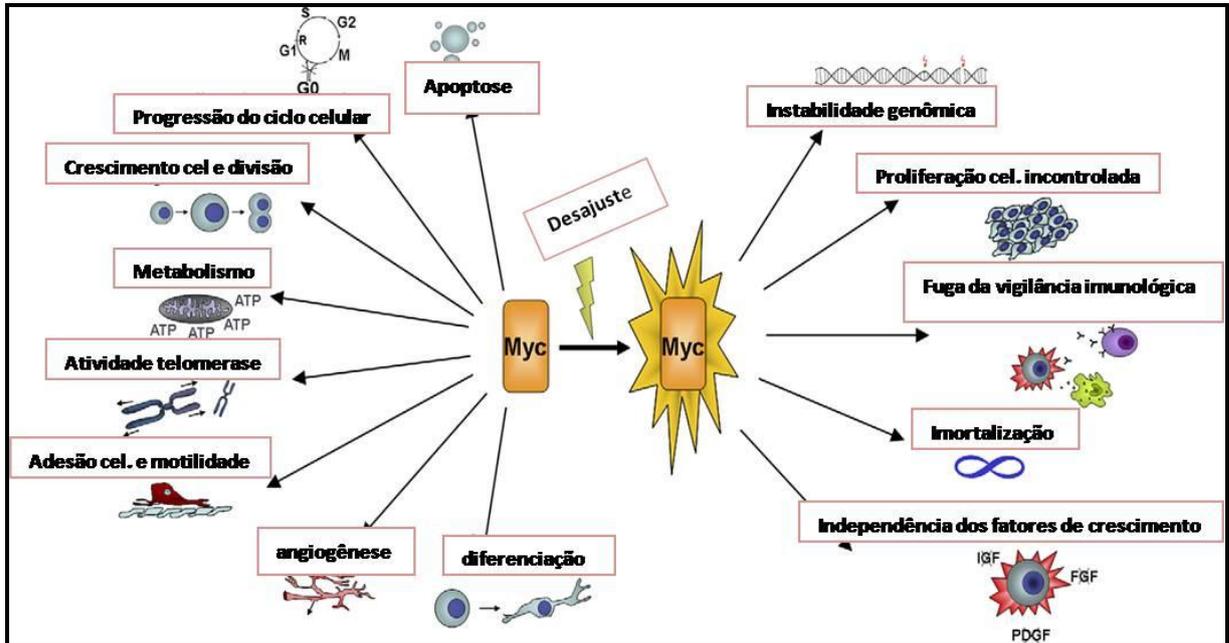
### 1.1.9 Gene *C-MYC*

O gene *C-MYC* localiza-se na região cromossômica 8q24, atualmente muito estudado em diversos tipos de cânceres humanos, devido sua amplificação ser uma alteração freqüentemente encontrada. Este gene está implicado em 80% de neoplasias malignas em humanos e animais (GRISHAM, 1996). A elevação ou desregulação da expressão do *C-MYC* tem sido detectada em uma larga série de cânceres humanos, e está freqüentemente associada com agressividade e indiferenciação tumoral. Câncer de mama, cólon, colo uterino, de pequenas células do pulmão, carcinomas, osteossarcomas, glioblastomas, melanomas e leucemias mielóides estão incluídos. (DANG, 1999; HENRIKSSON, 1996).

O gene *C-MYC* foi originalmente identificado como um homólogo celular do oncogene viral *V-MYC* (PELENGARIS et al., 2002), descoberto após sua atividade oncogênica ser um instrumental para a progressão de Linfoma de Burkitt. Após sua descoberta, outros dois genes foram identificados em cânceres humanos: o *N-MYC*, amplificado em neuroblastomas; e o *L-MYC*, em carcinoma pulmonar de pequenas células. (RYAN; BIRNIE, 1996).

Em adição a estes genes, outros dois tipos, o *B-MYC* e o *S-MYC*, foram identificados em roedores. Este conjunto de genes forma a família de oncogenes *MYC* e estão envolvidos em uma variedade de processos celulares, incluindo crescimento e proliferação celular, progressão

do ciclo celular, transcrição, diferenciação e apoptose de células normais e malignas, conforme observado na Figura 4. (HENRIKSSON, 1996; KOHL et al., 1983; MELKOUMIAN et al., 2002).



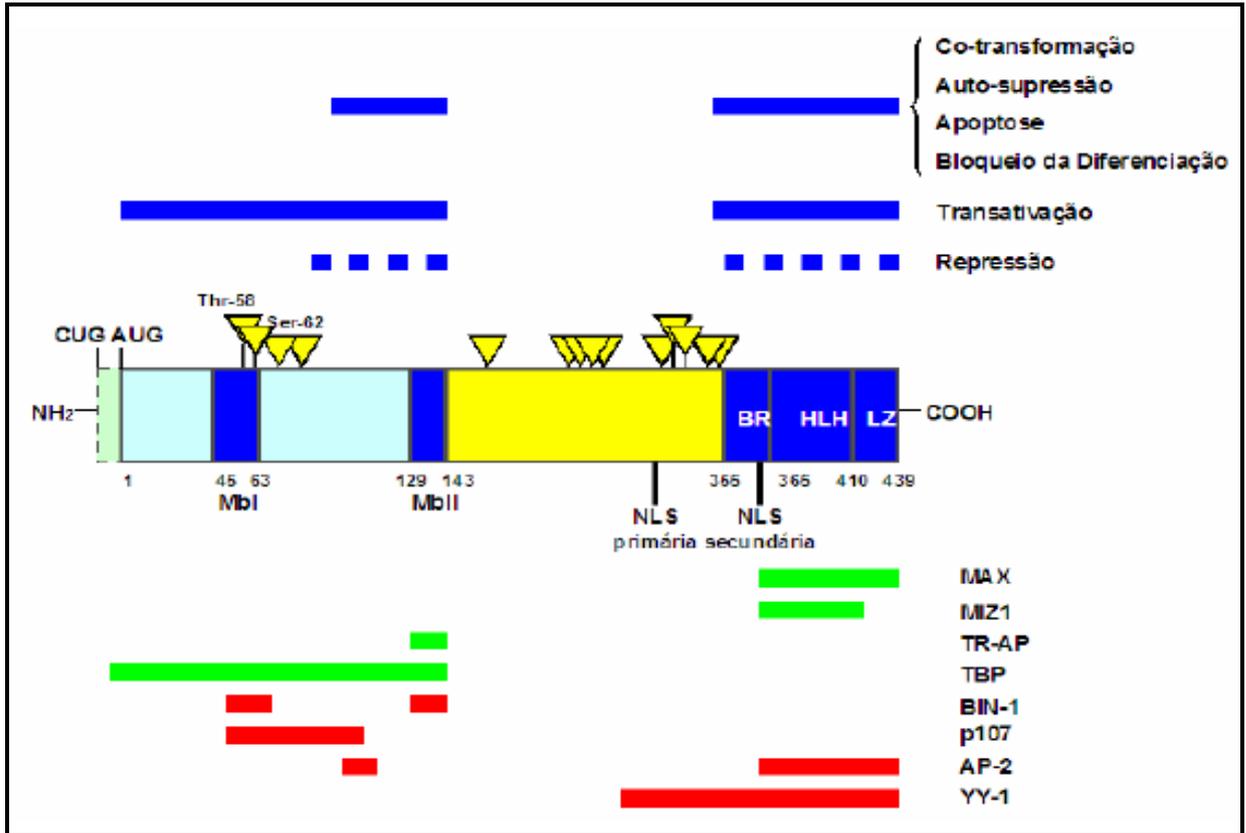
**FIGURA 4** - Processo Celular Controlado pelo MYC Durante Condições Normais e Durante a Gênese Tumoral.

**Nota:** *MYC* é um regulador de muitas atividades biológicas incluindo crescimento celular e divisão; progressão do ciclo celular; apoptose; diferenciação celular; metabolismo celular; angiogênese; adesão celular e motilidade. Desajuste do *MYC* pode resultar em apoptose, instabilidade genômica, proliferação celular incontrolada, fuga da vigilância imunológica, independência do fator de crescimento, e imortalidade.

**Fonte:** Adaptado de Henriksson; Vita, 2006.

Os promotores do gene *MYC* codificam três isoformas, *MYC* 1, *MYC*-2 E *MYC*-3 que são também chamadas *MYC*-S, que apresentam expressões em quantidades variáveis de acordo com o tecido examinado (SPOTTS et al., 1997).

A estrutura do *C-MYC* contém duas sequências de localização nuclear (NLS) e domínios estruturais que caracterizam a proteína como um fator de transcrição. Os primeiros 143 aminoácidos da porção N-terminal da proteína *MYC* compreendem o domínio de transativação (TAD), e contêm regiões chamadas *MYC* boxes (MB) I e II. A porção terminal contempla três importantes domínios: a região básica, que está implicada no reconhecimento específico da sequência do DNA; hélice-alça-hélice; e o zipper de leucina, estas duas últimas responsáveis pela formação de heterodímeros específicos entre a proteína *C-MYC* e seus ligantes. Esta estrutura é comum as três isoformas, observadas na Figura 5 (PELENGARIS et al., 2002).



**FIGURA 5** - Estrutura, Funções e Ligantes da Proteína *MYC*.

**Nota:** Os maiores domínios funcionais e os sítios de fosforilação estão representados na estrutura protéica central (cores azuis e amarelas). As regiões responsáveis pelas atividades biológicas são indicadas acima da estrutura protéica e as envolvidas na ligação com outras proteínas são enumeradas logo abaixo. A faixa descontínua (azul) indica os domínios relacionados à repressão transcricional, ainda não completamente definidos. Exemplos de proteínas ligantes que promovem e a função da proteína *MYC* são mostrados abaixo (cor verde e vermelha). BR, região básica; HLH, hélix-loop-hélix; LZ, zipper de leucina; MBI, *MYC Box I*; *MYC BOX II*, NLS, seqüência de localização nuclear.

**Fonte:** Adaptado de Faria; Rabenhorst, 2006.

Muitas evidências indicam que a proteína *MYC* funciona como fator de transcrição, formando complexos com DNA celular em altas concentrações, porém esta interação não tem significância fisiológica, requerendo sua interação com outra proteína, denominada *MAX*, que contém estrutura semelhante a da *MYC*, com hélice-alça-hélice e zíper de leucina sendo considerada como um par na dimerização. Os heterodímeros *MYC/MAX* ligam-se a regiões específicas de DNA que contenham a sequência CACGTG, chamado de E-box (RYAN; BIRNIE, 1996).

*MYC* regula a transcrição de seus genes através do recrutamento de acetilases e de histonas, proteínas modeladoras de proteínas, fatores transcricional basal e DNA metiltransferase (CALCAGNO et al, 2008).

O funcionamento altamente regulado do ciclo celular permite reparos a danos ao DNA antes da replicação, resultando na integridade genômica. A proliferação celular desordenada pode desencadear erros, ocasionando novas mutações e aberrações cromossômicas. O desequilíbrio da expressão de *MYC* pode promover a instabilidade genômica, caracterizada por ampliações, aneuploidias e poliploidias (LEVENS, 2002).

O primeiro relato de anormalidades do gene *C-MYC* no câncer mamário foi de Escot et al. (1986), que detectou uma pequena a moderada amplificação em 32% de 121 tumores que estavam em estudo (NESBIT et al., 1999).

Alterações genéticas complexas e heterogêneas estão envolvidas na etiologia do câncer mamário, e acredita-se que o câncer de mama tem origem em uma simples célula, que através de diferentes eventos pode chegar à transformação maligna (CORZO et al., 2006).

Polissomia do cromossomo 8 é uma alteração freqüente nos tumores mamários. O valor prognóstico desta alteração é ainda incerto (MARK et al., 1997; ROKA et al., 1998; VISSCHER et al., 2000).

Em uma meta-análise realizada por Deming (2000), observou-se uma ampla variação entre os achados na incidência da amplificação do gene *MYC* no câncer mamário. Nesta revisão, o gene *MYC* se encontraria amplificado entre 1 a 94% (média de 15,5%) das biópsias de neoplasia mamária. Esta heterogeneidade pode ser atribuída à baixa sensibilidade dos métodos de pesquisa usados em alguns estudos, ao grau tumoral estudado e/ou ao pequeno número de casos avaliados em muitas análises (LIAO; DICKSON, 2000).

No câncer de mama, a amplificação da região cromossômica onde está localizado o gene *C-MYC* (8q24) pode estar correlacionada, positivamente ou negativamente, com alterações de outros genes. A região 8q24, também pode apresentar nas suas seqüências o gene *HER-2*, através de um evento de translocação, embora a freqüência da co-localização destes dois genes e sua amplificação em comum, não seja um evento freqüente descrito na literatura. Poucos estudos relatam que a amplificação dos genes *C-MYC* e *HER-2* apresentam uma correlação positiva e ocorrência simultânea em certas biópsias de câncer mamário (LIAO; DICKSON, 2000; SCHLOTTER et al., 2003).

A correlação do gene *C-MYC* quando amplificado ou super-expresso, com os receptores de estrogênios com expressão negativa, em tumores mamários, é um evento freqüente (PERSONS et al., 1984). Esta associação também ocorre quando o *status* dos receptores de progesterona encontra-se negativo (BERNS et al., 1992).

O gene *MYC* tem um papel importante na carcinogênese, e sua amplificação pode estar associada com a progressão do carcinoma *in situ* para o estágio invasivo do tumor mamário,

com biologia tumoral desfavorável, resultando em carcinomas com pior prognóstico. Segundo estudo realizado por Corzo et al. (2006), a amplificação do *MYC* foi encontrada apenas em tumores mamários invasivos, e não em espécimes benignas ou lesões pré-invasivas. A amplificação deste gene poderia refletir um avanço na progressão tumoral, podendo ser um método citológico usado para diferenciar lesões pré- invasivas das realmente invasivas em casos de difícil diagnóstico (CORZO et al., 2006).

A amplificação ou super-expressão do *MYC* apresenta correlação com o tipo histológico ou grupo molecular, estando presente em 70% dos carcinomas ductais, 10% dos lobulares e 1% dos medulares (EFSTRATIADIS et al., 2007).

Parâmetros bem estabelecidos da doença mamária mostram que a amplificação do *C-MYC* pode ser um forte fator preditivo da progressão da doença. Nos casos em que o *status* axilar encontra-se negativo e os receptores de estrogênio e progesterona, positivos e há uma ausência na amplificação do gene *C-MYC*, estes pacientes podem apresentar até 0% de taxa de recorrência. Análises multivariadas indicaram que a amplificação do *C-MYC* é um indicador de prognóstico, independente de recorrência precoce, mais eficaz que o status de receptor de estrogênio e o tamanho tumoral (NESBIT et al., 1999).

## 1.2 ESTADIAMENTO TUMORAL

Na primeira metade do século XX, médicos observaram que nem todos os cânceres de mama tinham o mesmo prognóstico ou precisavam do mesmo tratamento, e tentaram definir características que poderiam realmente distinguir quais os tumores que necessitariam ou não de um tratamento agressivo. Em 1904, Steintal, médico alemão, propôs a divisão do câncer mamário em 03 estágios prognósticos: tumores pequenos de localização apenas mamária (Estágio I), tumores grandes que envolviam linfonodos axilares (Estágio II), e tumores que claramente envolviam tecidos ao redor da mama (Estágio III). Esses estádios mais tarde seriam modificados (SINGLETARY; CONNOLLY, 2006).

O sistema tumor, linfonodo, metástase (TNM), foi desenvolvido por Pierre Denoix em 1942 e representa uma tentativa de classificação de câncer baseada nos maiores atributos tumorais que influenciam o prognóstico da doença: tamanho do tumor primário (T), presença e extensão do envolvimento de linfonodo regional (N), e presença de metástase à distância (M). A União Internacional Contra o Câncer (UICC) apresentou a classificação clínica para o câncer

de mama baseada no TNM, em 1958 e a American Joint Committee on Cancer (AJCC) publicou a classificação de mama em 1977 (BARROS; BUZAID, 2007).

A classificação clínica do Sistema TNM (Quadro 1) é utilizada para indicar o tratamento locorregional, baseando-se unicamente em evidências colhidas antes do tratamento inicial do tumor primário. Os exames incluem principalmente exames clínicos, feitos através de anamnese, exame físico das mamas e cadeias de drenagem linfática e exames de imagens, tais como mamografia, ultra-sonografia mamária e mais recentemente a ressonância nuclear magnética mamária (BARROS; BUZAID, 2007).

## ESTADIAMENTO DOS TUMORES DE MAMA

### QUADRO 1 - Estadiamento do Tumor Mamário, Classificação Clínica

(Continua)

Tamanho do tumor (cT)	
<b>TX</b>	<b>Tumor primário não pode ser avaliado</b>
<b>T0</b>	<b>Não há evidência de tumor primário</b>
<b>Tis</b>	<b>Carcinoma <i>in situ</i>: carcinoma ductal <i>in situ</i> carcinoma lobular <i>in situ</i> doença de Paget da papila s/ tumor</b>
<b>T1</b>	<b>Tumor menor ou igual a 2 cm</b>
<b>T1mic</b>	<b>Carcinoma microinvasor</b>
<b>T1a</b>	<b>Tumor maior que 0,1 cm e menor ou igual a 0,5 cm</b>
<b>T1b</b>	<b>Tumor maior que 0,5 cm e menor ou igual a 1 cm</b>
<b>T1c</b>	<b>Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm</b>
<b>T2</b>	<b>Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm</b>
<b>T3</b>	<b>Tumor maior que 5 cm</b>
<b>T4</b>	<b>Tumor de qualquer tamanho com extensão para</b>
<b>T4a</b>	<b>Parede torácica</b>
<b>T4b</b>	<b>Edema ou ulceração da pele</b>
<b>T4c</b>	<b>4a + 4b</b>
<b>T4d</b>	<b>Carcinoma inflamatório</b>

(Conclusão)

Linfonodos Regionais (cN)	
<b>NX</b>	<b>Linfonodos regionais não podem ser avaliados</b>
<b>N0</b>	<b>Ausência de metástase em linfonodos regionais</b>
<b>N1</b>	<b>Metástase para linfonodos axilares ipsilaterais móveis</b>
<b>N2</b>	
<b>N2a</b>	<b>Metástase para linfonodos axilares coalescentes ou aderidos a estruturas adjacentes Metástase clinicamente aparente na mamária interna na ausência de metástase axilar</b>
<b>N2b</b>	

N3	Metástase para linfonodo infraclavicular
N3a	Metástase para linfonodos da mama interna e axilar
N3b	Metástase para linfonodos supraclavicular
N3c	
Metástase à Distância (cM)	
MX	Presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

**Fonte:** UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER. **TNM Classificação de Tumores Malignos**. 6.ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. Traduzido de: TNM Classification of malignant Tumours.

**Observação:** Parede torácica inclui arcos costais, músculos intercostais e músculos serrátilo anterior, mas não inclui o músculo peitoral.

Doença de Paget associada com tumor é classificada de acordo com o tamanho do tumor.

### QUADRO 2 - Estadiamento Tumoral

Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
	T0	N1	M0
Estádio IIA	T1	N1	M0
	T2	N0	M0
Estádio IIB	T2	N1	M0
	T3	N0	M0
	T0	N2	M0
Estádio IIIA	T1	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

**Fonte:** UICC (2004).

### 1.3 QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE

Ao longo deste século, o manejo do câncer mamário foi governado por um paradigma que expunha o uso de cirurgias radicais e radioterapia como formas de tratamento. Entretanto, em 1950 a 1960, a quimioterapia sistêmica e a terapia hormonal começaram a serem usadas no tratamento de doenças avançadas. Com o advento de quimioterapia adjuvante pós-operatória

nos estágios iniciais da doença em meados de 1970, dois paradigmas independentes subsequentemente surgiram: um direcionado ao controle loco-regional e outro braço para a eliminação de micrometástases (FISHER et al, 1997).

A quimioterapia neoadjuvante refere-se à administração de quimioterápico antes do início do tratamento locorregional, seja através de procedimento cirúrgico ou radioterapia, considerada um tratamento padrão no manejo de tumores localmente avançados de mama e nos tumores inflamatórios (TEWARI et al., 2008). Recentemente esta terapia tem sido eleita no manejo de pacientes com doença operável, eleitas para cirurgias radicais, como a mastectomia, e que podem se beneficiar de cirurgias conservadoras (PENAULT-LLORCA et al., 2008).

A quimioterapia neoadjuvante tem por objetivos: a diminuição do tumor, e assim proporcionar tratamento cirúrgico conservador, evitando cirurgias radicais; início precoce do tratamento sistêmico de micrometástases, muitas indetectáveis clinicamente; avaliar *in vivo* a resposta ao quimioterápico, avaliado com a diminuição tumoral, e nos casos de não resposta, pode-se oferecer uma mais precocemente uma nova estratégia de tratamento; e melhorar a sobrevida global (MAKRIS et al., 1997; PENAUULT-LLORCA et al., 2008; AMADORI et al., 2002). A neoadjuvância em pacientes com tumores grandes (>3 cm), e tumores com estagio avançado (T3, T4, ou N2) de câncer mamário. Esta terapia tem sido avaliada em vários estudos clínicos que por longa data têm sido conduzidos pelo Nacional Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project (NSABP). (SMITH et al., 2002).

Nas últimas décadas, a administração de quimioterapia neoadjuvante tem seu papel firmado no aumento da sobrevida global e livre de doença nos tumores localmente avançados. A resposta tanto clínica como patológica é correlacionada com a sobrevida. Os pacientes que obtêm com a quimioterapia neoadjuvante uma boa sobrevida são aqueles que apresentaram regressão completa do tumor primário, entretanto apenas uma minoria apresenta tal resposta (SMITH et al., 2002). Esta terapia pode ser realizada com um número de ciclos de quimioterapia pré-estabelecido, de três a quatro, ou efetua-la até a obtenção de maior resposta observável (AMADORI et al., 2002).

Mais recentemente, a quimioterapia neoadjuvante tem sido realizada e aplicada em casos de tumores mamários operáveis incluindo aqueles em estágios precoces de carcinomas invasivos. Esta terapia fornece melhores resultados em termos de taxas de resposta ao tratamento, e redução na necessidade de mastectomia (YUAN et al., 2009).

Nos últimos 40 anos, a terapêutica para o câncer de mama teve progresso pelo não uso de quimioterapia e presença de muitas recorrências, para uso de regimes com doxarrubicina e ciclofosfamida, ou uso de metrotexate-fluoracil-ciclofosfamida (CMF), com um benefício

entorno de 4%; em 1980 iniciou com o uso de antracíclicos com benefício de outros 4%. A era excitante dos taxanes iniciou em 2000, com 5% de melhora no progresso, e o mais recente avanço foi o uso do trastuzumab com grande benefício (SWAIN, 2010).

## 2 OBJETIVOS

---

### 2.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar a associação da expressão dos genes *MYC* e *HER-2* e dos receptores de estrogênio e progesterona com resposta à quimioterapia neoadjuvante, com finalidade de verificar se a amplificação gênica e/ou hiper-expressão desses genes e dos receptores hormonais podem ser utilizadas como marcadores prognósticos e preditivos em carcinoma de mama localmente avançado.

### 2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a expressão da proteína do gene *C-MYC* por imuno-histoquímica e de Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH) em cânceres de mama;
- investigar a expressão do receptor de estrogênio por imunohistoquímica;
- investigar a expressão do receptor de progesterona por imunohistoquímica;
- investigar a expressão da proteína do proto-oncogene *Her-2* por imuno-histoquímica;
- correlacionar os resultados encontrados e avaliar à associação dos mesmos à resposta quimioterápica neoadjuvante.

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

---

#### **3.1 CASUÍSTICA**

Foram utilizadas amostras de tumores do tipo histológico carcinoma ductal invasivo, de pacientes portadores de tumores localmente avançados mamários (Estádio IIIA, IIIB ou IIIC), submetidas a tratamento oncológico no Hospital Ophir Loyola (HOL), localizado na cidade de Belém, Estado do Pará. As pacientes selecionadas no estudo foram tratadas neste hospital entre os anos de 2005 a 2009.

Os critérios de inclusão consistiram em mulheres com tumores localmente avançados, virgem de tratamento. Foram excluídas as pacientes cardiopatas, gestantes, lactantes ou com metástase.

Todos os espécimes tumorais foram coletados através de biópsia incisional realizadas previamente ao início do tratamento quimioterápico neoadjuvante, sendo selecionados 50 casos. Foram realizados estudos imunohistoquímicos e de biologia molecular, nos espécimes tumorais que se encontravam arquivados no Serviço de Anatomia-patológica do HOL.

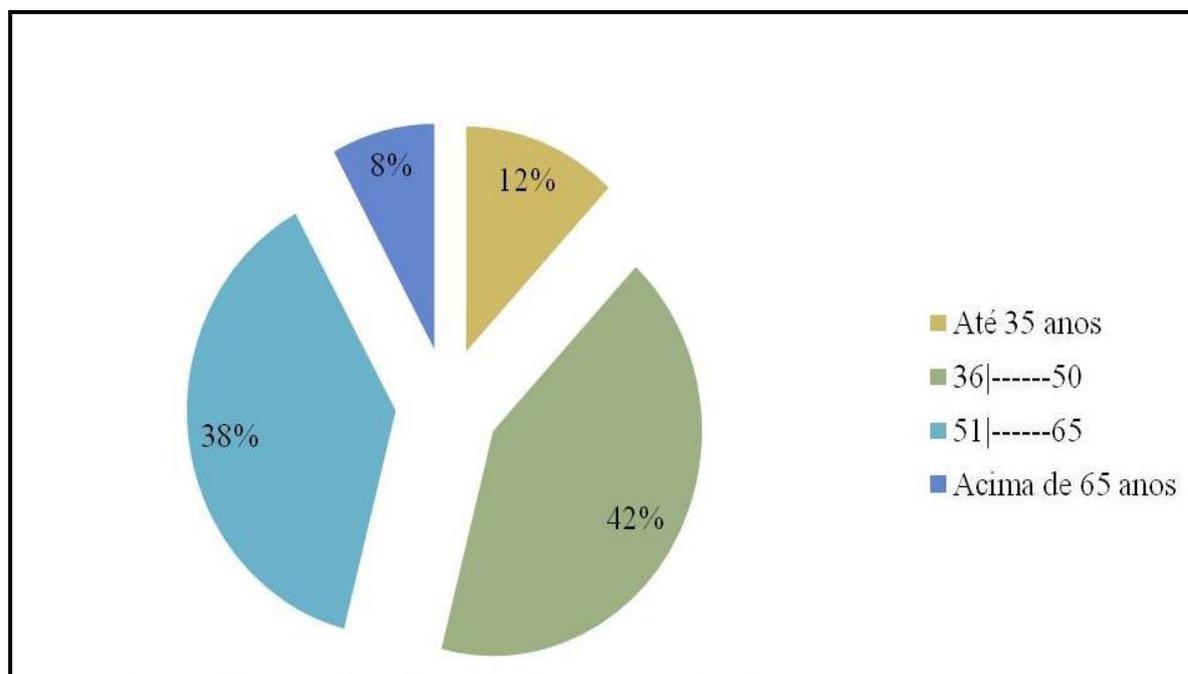
O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética do Núcleo de Medicina Tropical da UFPA, Protocolo 43/2008 (Anexo A).

#### **3.2 IDADE**

A idade das 50 pacientes incluídas neste estudo variou entre 31 e 78 anos, com média de 45,76 anos. A idade foi distribuída em faixas etárias: 06 pacientes com idade até 35 anos (12%), 21 casos entre 36-50 anos (42%), 19 casos entre 51-65 anos (38%) e 04 casos acima de 65 anos (8%).

Os resultados mostraram que 12% das pacientes eram jovens, idade igual ou abaixo de 35 anos, este achado foi maior que o esperado na literatura, pois o câncer de mama em mulheres abaixo de 40 anos é uma condição incomum, correspondendo a 6,5% dos casos. Entretanto cada vez mais se diagnostica câncer mamário em jovens, principalmente naquelas

com história familiar positiva de câncer mamário na pré-menopausa e fatores genéticos de risco (BARRETO et al., 2006).



**FIGURA 6** – Percentual por Faixa Etária das Pacientes Analisadas.

**Fonte:** PEREIRA, C. M. B. L. **Expressão dos genes *C-MYC*, *HER-2* e receptores hormonais como preditores de resposta à quimioterapia neoadjuvante em câncer mamário.** 2010. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Neurociências e Biologia Celular, Belém, 2010.

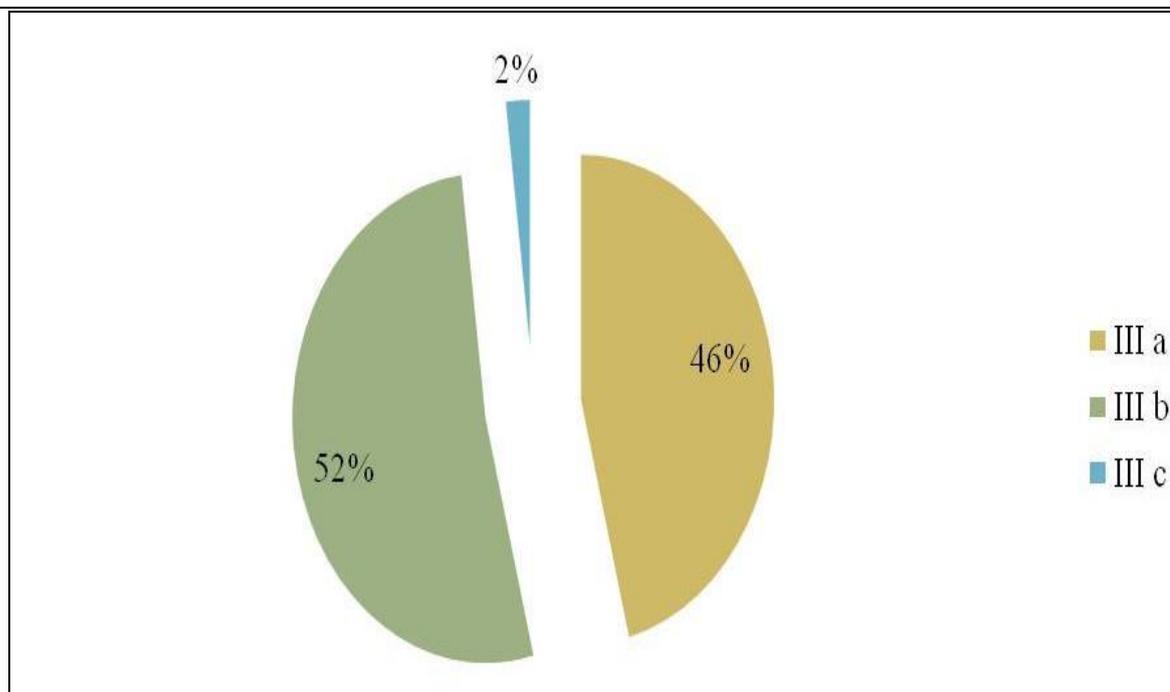
### 3.3 HISTOPATOLÓGICO

Os dados histopatológicos como o tipo histológico, grau de diferenciação histológica e acometimento dos linfonodos axilares foram obtidos dos laudos histopatológicos realizados pelo Departamento de Patologia do HOL. A avaliação dos linfonodos axilares não fizeram parte da pesquisa, pois são analisadas apenas após o término da quimioterapia, quando estas pacientes são encaminhadas para procedimento cirúrgico. Neste estudo, empregamos a classificação de SBR modificada por Elston e Ellis (1991).

Dos tumores selecionados do banco de dados, 3 casos eram de carcinomas ductais invasivos grau 1, 42 casos eram grau 2 e 5 casos eram grau 3.

### 3.4 ESTADIAMENTO

Todas as pacientes selecionadas para o estudo apresentavam estadiamento clínico III (IIIa, IIIb ou IIIc), estabelecido pela UICC (2004). Destas, 23 apresentavam estadiamento IIIa, 26 o estadiamento IIIb e 1 caso estadiada como IIIc (Figura 7).



**FIGURA 7** – Percentual por Estadiamento das Pacientes Analisadas.

**Fonte:** PEREIRA (2010).

### 3.5 LÂMINAS COM CORTES HISTOLÓGICOS

Os cortes histológicos foram fixados em lâminas para microscopia devidamente limpas em acetona e tratadas com poly-D-lisina. Cinco lâminas de cada bloco de parafina foram obtidas através da secção destes blocos, armazenados no setor de patologia do HOL, cada bloco foi cortado com lâminas individuais; sendo três destas destinadas ao estudo imuno-histoquímico e duas para o método de FISH.

### 3.6 IMUNOHISTOQUÍMICA

A detecção da proteína dos genes *C-MYC*, *HER-2* e genes do receptor do estrogênio e de progesterona nos tumores mamários foram feitos pela utilização de anticorpos primários comerciais. O método imuno-histoquímico adotado foi o da estreptavidina-biotina-peroxidase descrito por Hsu et al. (1981), com modificações.

- a) Desparafinação e hidratação das lâminas – as lâminas foram colocadas em estufa pré-aquecida a 60°C, durante 120 minutos. Depois as lâminas foram mergulhadas em xilol aquecido a 60°C por 10 minutos. Posteriormente, as lâminas passaram por uma bateria de xilol (I, II, III) – álcool etílico 100% (I, II e III) – álcool etílico 80%, permanecendo 1 minuto em cada passagem. No final as lâminas foram passadas em água por 10 minutos;
- b) recuperação antigênica das lâminas – a recuperação antigênica das lâminas foi realizada com tampão citrato 10mM pH 6, ± 99 °C em forno de microondas, por 15 minutos. Após esse período as lâminas foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos;
- c) bloqueio da peroxidase endógena – as lâminas foram mergulhadas em um borel com peróxido de hidrogênio a 3% para que o bloqueio da peroxidase endógena fosse realizado;
- d) incubação das lâminas com o anticorpo primário – os cortes histológicos foram cobertos por anticorpo primário diluído e as lâminas incubadas (4-8°C) por 16 horas.
- e) detecção pelo sistema LSAB+ (DakoCytomation®), seguindo as recomendações do fabricante;
- f) revelação pelo sistema DAB+ (*3,3'-diaminobenzidine*) (DakoCytomation®), seguindo recomendações do fabricante;
- g) contra coloração – as lâminas foram mergulhadas em um borel contendo Hematoxilina de Harris a 40%;
- h) desidratação das lâminas – as lâminas foram passadas em gradiente de água – álcool – xileno para desidratação;
- I) montagem das lâminas com lamínulas e Bálsamo do Canadá.

### 3.7. HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* POR FLUORESCÊNCIA (FISH)

O método FISH baseia-se no uso de um fragmento DNA de origem conhecida (uma sonda), que é marcado por fluorescência e hibridado ao material a ser analisado. A sonda liga-se as seqüências homólogas nos cromossomos e, então, pode ser visualizada por microscopia de fluorescência (BAAK et al., 2003; SUGAYAMA, 2000). Este método promove um simples, rápido e confiável meio para acessar instabilidades genéticas no câncer. A técnica de FISH pode detectar anormalidades genéticas numa escala maior que outras técnicas (LAWRENCE-FOX et al., 1995).

Núcleos interfásicos tumorais foram hibridados com sonda única diretamente marcada para a região do gene *C-MYC* (8q24) da Qbiogene. O protocolo utilizado foi o de Pinkel et al. (1986). A análise citogenética molecular foi realizada em microscópio de fluorescência OLYMPUS BX41, com filtro triplo DAPI/FITC/TRICT. Os sistemas de captura e de análise de imagens utilizado foram o da Applied Spectral Imaging. Para cada amostra, foram analisados 200 núcleos interfásicos. Como controle negativo foi utilizado linfócitos do sangue periférico de um indivíduo hígido.

### 3.8. TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

As pacientes estudadas foram submetidas à quimioterapia neoadjuvante seguindo o protocolo do Serviço de Oncologia Clínica do HOL. As pacientes realizaram no início do tratamento exames laboratoriais para avaliação de sua capacidade hematológica, com dosagem dos glóbulos vermelhos e brancos; e estudo da fração de ejeção cardíaca com auxílio de Ecocardiograma. Aquelas que apresentaram fração de ejeção menor que 55%, foram selecionadas para realizar outro esquema terapêutico, com menor cardiotoxicidade. As pacientes que apresentaram exames de estadiamento sugestivo de presença de metástase foram afastadas da pesquisa.

O esquema quimioterápico consistiu em 04 ciclos de Adriamicina (60mg/m<sup>2</sup> de área corpórea) associado à Ciclofosfamida (600mg/m<sup>2</sup>), esquema conhecido como AC em intervalos de 21 dias. O estadiamento clínico das pacientes teve como base o TNM (UICC, 2004).

A resposta tumoral à quimioterapia foi avaliada através de medida bidimensional com paquímetro, no início do tratamento, isto é, antes do 1º ciclo de QT e após o 4º ciclo, calculando-se o volume tumoral e comparando as medidas antes e após os quatro ciclos quimioterápicos. A resposta tumoral foi assim classificada:

**QUADRO 3 – Resposta Tumoral a Quimioterapia**

<b>Resposta completa (RC)</b>	<b>Desaparecimento clínico completo do tumor</b>
<b>Resposta parcial (RP)</b>	Redução clínica de 50% ou mais no tamanho do tumor inicial
<b>Sem resposta (SR)</b>	Redução clínica menor que 50% do tumor ou aumento menor que 25% do tumor inicial
<b>Progressão (PRO)</b>	Aumento igual ou maior que 25% do tumor inicial ou aparecimento de nova lesão mamária.

**Fonte:** PEREIRA (2010).

- Resposta satisfatória à quimioterapia: os tumores que apresentaram resposta completa ou resposta parcial, considerados tumores responsivos.
- Resposta insatisfatória à quimioterapia: os tumores que não responderam ou progrediram, os não responsivos.

### 3.9. MÉTODO ESTATÍSTICO UTILIZADO

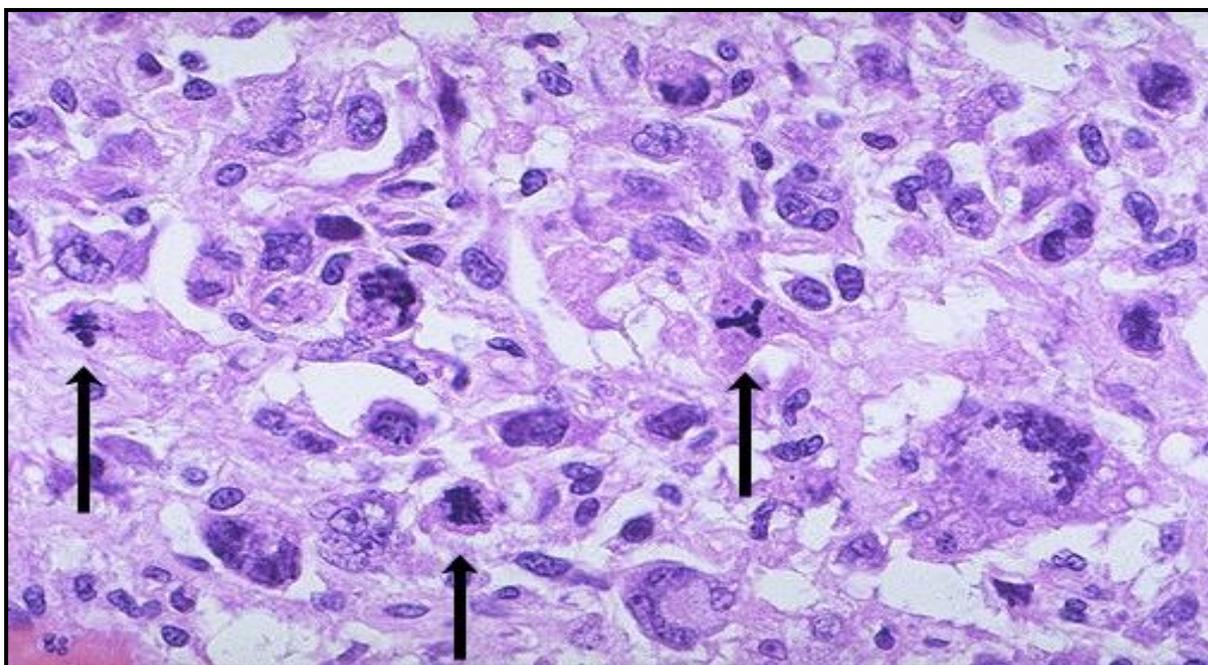
Os resultados obtidos pela técnica de imunohistoquímica e FISH foram analisados entre si, e avaliados quanto à existência de associação dos mesmos com a resposta à quimioterapia neoadjuvante. A análise estatística usada foi através do programa estatístico BioEstat® versão 5.0, utilizando-se o teste Qui-quadrado ( $\chi^2$ ). Foram considerados estatisticamente significativos, valores de  $p < 0,05$  (AYRES, 2007).

## 4 RESULTADOS

---

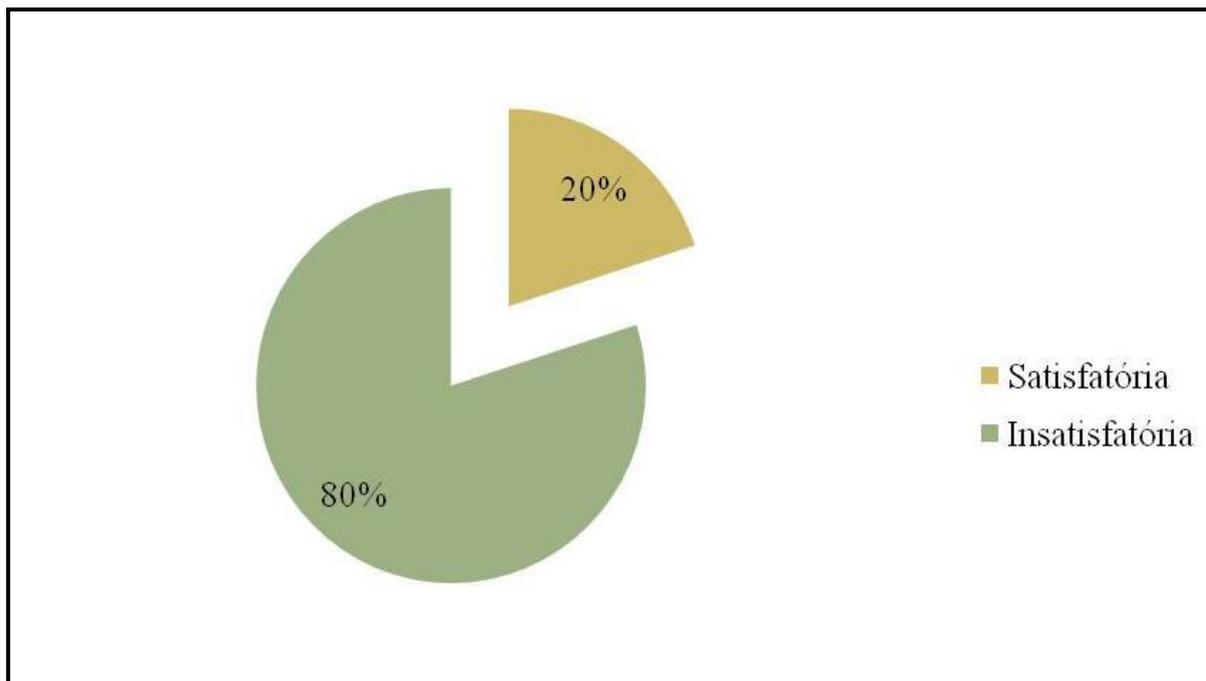
### 4.1. GRAU HISTOLÓGICO

Em relação ao grau histológico do banco de dados, 3 casos são de carcinoma ductal invasivo grau 1, 42 casos são grau 2 e 5 casos são grau 3. Dos tumores indiferenciados (G3) (Figura 8) em 80% dos casos a resposta à quimioterapia foi insatisfatória, concordando com a literatura, onde estes tumores apresentam uma maior agressividade (CIANFROCCA; GOLDDESTEIN, 2004) (Figura 7).



**FIGURA 8** – Corte Histológico de Carcinoma Ductal Infiltrativo Mamário G3.

**Fonte:** Serviço de Patologia do Hospital Ophir Loyola, 2010.



**FIGURA 9** – Percentual do G3 em Relação à Resposta da Quimioterapia.

Fonte: PEREIRA (2010).

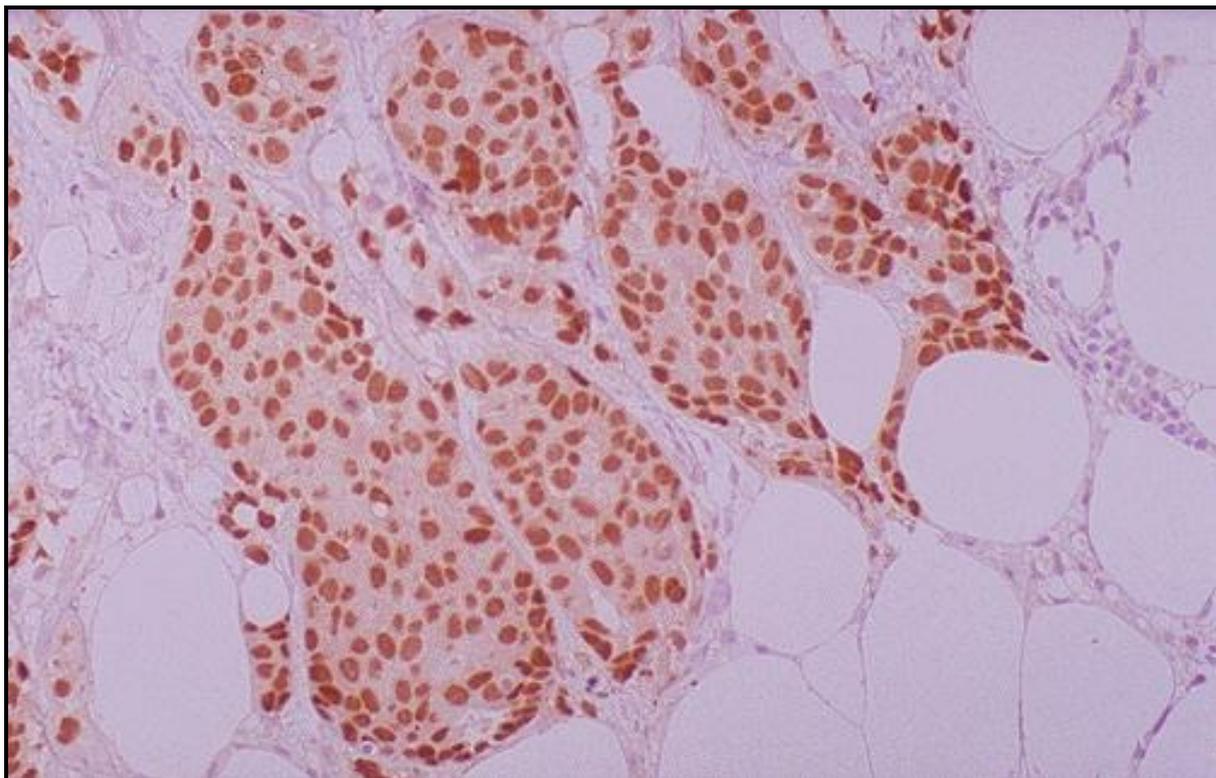
#### 4.2 RECEPTORES HORMONAIIS

Foram realizados estudos imunohistoquímicos para avaliar resposta aos receptores hormonais. Nas pacientes estudadas foram achados 28 casos com expressão positiva para receptores de estrogênio e em 22, a expressão encontrava-se negativa. Nas amostras, detectou-se positividade em 28 casos na expressão do receptor de progesterona e 22 casos expressão negativas (Figura 10 e 11, respectivamente) e (Tabela 1).

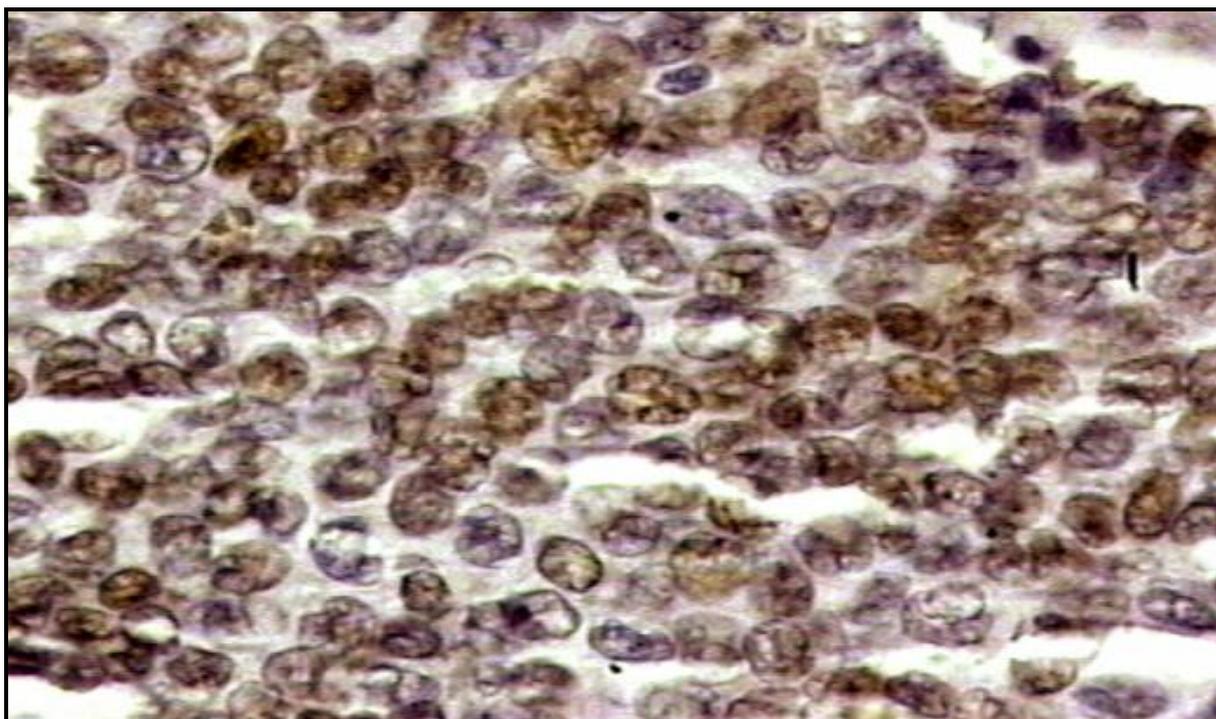
**TABELA 1** - Expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais

Receptores Hormonais	Positivo	Negativo	Total
Estrogênio	28	22	50
Progesterona	28	22	50

Fonte: PEREIRA (2010).



**FIGURA 10** – Corte Histológico de Tumor Mamário com Receptor de Estrogênio Positivo.  
**Fonte:** Serviço de Patologia do Hospital Ophir Loyola, 2010.



**FIGURA 11** – Corte Histológico de Tumor Mamário com Receptor de Progesterona Positivo.  
**Fonte:** Serviço de Patologia do Hospital Ophir Loyola, 2010.

A análise estatística para a comparação das frequências da variável RE (receptor de estrogênio) nas respostas tumorais insatisfatórias teve como amostra 25 pacientes. O p-valor foi de 0,8415 e o nível de significância usado foi  $\alpha=0,05$ . E na análise da mesma variável nas respostas satisfatórias tumorais, o tamanho da amostra foi de 25 pacientes, o p-valor foi de 0,1615 e o nível de significância foi de  $\alpha=0,05$ .

A partir da estatística utilizada podemos inferir que as frequências observadas para os casos de resposta insatisfatória e satisfatória à quimioterapia não apresentaram diferenças estatisticamente significativas em relação aos receptores de estrogênio ao nível de significância de 5% conforme resultados das tabelas 2 e 3, respectivamente.

#### 4.5 HER-2

A expressão da proteína do gene HER-2, 4 pacientes apresentam escore negativo, 27 apresentam escore 1+, 8 pacientes apresentam escore 2+ e 10 pacientes com escore 3+ (Figura 12).

**TABELA 2** – Escores dos tumores mamários do gene *HER-2* correlacionados com as respostas à quimioterapia

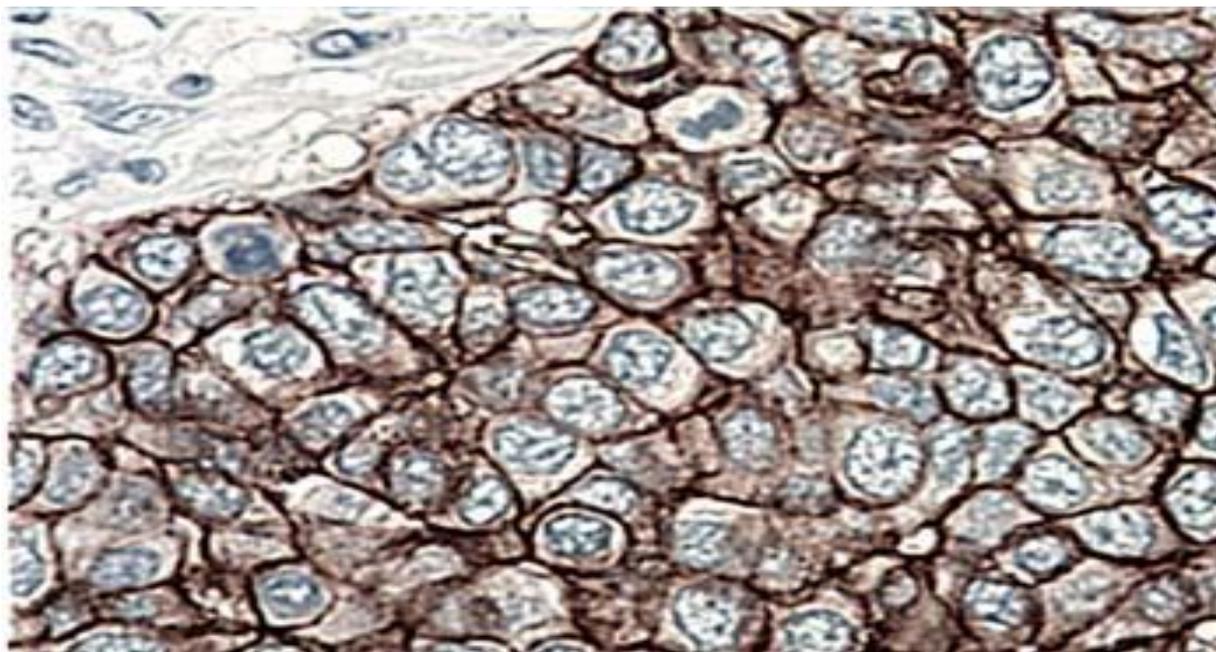
<b>Her-2</b>	<b>Nº Pacientes (Satisfatória)</b>	<b>Nº Pacientes (Insatisfatória)</b>
Escore zero	2	2
Escore 1+	15	12
Escore 2+	3	5
Escore 3+	5	6

Fonte: PEREIRA (2010).

**TABELA 3** – Expressão imuno-histoquímica de receptor de estrogênio em relação ao escore imunohistoquímico da proteína do gene *HER-2*

<b>Escore HER-2</b>	<b>RE Positivo</b>	<b>RE Negativo</b>
0 (negativo)	2	2
1 + (negativo)	17	10
2 + (inconclusivo)	5	3
3 + (positivo)	4	7

Fonte: PEREIRA (2010).



**FIGURA 12** – Corte Histológico de Tumor Mamário com Gene *HER-2*, Escore 3 +.  
**Fonte:** Serviço de Patologia do Hospital Ophir Loyola, 2010.

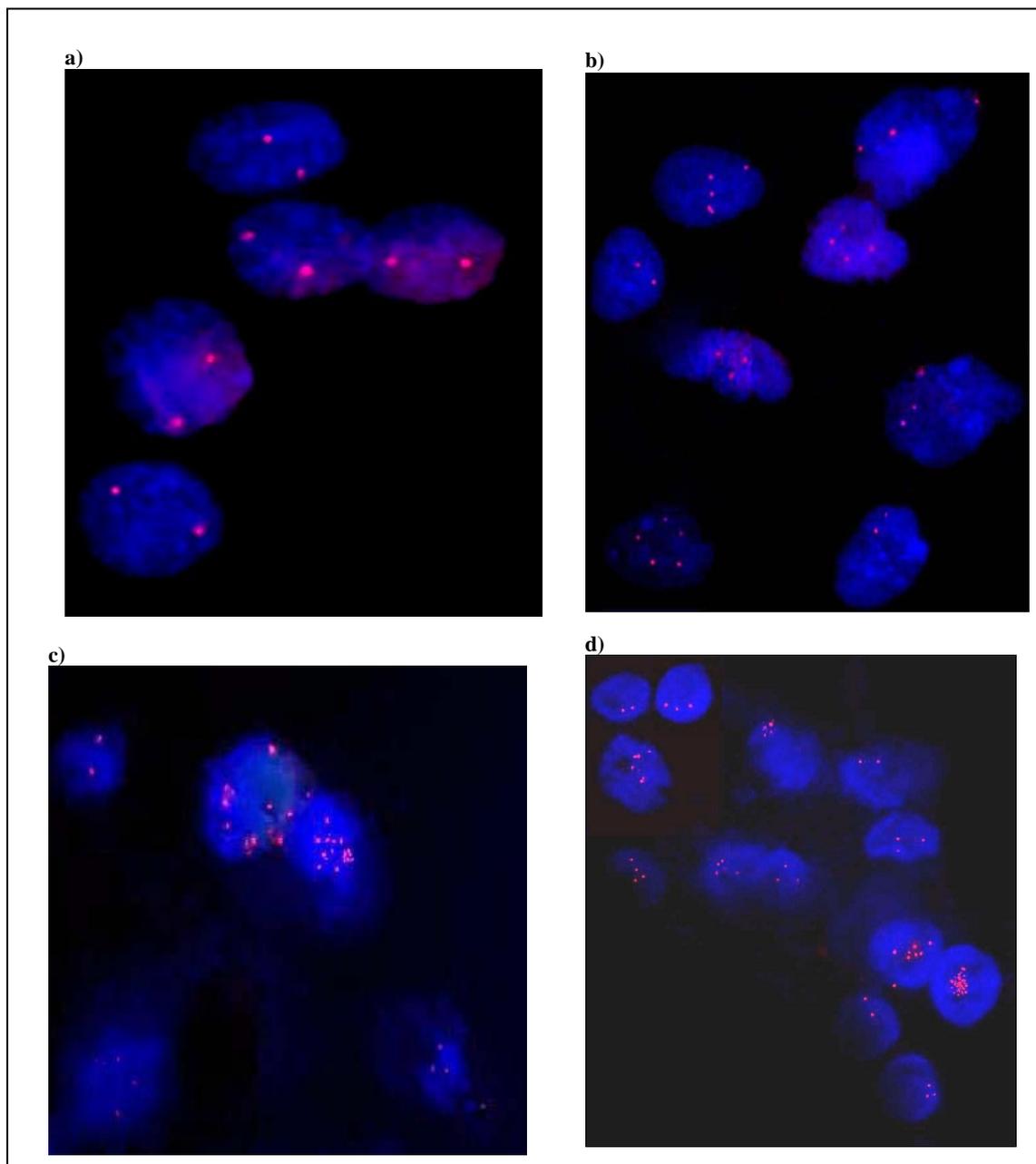
A análise estatística comparando a variável *HER-2* com as respostas insatisfatórias tumorais usou o teste Qui-quadrado. O tamanho da amostra foi de 20 pacientes. O p-valor foi de  $<0,0736$ , e o nível de significância usado foi  $\alpha=0,05$ . Este mesmo teste foi usado na comparação da variável *HER-2* com as respostas satisfatórias tumorais. Nesta análise o tamanho da amostra foi de 22 pacientes, o p-valor foi de  $<0,0105$  e o nível de significância foi de  $\alpha=0,05$ .

A partir da estatística utilizada podemos inferir que as frequências observadas para os casos de resposta insatisfatória à quimioterapia não apresentaram diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o escore do gene *HER-2* com resultados positivos e negativos ao nível de significância de 5% conforme resultados da tabela 6. Em relação à resposta satisfatória encontramos diferenças estatisticamente significativas quando comparadas com o escore do gene *HER-2* com resultados positivos e negativos ao nível de significância de 5% conforme resultados da tabela 7, ou seja, correspondendo ao encontrados na literatura onde tumores com menor agressividade estão relacionados a expressão do gene *HER-2* negativa. Nesta análise estatística, foram excluídas as respostas 2+ do *HER-2* por serem resultados inconclusivos.

#### 4.6 *C-MYC*

A pesquisa do oncogene *C-MYC* foi realizada com auxílio de estudo imunohistoquímico e pela técnica de FISH. Das 50 pacientes pesquisadas, os resultados do *C-MYC* pelo estudo imunohistoquímico, em 11 amostras o resultado foi inconclusivo; em 19 destas amostras, obtivemos resultado positivo, sendo que em 3 esta positividade ocorreu em apenas 10 % das células, e em 20 pacientes houve negatividade ao estudo.

Em relação à técnica de FISH, os resultados foram bastante conclusivos, se obteve sucesso na hibridação da sonda do gene *MYC* nos 50 casos estudados. Em todos os casos houve aumento do número de alelos desse gene (Apêndice C). Sendo que nas pacientes que tiveram resposta satisfatória à terapia, somente 0,5 a 5,5% das células tumorais apresentaram alta amplificação (mais de 10 alelos do gene *MYC* por núcleo interfásico) (Tabela 8). Cabe observar que neste grupo de pacientes, que responderam favoravelmente à terapia, o nível mais alto (5,5% das células) de amplificação correspondeu a uma paciente que apresentou metástase óssea no seguimento clínico. A maioria das pacientes apresentaram núcleos com 2 a 6 alelos (Figura 14). Por outro lado, as pacientes que responderam insatisfatoriamente à terapia apresentaram níveis de amplificação do gene *MYC* em 04 e 13,5% das células tumorais (Figuras 15 e 16). Novamente, os níveis mais altos de amplificação foram observados nas pacientes que apresentaram metástase óssea (13,5%), do Sistema Nervoso Central (12,5%), e concomitantemente, óssea e pulmonar (13%).



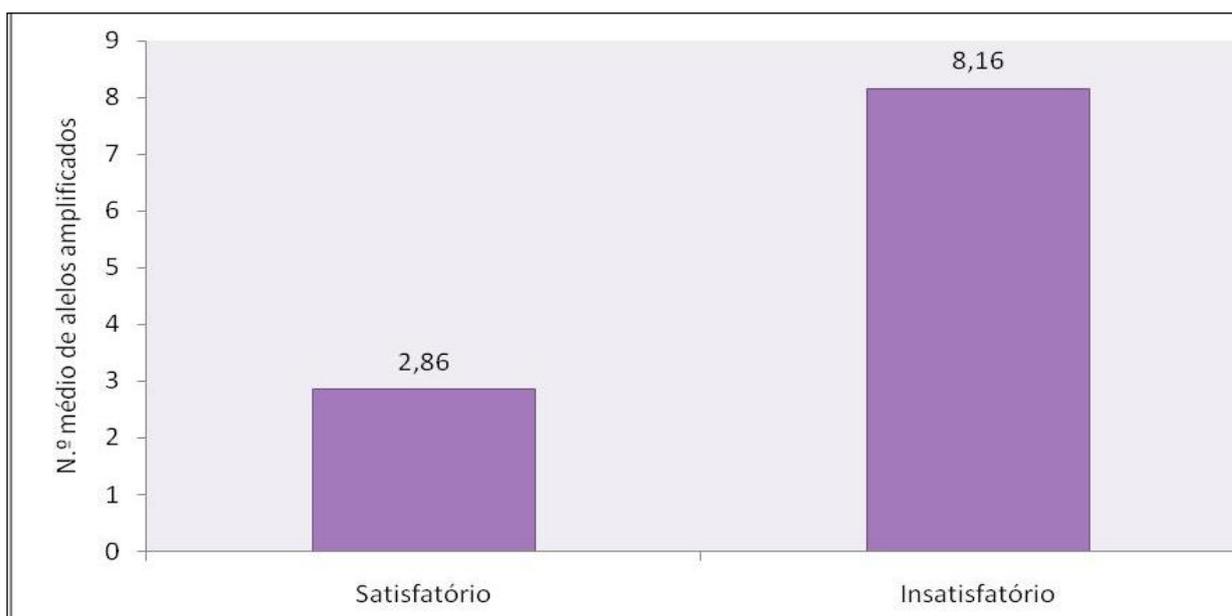
**FIGURA 13** – Amplificações Gênicas de *C-MYC*, pelo Método de FISH.

a) Controle negativo;

b) Resposta satisfatória a quimioterapia

c; d) Resposta insatisfatória a quimioterapia

**Fonte:** Serviço de Patologia do Hospital Ophir Loyola, 2010.



**FIGURA 14** – Comparação das Médias de Amplificação dos Alelos do *C-MYC*

Fonte: PEREIRA (2010).

A partir da análise de variância (ANOVA) aplicada aos dados da alta amplificação do gene *C-MYC* em relação às respostas à quimioterapia comparando-se as médias dos grupos estudados podemos inferir ao nível de significância de 5% a existência de diferenças altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre as médias dos respostas conforme a Figura 14.

#### 4.7 RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA

A resposta à quimioterapia foi avaliada através da análise clínica do tumor após o 4º ciclo de Adriamicina e Ciclofosfamida, medida esta, feita através de paquímetro. Neste estudo selecionamos 50 pacientes, das quais 25 responderam satisfatoriamente ao quimioterápico e 25 de maneira insatisfatória. Observamos que dentre as respostas satisfatórias, em 3 casos houve resposta clínica completa, regressão total do tumor. Nos casos de resposta insatisfatória, houve uma paciente que apresentou progressão tumoral mesmo sob regime terapêutico sistêmico.

## 5 DISCUSSÃO

---

Nas últimas décadas, os estudos tem se voltado para a compreensão dos mecanismos genéticos, que determinam a iniciação, promoção e progressão tumoral.

O desenvolvimento de um câncer geralmente requer várias etapas, sendo que cada uma delas é governada por múltiplos fatores, alguns dependem da constituição genética de cada indivíduo, outros dependem do ambiente onde ele vive e do respectivo estilo de vida. Independentemente das circunstâncias específicas, considera-se que há uma incidência de câncer básica que não pode ser reduzida: as mutações não podem ser totalmente evitadas, pois elas são consequência inescapável das limitações naturais da precisão da replicação do DNA. Se um ser humano viver tempo suficiente, é inevitável que ao menos uma de suas células chegue ao ponto de acumular um conjunto de mutações para desenvolver um câncer. (ALBERT et al., 2010).

O câncer mamário é a ocorrência maligna mais comum das mulheres, sendo responsável por 500.000 mortes por ano em todo o mundo. Apesar da crescente incidência desta doença, as taxas de sobrevivência têm aumentado nos anos recentes em muitos países, devido uma tendência na detecção precoce, em conjunto com o uso de terapias sistêmicas (LONNING, 2007). No Brasil, o INCA prevê 49.240 novos casos de câncer mamário para o ano de 2010, tornando-se alvo de estudos também no nosso país, devido sua grande morbidade e mortalidade (GUERRA et al., 2009; INCA, 2010).

Neste estudo, as pacientes incluídas apresentavam tipo histológico ductal invasivo, que foi selecionado por ser o tipo histológico de maior frequência, correspondendo a 70% dos tumores mamários malignos, juntamente com o lobular (BARROS; BUZAID, 2007; BOFF; WISINTAINER, 2006). A caracterização na escolha do tipo histológico, também foi importante para excluir aqueles tipos histológicos mais raros e com prognósticos mais favoráveis como os tumores com tipo histológico: tubular, mucinoso, secretor, adenóide cístico (BARROS; BUZAID, 2007; CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004).

Nosso estudo comparou resposta ao tratamento quimioterápico neoadjuvante, correlacionando com os genes *HER-2*, *C-MYC* e receptores hormonais, avaliando o comportamento destes genes nos grupos de resposta quimioterápica satisfatória e nos com resposta insatisfatória.

O número de amostras selecionadas foi reduzido, totalizando 50 casos, isto ocorreu devido às características das pacientes analisadas serem bem determinadas, onde todas

apresentavam tumores de origem epitelial e com mesmo tipo histológico (ductal invasivo), mesmo estadiamento clínico TNM (Estadiamento III), e que receberam o mesmo esquema terapêutico neoadjuvante.

O tratamento quimioterápico neoadjuvante, faz parte de uma estratégia multidisciplinar que combina tratamento sistêmico, radioterápico e cirúrgico (BARROS; BUZAID, 2007). Os estudos anteriores já estabilizaram claramente que a terapia neoadjuvante causa regressão tumoral do tumor primário de câncer mamário (BARROS FILHO et al., 2010; MAKRIS et al., 1997). As pacientes foram divididas em responsivas e não responsivas a esta terapia neoadjuvante; em todas as pacientes o objetivo foi que houvesse redução tumoral, proporcionar uma terapia cirúrgica conservadora, melhorar o controle locorregional e a sobrevida global. Estes benefícios são bem elucidados em vários trabalhos e publicados (FISHER et al., 1997; MAKRIS et al, 1997; SMITH et al, 2002). As pacientes que obtiveram uma maior vantagem na sobrevida global, foram aquelas que tiveram uma melhor resposta e redução tumoral na quimioterapia adjuvante, concordando com outros estudos (MARZIONA et al, 2009; SMITH et al, 2002).

A incidência de câncer mamário aumenta com a idade, e nos EUA, 77% das mulheres com este câncer têm 50 anos ou mais. Em uma análise da população feminina brasileira, a idade média de diagnóstico foi de 54,5 anos com idade mínima de 33 anos e máxima de 81 anos, sendo que o maior percentual foi encontrado entre 51 a 60 anos (36,25%). Em outro estudo desenvolvido por Zago e colaboradores em 2005, o diagnóstico mostrou maior prevalência entre 41 a 60 anos, sendo esta faixa etária correspondendo a 65% da população estudada (VIANA; MONTANHA, 2010) A idade das pacientes incluídas em nosso trabalho variou entre 31 e 78 anos, com média de 45,76 anos concordando com achados da literatura. Das pacientes estudadas, 4% apresentaram idades abaixo de 35 anos, este achado corresponde a literatura onde de 2 a 5% dos tumores surgem antes dos 35 anos, enquanto a maioria dos carcinomas ocorre após a menopausa (FOXCROFT et al., 2004).

A resposta positiva, na expressão de receptores hormonais encontrada nas pacientes, totalizou 28 casos, que correspondendo a 56%, um pouco abaixo do encontrado na literatura, que varia de 70 a 80% de incidência nos tumores invasivos (CLEATOR et al., 2009). E a expressão dos receptores hormonais não apresentou correlação com as respostas à quimioterapia, tanto nos tumores responsivos, como nos não responsivos a mesma. Estes biomarcadores são fatores de predição já bem estabelecidos ao uso de hormonioterapia, tanto na pré como na pós-menopausa e com *status* positivo para receptores hormonais (KEATING; JARVIS, 2002).

O resultado da expressão do gene *HER-2* apresentou em mais da metade dos casos analisados, escore negativo, o que corresponde ao esperado pela literatura, que observa a presença da expressão positiva de *HER-2* em 25 a 30% dos tumores mamários malignos (PRESS et al., 2005). Este gene se apresentou como um bom marcador de predição à resposta quimioterápica nas pacientes que apresentaram tumores responsivos à quimioterapia, nestes casos houve uma menor expressão do gene *HER-2*. A literatura correlaciona tumores com expressão de *HER-2* com fenótipo tumoral mais agressivo: alto grau histológico, aumento na atividade mitótica, invasão, níveis baixos de receptores hormonais e um pior prognóstico (BACCHI, 2001; OLAYIONE et al., 2000; SLAMON et al., 1987).

Neste estudo, observamos que a expressão do proto-oncogene *C-MYC* foi um importante marcador preditivo para a resposta à quimioterapia neoadjuvante, onde a sua alta amplificação ocorreu nos casos de resposta insatisfatória à terapia sistêmica. Este achado requer trabalhos futuros com um número maior de casos, porém abre um caminho para novas perspectivas de este biomarcador ser usado previamente a toda terapia neoadjuvante, no intuito de prever aquelas pacientes que irão se beneficiar do esquema terapêutico padrão e aquelas que não terão boa resposta. A avaliação feita antes do início do tratamento poderia indicar um esquema quimioterápico de 2º linha naquelas com alta amplificação do *C-MYC*, impedindo que as mesmas passem por um tratamento ineficaz.

## 6 CONCLUSÃO

---

Este estudo permitiu concluir que os genes de receptores hormonais, *HER-2* e *C-MYC* como fatores preditivos de resposta à quimioterapia:

- 1 - A expressão dos receptores hormonais não se mostrou como um bom marcador preditivo eficaz para avaliação de respostas à quimioterapia neoadjuvante.
- 2 - A expressão do gene *HER-2* mostrou-se um bom marcador de predição a resposta quimioterápica, nos casos de tumores responsivos, com a técnica usada, não podendo isoladamente ser utilizado para esta avaliação.
- 3 - A expressão do gene *C-MYC* mostrou-se um marcador satisfatório de predição à resposta quimioterápica, quando analisado pelo método de FISH, mesmo de forma isolada.
- 4 - FISH é uma técnica mais sensível a detecção do gene *C-MYC* quando comparada a imunohistoquímica.

## REFERÊNCIAS

- ALBERT B., JOHNSON A., LEWIS J., RAFF M., ROBERT K., WALTER P. **Biologia Molecular da Célula**. Porto Alegre: ARTMED, 2010. Cap. 20, p. 1205-1268.
- AMADORI, D.; PACINI, P.; GIUNCHI, D. C.; MALTONI, R. Quadro clínico e tratamento do carcinoma de mama localmente avançado e do carcinoma inflamatório. In: VERONESI, U. **Mastologia oncológica**. Rio de Janeiro: Medsi, 2002, p. 449-63.
- AMARAL, P.; MIGUEL, R.; MEHDAD, A.; CRUZ, C.; GRILLO MONTEIRO, I.; CAMILO, M.; RAVASCO, P. Body fat and poor diet in breast cancer women. **Nutr. Hosp.**, v. 25, n. 3, p. 456-461. Set. 2010.
- ANDRÉ, S.; TOMÁS, A. N.; FONSECA, R. Carcinoma da mama: Determinação da amplificação do *HER2* por Hibridização *in situ* de Fluorescência (FISH). **Acta Med Port.** v.18, p. 417-422. 2005.
- ARIAS, V., MAZZA, P. L.; FUNKE, M. A. A.; Processamento tecidual para análise imunohistoquímica de receptores hormonais em carcinoma mamário: dois momentos em um laboratório de anatomia patológica; correlação dos resultados com método bioquímico. **J. Bras. Med. Lab.**, v.39, n. 3, p.223-228. 2003.
- ATTAM, A.; KAUR, N.; SAHA, S.; BHARGAWA, S. K. Mammographic density as a risk factor for breast cancer in a low risk population. **Indian J Cancer.**, v. 45, n. 2, p. 50-53, Apr./Jun. 2008.
- AYRES, M.; AYRES JR, M.; AYRES, D. L.; SANTOS A. S. **BioEstat 5.0. aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. 2007. Disponível em: <<http://euler.mat.ufrgs.br/~giacomo/Manuais-softw/Manual-BioEstat.pdf>>. Acesso em 26 set. 2010.
- BAAK, J. P. A.; HERMSEN, M. A. J. A.; MEIJER, G.; SCHMIDT, J.; JANSSEN, E. A. M. Genomics and proteomics in cancer. **European Journal of Cancer.** v. 39, p. 1199-1215.
- BARNES, D. M.; MILLIS, R. R.; GILLET, C. E.; RYDER, K.; SKILTON, D.; FERTIMAN, I. S.; RUBENS, R. D. The interaction of oestrogen receptor status and pathological features with adjuvant treatment in relation to survival in patients with operable breast cancer: a retrospective study of 2660 patients. **Endocrine- Related Cancer.**, v. 11, p. 85-96. 2004.
- BARRETO, M. C.; PETRELLI, A. S. C.; DJAHJAH, M. C. R.; KOCH, H. A. Câncer de mama em mulheres até 40 anos: aspectos radiológicos, clínicos e anatomopatológicos. **Rev. Imagem.**, v. 28, n. 1, p. 1-6. 2006.
- BARROS A. C. S. D.; BUZAID A. C. Fatores Prognósticos e Preditivos de Resposta. In: **Câncer de mama: Tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Dentrix Edição e Design, 2007. Cap. 4, p. 43-60.
- BARROS, A. C. S. D.; BUZAID, A. C. Estadiamento do Câncer de Mama. In: **CÂNCER de mama: tratamento multidisciplinar**. São Paulo: Dentrix Edição e Design, 2007.

BARROS FILHO, M. C.; KATAYAMA, M. L. H.; BRENTANI, H.; ABREU, A. P. S.; BARBOSA, E. M.; OLIVEIRA, C. T.; GÓES, J. C. S.; BRENTANI, M. M.; FOLGUEIRA, M. A. A. K. Gene trio signatures as molecular to predict response to doxorubicin cyclophosphamide neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v. 43, p. 1225-1231, 2010.

BLAND, K. I.; COPELAND, E. M. **La Mama, manejo multidisciplinarios de las enfermedades benignas y malignas**. Buenos Aires: Médica Panamericana, 2000. Cap. 13, p. 290-300.

BLOOM, H.; RICHARDSON, W. Histopathological grading and prognosis in breast cancer. A study of 1,409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Br. J. Canc.**, v 11, p. 359-77. 1957.

BOFF, R. A.; WISINTAINER, F. **Mastologia Moderna: abordagem multidisciplinar**. Caxias do Sul: Mesa Redonda, 2006. Cap. 15, p. 181-192.

BRIDGER, J. M.; KILL, I. R.; LICHTER, P. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. **Chromosome Res.**, v. 6, n. 1, p. 13-24, Jan. 1998.

CALCAGNO, D. Q.; LEAL, M. F.; ASSUMPCAO, P. P.; SMITH, M. A.; BURBANO, R. R. *MYC* and gastric adenocarcinoma carcinogenesis. **World J Gastroenterol.**, v. 14, n. 39, p. 5962-8, Oct. 2008.

CARVALHO, S. M. T.; MOURÃO NETTO, M.; LIMA, E. N. P.; PIMENTEL, A. M.; MAKAISSI, F. B.; OSÓRIO, C. A. B. T.; MACIEL, M. S.; IYAYASU, H.; COLLINS, J. B.; FONTES, C. M.; PEREIRA, A. L.; SOARES, F. A. Sentinel Node biopsy in breast cancer: results in a large series. **Bras J Med Biol Res.**, v. 43, n.6, p. 593-599, 2010.

CHIAO, P. J.; BISCHOFF, F. Z.; STRONG, L. C.; TAINSKY, M. A. The current state of oncogenes and cancer: experimental approacher for analyzing oncogenetic events in human cancer. **Cancer Metastasis Rev.**, v. 9, n. 1, p. 63-80, 1990.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **The Oncologist.**, v. 9, n. 6, p. 606-616, 2004.

CORZO, C.; COROMINAS, J. M.; TUSQUETS, I.; SALIDO, M.; BELLET, M.; FABREGAT, X.; SERRANO, S.; SOLÉ, F. The *MYC* oncogene in breast cancer progression: from benign epithelium to invasive carcinoma. **Cancer Genet Cytogenet.**, v. 165, n. 2, p. 151-156, Mar. 2006.

DANG, C. V. *C-Myc* target genes involved in cell growth, apoptosis, and metabolism. **Mol Cell Biol.**, v. 19, n. 1, p. 1-11, jan. 1999.

DEMING, S. L.; NASS, S. J.; DICKSON, R. B.; TROCK, B. J. *C-myc* amplification in breast cancer: a meta-analysis of its occurrence and prognostic relevance. **British Journal of Cancer**. v. 83, n. 12, p. 1688-1695, Ago, 2000.

DOUGLAS, J. A.; ROY-GAGNON, M. H.; ZHOU, C.; MITCHELE, B. D.; SCHULDINER, A. R.; CHAN, H. P.; HELVIE, M. A. Mammographic Breast Density- Evidence for genetic Correlations with Established Breast Cancer Risk. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.** v. 17, n. 12, p. 3509-3516, Dec. 2008.

DUFFY, M. J. Predictive Markers in Breast and Other Cancers: a review. **Cli Chem.**, v. 51, n. 3, p. 494-503, Mar. 2005.

EFSTRATIADIS, A.; SZABOLCS, M.; KLINAKIS, A. Notch, Myc and Breast Cancer. **Cell Cycle**. v. 6, n. 4, p. 418-429, Feb. 2007.

ELSTON, C.; ELLIS, I. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. **Histopathol.** v. 19, n. 5, p. 403-10, Nov. 1991.

ESCOT, C.; THEILLET, C.; LIDEREAU, R.; SPYRATOS, F.; CHAMPEME, M-H.; GEST, J.; CALLAHAN, R. Genetic alteration of *c-myc* protooncogene (*MYC*) in human primary breast carcinomas. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v. 83, p. 4834-4838, Jul. 1986.

FARIA, M. H. G.; RABENHORST, S. H. B. Impacto do oncogene *C-MYC* no câncer. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 52, n. 2, p. 165-171, abr.-jun. 2006

FISHER, B.; BROWN, A.; MAMOUNAS, E.; WIEAND, S.; RABIDOUX, A.; MARGOLESE, R. G.; CRUZ, A. B.; FISHER, E. R.; WICKERHAM, D. L.; WOLMARK, N.; DECILLIS, A.; HOEHN, J. L.; LEES, A. W.; DIMITROV, N. V. Effect of Preoperative Chemotherapy on Local-Regional Disease in Women With Operable Breast Cancer: Findings From National Surgical Adjuvant Breast and Bowel Project B-18. **J Clin Oncol.** v. 15, n. 7, p. 2483-2493, Jul. 1997.

FONSECA D. M.; SILVA E. C. F.; RAIOL L. C. C. Análise das aberrações numéricas do gene *c-Myc* e da expressão protéica do *c-myc* em adenocarcinoma gástrico precoce em pacientes atendidas no Hospital Universitário João de Barros Barreto.

FOXCROFT, L. M.; EVANS, E. B.; PORTER, A. J. The diagnosis of breast cancer in women younger than 40. **Breast.**; v. 13, n. 4, p. 297-306. Aug. 2004

FUCHS, C. S.; STAMPFER, M. J.; COLDITZ, G. A.; GIOVANNUCCI, E. L.; MANSON, J. E.; KAWACHI, I.; HUNTER, D. J.; HANKINSON, S. E.; HENNEKENS, C. H.; ROSNER, B. Alcohol consumption and mortality among women. **N Engl J Med.** v. 332, n. 19, p. 1245:1250, May. 1995.

GERDES, J.; SCHWAB, U.; LEMKE, H.; STEIN, H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. **Int J Cancer.**, v. 31, n. 1, p. 13-20, Jan. 1983.

GRISHAM, J. W. Interspecies comparison of liver carcinogenesis implications for cancer risk assessment. **Carcinogenesis.** v. 18, n. 1, p. 59-81, Jan. 1996.

GUARNERI, V.; PIANCETINI, F.; FICARRA, G.; FRANSSOLDATI, A.; D'AMICO, R.; GIOVANNELLI, S.; MAIORANA, A.; JOVIC, G.; CONTE, P. A prognostic model based on nodal status and Ki-67 predicts risk of recurrence and death in breast cancer patients with residual disease after preoperative chemotherapy. **Ann Oncol.**, v. 20, n. 7, p. 1193-1198, Jul. 2009.

GUERRA, M. R.; MENDONÇA, G. A. S.; BUSTAMANTE-TEIXEIRA, M. T.; CINTRA, J. R. D.; DE CARVALHO, L. M.; DE MAGALHÃES, L. M. P. V. Sobrevida de cinco anos e

fatores prognósticos em coorte de pacientes com câncer de mama assistidas em Juiz de Fora, Minas Gerais, Brasil. **Cad. Saúde Pública**. v. 25, n. 11, p. 2455-2466, 2009.

HARRIS, L.; FRITSCHER, H.; MENNEL, R. et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. **J Clin Oncol**. v. 25, p. 5287-5312, 2007.

HATAKE, K.; TOKUDOME, N.; ITO, Y. Transtuzamab Treatment for Breast Cancer. Symposium II (DOI: 10.2169/internacionalmedicine.46.1783).

HENRIKSSON, M.; VITA, M. The Myc oncoprotein as a therapeutic target for human cancer. **Sem Cancer Biol.**, v. 16, p. 318-33, 2006.

HERYNK, M. H.; FUQUA, S. A. W. Estrogen Receptor Mutation in Human Disease. **Endocrino Reviews**. v. 25, n. 6, p. 869-898, 2004.

HOWELL, A; CUZICK, J. Risk factors. Introducion to Session 1. **Breast Cancer Research**.v. 11, n. 3, p. 1-2, Dez. 2009.

HSU, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. Use of avidin-biotin-peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **Histochem Cytochem**. v. 29, p. 577-580, 2003.

HULKA, B. S.; MOORMAN, P. G. Breast cancer: hormones and other risk factors. **Maturitas**, v. 38, p. 103-106. 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Atlas de mortalidade por câncer**. Disponível em: <<http://mortalidade.inca.gov.br/prepararModelo03.action>>. Acesso em: 25 mar. 2010.

INSTITUTO NACIONAL DE CANCER. **Estimativa 2010**. Neoplasia maligna da próstata, neoplasia maligna da mama feminina. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=mapa.asp&ID=13>>. Acesso em: 12 de abr. 2010.

JAMES, C. R.; QUINN, J. E.; MULLAN, P. B.; JOHNSTON, P. G.; HARKIN, D. P. BRCA 1, a Potencial Preditive Biomarker in the Treatment of Breast Cancer. **The Oncologist.**, v.12, p. 142-150. 2007.

KOHL, N. E.; KANDA, N.; SCHRECK, R. R.; BRUNS, G.; LATT, A. S., GILBERT, F. ALT, F. W. Transposition and amplification of oncogene-related sequences in human neuroblastomas. **Cell.**, v. 35, p. 359-367. 1983.

KUO, P. C.; TSAO, Y. P.; CHANG, H. W.; CHEN, P. H.; HUANG, C. W.; LIN, S. T.; WENG, Y. T. Breast Cancer Amplified Sequence 2, a Novel Negative Regulator of the p53 Tumor Suppressor. **Cancer Research.**, v. 1, n. 69, p. 8877. 2009.

LAW, Y. M.; QUEK, S. T.; TAN, P. H.; WONG, S. L. J. Adenoid Cystic Carcinoma of the breast. **Singapore Med J.**, v. 50, n. 1, p. 8-11. 2009.

LAWRENCE-FOX, J.; HSU, P. H.; LEGATOR, M. S.; MORRISON, L. E.; SEELIG, S. A. Fluorescence in Situ Hybridization: powerful molecular toll for cancer prognosis. **Clin Chem.**, v. 41, p. 1554-1559. 1995.

LEE, J. K.; PARK, S.; PARK, H. S.; PARK, B. W. Clinicopathological features of infiltrating lobular carcinomas comparing with infiltrating ductal carcinomas: a case control study. **World J Oncol.**, v. 8, n. 34, p.1-8. 2010.

LEVENS, D. Disentangling the MYC web. **Proc Natl Acad Sci USA.**, v. 99, p. 5757-5759. 2002.

LIAO, D. J.; DICKSON, R. B. *C-Myc* in breast cancer. **Endocrine-Related Cancer.** v. 7, p. 143-164. 2000.

LIMA, S. M. R.; BOTOGOSKI, S. R. **Menopausa**: o que você precisa saber - Abordagem prática e atual do período do climatério. São Paulo: Editora Atheneu, 2009.

LONNING, P. E. Breast cancer prognostication and prediction: are we making progress? **Ann Oncol.**, v. 18, viii3-7, Sept. 2007. Suppl 8.

LOPEZ, J. K.; BASSETT, L. W.; Invasive Lobular Carcinoma of the Breast Spectrum of Mammographic, US and MR Imaging Findings. **RadioGraphics.**, v. 29, p. 165-176. 2009.

MacCALLUM, D. E, HALL, P. A. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. **J Pathol.**, v. 190, n. 5, p. 537-44, Apr. 2000.

MAKRIS, A.; POWLES, T. J.; DOWSETT, M.; OSBORNE, C. K.; TROTT, P. A.; FERNANDO, I. N.; ASHLEY, S. E.; ORMEROD, M. G.; TITLEY, J. C.; GREGORY, R. K.; ALLRED, D. C. Prediction of Response to Neoadjuvant Chemoendocrine Therapy in Primary Breast Carcinomas. **Clinical Cancer Research.**, v. 3, p. 593-600. 1997.

MARINHO V., F., Z., METZE K., SANCHES F., S., F., ROCHA G., F., S., GOBBI H. Marcadores Moleculares Em Câncer de Mama Preditivos de Metástases Axilares. **Rev Assoc Med Bras.**, v. 54, n. 3, p. 203-207. 2008.

MARK, A. F.; TAYLOR, W.; AFIFY, A.; RIERA, D.; RAUSCH, M.; HUTH, A.; GRAY, Y.; SANTORO, K.; BLAND, K. I. Stage I and stage II infiltrating ductal carcinoma of the breast for chromosome 8 copy number using fluorescent in situ hybridization. **Pathobiology.**, v. 65, p. 184-189. 1997.

MARZIONA, F.; VARELLA, A. D.; SCALEIRA, N.; ANTUNES, R. C. P.; MENDES, G. N.; GEBRIM, L. H.; BARROS, A. C. S. D.; SAMPAIO, M. Quimioterapia neoadjuvante com esquema TAC em câncer de mama localmente avançado. Apresentação e discussão de nove casos. **Rev. Bras. Mastol.** v. 19, n. 2, p. 63-69, Abr-Jun, 2009.

McDONNELL, D. P. The Molecular Pharmacology of Estrogen Receptor Modulators: Implication for the Treatment of Breast Cancer. **Clin Cancer Res.**, v. 11, p. 871:877. 2005.

MELKOUMIAN, Z. K.; MARTIROSYAN, A. R.; STROBL, J. S. Myc protein is differentially sensitive to quinidine in tumor versus immortalized breast epithelial cell lines. **Int J Cancer.**, v. 102, p. 60-69. 2002.

MICHELS, K. B.; MOHLLAJEE, A. P.; ROSET-BAHMANYAR, E.; BEEHLER, G. P.; MAYSICH, K. B. Diet and Breast Cancer. A Review of the Prospective Observational Studies. **Cancer.** v. 109, p. 2712-2749. 2007.

- NAGATA, C.; MIZOUE, T.; TANAKA, K.; TSUJI, I.; WAKAI, K.; INOUE, M.; TSUGANE, S. Alcohol Drinking and Breast Cancer Risk: An Evaluation Based on a Systematic Review of Epidemiologic Evidence among the Japanese Population. **Jpn J Clin Oncol.**, v. 37, p. 568-574. 2007.
- NESBIT, C. E.; TERSAK, J. M.; PROCHOWNIK, E. V. MYC oncogenes and human neoplastic disease. **Oncogene.**, v. 18, p. 3004-3016. 1999.
- OLAYIOYE, M. A.; NEVE, R. M.; LANE, H. A.; HYNES, N. E. The erbB signaling network: heterodimerization in development and cancer. **Embo J.**, v. 19, p. 3159-3167. 2000.
- ORVIETO, E.; MAIORANO, E.; BOTTIGLIERI, L.; MAISONNEUVE, P.; ROTMENSZ, N.; GALIMBERTI, V.; LUINI, A.; BRENELLI, F.; GATTI, G.; VIALE, G. Clinicopathologic Characteristics of Invasive Lobular Carcinoma of the Breast- Results of an Analysis of 530 Cases From a Single Institution. **Cancer.**, v. 113, n. 7, p. 1511-1520. 2008.
- PARK, S.; KOO, J.; KIM, J. H.; YAN, W. I.; PARK, B. W.; LEE, K. S. Clinical characteristics of Mucinous Carcinoma of the Breast in Korea: Comparison with Invasive Ductal Carcinoma-Not Otherwise Specified. **J Korean Med Sci.**, v. 25, p. 361-368. 2010.
- PARTRIDGE, A.; ADLOFF, K.; BLOOD, E.; CLAINE, D. E.; KAELIN, C.; GOLSHAN, M.; LIGIBEL, J.; DE MOOR, J. S.; WEEKS, J.; EMMONS, K.; WINER, E. Risk Perception and Psychosocial Outcomes of Women With Ductal Carcinoma In Situ: Longitudinal Results from a Cohort Study. **J Natl Cancer Inst.**, v. 100, p. 243-251. 2008.
- PATEY D.; SCARFF, R. The position of histology in the prognosis of carcinoma of the breast. **Lancet.**, v. 1, p. 801-4. 1928.
- PELENGARIS, S.; KHAN, M.; EVAN, G. *c-MYC*: MORE THAN JUST A MATTER OF LIFE AND DEATH. **Nature Publishing Group.**, v. 2, p. 764. 2002.
- PENAULT-LLORCA, F.; ABRIAL, C.; RAOELFILS, I.; CHOLLET, P.; CAYRE, A.; MOURET-REYNIER, M. A.; THIVAT, E.; MISHPELLANY, F.; GIMBERGUES, P.; DURANDO, X. Changes and Predictive and Prognostic Value of the Mitotic Index, Ki-67, Cyclin D1, and Cyclo-oxygenase-2 in 710 Operable Breast Cancer Patients Treated with Neoadjuvant Chemotherapy. **The Oncologist.**, v. 13, p. 1235-1245. 2008.
- PERSSON H, LEDER P. Nuclear localization and DNA binding properties of a protein expressed by human *c-myc* oncogene. **Science.**, v. 225, p. 718-721, 1984. 1984.
- PINKEL D, STRAUME T, GRAY J.W. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 83, p. 2334-2338. 1986.
- PRESS, M. F.; SAUTER, G.; BERNSTEIN, L.; VILLALOBOS, I. E.; MIRLACHER, M.; ZHOU, J. Y.; WARDEH, R.; LI, Y. T.; GUZMAN, R.; MA, Y.; SULLIVAN-HALLEY, J.; SANTIAGO, A.; PARK, J. M.; RIVA, A.; SLAMON, D. J. Diagnostic evaluation of HER-2 as a molecular target: an assessment of accuracy and reproducibility of laboratory testing in large, prospective, randomized clinical trials. **Clin Cancer Res.**, v. 11, p. 6598-6607. 2005.
- PUSZTAI, L. Current Status of Prognostic Profiling in Breast Cancer. **The Oncologist.**, v. 13, p. 350-360. 2008.

RAVIOLI, A.; BAGLI, L.; ZUCCHINI, A.; MONTI, F. Prognosis and prediction of response in breast cancer: the current role of the main biological markers. **Cell Prof.**, v. 31, p. 113-126. 1998.

RIBOLI, E.; NORAT, T. Epidemiologic evidence of the protective effect of fruit and vegetables on cancer risk. **Am J Clin Nutri.**, v. 78, p. 559-569. 2003.

ROKA, S.; FIEGL, M.; ZOJER, N.; FILIPITS, M.; SCHUSTER, R.; STEINER, R.; JAKESZ, R.; HUBER, H.; DRACH, J. Aneuploidy of chromosome 8 as detected by interphase fluorescence in situ hybridization in a recurrent finding in primary and metastatic breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 48, p. 125-133. 1998.

RONCKERS, C. M.; ERDMANN, C. A.; LAND, C. E. Radiation and breast cancer: a review of current evidence. **Breast Cancer Res.**, v. 7, p. 21-32. 2005.

ROSEN, P. P et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. **J Clin Oncol.**, v. 11, p. 2090-2100, 1993 apud CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and Predictive Factors in Early-Stage Breast Cancer. **The Oncologist.**, v. 9, n. 6, p. 606-616, 2004.

ROSS, J. S.; FLETCHER, J. A.; LINETTE, G. P.; STEC, J.; CLARK, E.; AYERS, M.; SYMMANS, W. F.; PUSZTAI, J.; BLOOM, K. J. The HER-2/neu Gene and Protein in Breast Cancer 2003: Biomarker and Target of Therapy. **The Oncologist.**, v. 8, p. 307-325. 2003.

RYAN, K. M.; BIRNIE, G. D. Myc oncogenes: the enigmatic family. **Biochem. J.**, v. 314, p. 713-721. 1996.

SCARFF, R.; TORLONI, F. Histological typing of breast tumors. International histological classification of tumors. no 2. Geneva: World Health Organization, 1968.

SCHLOTTER, C. M.; VOGT, U.; BOSSE, U.; MERSCH, B.; WABMANN. *C-myc*, not HER-2/neu, can predict recurrence and mortality of patients with node-negative breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 5, p. 30-36. 2003.

SHING, H. J., KIM, H. H., KIM, S. M., KIM, D. B., LEE, Y. R., KIM, M. J. Pure and Mixed Tubular Carcinoma of the Breast: Mamographic and Sonographic Differential Features. **Korean J Radiol.** v. 8, n. 2, p. 103-110. 2007.

SINGLETERY, S. E.; CONNOLLY, J. L. Breast Cancer Staging: Working With the Sixth Edition of the AJCC Cancer Staging Manual. **Cancer J Clin.** v. 56, p. 37-47. 2006.

SINGLETERY, S.E. Rating de Risk Factors for Breast Cancer. **Annals of Surgery.** v. 237, p. 474-482. 2003.

SLAMON, D. J.; CLARK, G. M.; WONG, S. G.; LEVIN, W. J.; ULLFICH, A.; MCGUIRE, W. L. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of HER-2/neu oncogene. **Science.**, v. 235, p. 177-182. 1987.

SMITH, I. C.; HEYS, S. D.; HUTCHEON, A. W.; MILLER, I. D.; PAYNE, S.; GILBERT, F. J.; AH-SEE, A. K.; EREMIN, O.; WALKER, G.; SARKAR, T. K.; EGGLETON, S. P.; OGSTON, K. N. Neoadjuvant Chemotherapy in Breast Cancer: Significantly Enhanced Response With Docetaxel. **Journal of Clinical Oncology.**, v. 20, n. 6, p. 1456-1466, 2002.

SPOTTS, G. D.; PATEL, S. V.; XIAO, Q.; HANN, S. R. Identification of downstream-initiated *C-MYC* proteins which are dominant-negative inhibitors of transactivation by full length *C-MYC* proteins. **Mol Cell Biol.** v. 1, p. 1459-1468. 1997.

SUGAYAMA S. M. M.; BERTOLA, D. R.; ALBANO, L. M. J.; MANISSADJIAN A.; AULER-BITENCOURT E.; BOROVNIK C.; KIM C. A. Síndrome de Pallister-Killian o tetrasomia del brazo corto del cromosoma 12 en mosaico: relato de dos casos por hibridização in situ por fluoresceína (FISH). **Pediatrics.** v. 22, p. 255-263, 2000.

SWAIN, S. M. Chemotherapy: Updates and New Perspectives. **The Oncologist.**, v.15, p. 8-17. 2010.

TANEJA, P.; MAGLIC, D.; KAI, F.; ZHU, S.; KENDIG, R. D.; FRY, E. A.; INOUE, K. Classical and Novel Prognostic Markers for Breast Cancer and their Clinical Significance. **Clin Med Insights Oncol.**, v. 20, n. 4, p. 15-34, Apr. 2010.

TERRY, P. D.; ROHAN T. E. Cigarette Smoking and the Risk of Breast Cancer in Women: A Review of Literature. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.**, v. 11, p. 953-971, 2002.

TEWARI, M.; KRISHNAMURTHY, A.; SHUKLA H. Predictive markers of response to neoadjuvant chemotherapy in breast cancer. **Surgical Oncology.** v. 17, p. 301-311. 2008.

UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER. **TNM Classificação de Tumores Malignos.** 6.ed. Rio de Janeiro: INCA, 2004. 254 p. Traduzido de: TNM Classification of malignant Tumours.

VIANA, A. N.; MONTANHA, D. Incidências de fatores de risco em mulheres com câncer de mama. **Revista UNILUS Ensino e Pesquisa.** v. 7, n. 12, p. 17-25. 2010.

VISSCHER, D.; JIMENEZ, R. E.; GRAYSON, M.; MENDELIN, J.; WALLIS, T. Histopathologic analysis of chromosome aneuploidy in ductal carcinoma in situ. **Human Pathol.** v. 31, p. 201-207. 2000.

WILLETT, W. C.; ROCKHILL, B.; HANKINSON, S. E.; HUNTER, B. J.; COLDITZ, G. A. Epidemiologia e causas não genéticas do câncer de mama. In: HARRIS, J. R.; LIPPMAN, M. E.; MORROW, M.; OSBORNE, C. K. **Doenças da mama.** 2. ed. Belo Horizonte: Medsi, 2002. p. 205-59.

YUAN, Z.; QU, X.; ZHANG, Z. T.; WANG, Y. Neoadjuvant chemotherapy in patients with stages II and III breast cancer. **Chinese Medical Journal.** v. 20, p. 2993-2997. 2009.

ZHOU, B. B.; PEYTON, M.; HE, B.; LIU, C.; GIRARD, L.; COUDLER, E.; LO, Y.; BARIBAND, F.; MIKAMI, I.; REGUART, N. et al. Targeting ADAM-mediated ligand cleavage to inhibit HER3 and EGFR pathways in non-small cell lung cancer. **Cancer Cell.** v. 10, p. 39-50. 2006.

## **APÊNDICES**

## APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

“*C-MYC*, *HER-2* e RECEPTORES HORMONAIIS COMO PREDITORES DE RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA NEOADJUVANTE EM CÂNCER MAMÁRIO”

Estamos realizando uma pesquisa que objetiva investigar a amplificação dos genes *C-MYC*, *HER-2* e RECEPTORES HORMONAIIS nas pacientes com tumores mamários que precisam realizar quimioterapia antes do procedimento cirúrgico (quimioterapia neoadjuvante) e será realizada de acordo com a seguinte metodologia: o fragmento de tumor que for retirado para a biópsia e enviado para estudo anatomopatológico, deste, se coletará uma pequena parte, e desta parte será feito as pesquisas destes genes, através de duas técnicas (imunohistoquímica e FISH). Estas peças serão coletadas do Serviço de Anatomia-patológica do Hospital Ophir Loyola, sem custo para o paciente. O Sr. (Sra.) participará nos autorizando, a utilizar um fragmento de sua peça cirúrgica ou de seu familiar, para podermos dar continuidade na pesquisa.

A sua participação será de livre e espontânea vontade e informamos também que sua privacidade será assegurada e que o senhor (a) tem plena liberdade de interromper a sua participação na pesquisa a qualquer momento, sem qualquer tipo de penalização ou prejuízo.

Responsável pelo projeto: Cynthia Mara Brito Lins Pereira

e-mail: [cmblins@gmail.com](mailto:cmblins@gmail.com)

### CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Declaro que li as informações acima sobre a pesquisa, que me sinto perfeitamente esclarecido (a) sobre o conteúdo da mesma. Declaro ainda que, por minha livre vontade, concordo em participar da pesquisa, desde que sejam respeitadas todas as disposições citadas.

Belém, ----- de ----- de 20-----

Nome:

Telefone:

**APÊNDICE B - NÚMERO DE SINAIS DE ALELOS NA AMPLIFICAÇÃO DO *C-MYC***

CASOS	RESPOSTA	NÚMERO DE SINAIS						
		1	2	3	4	5	≥6	HA
1	satisfatória	1,5	44,5	23	18	7,5	3,5	2
2	satisfatória	0	48	31,5	9	6,5	3	2
3	satisfatória	1,5	45	24,5	22	4	2	1
4	satisfatória	0	34,5	30	16,5	6,5	7	5,5
5	satisfatória	1	38	24,5	30	2,5	2	2
6	satisfatória	1	47,5	27	18	3,5	2,5	0,5
7	satisfatória	0	39,5	26	28	3,5	2	1
8	satisfatória	1,5	39,5	36,5	11,5	6	3	2
9	satisfatória	0	46,5	18	30	2,5	2	1
10	satisfatória	2	46	30	16,5	3	2	0,5
11	satisfatória	0,5	44	36	7	6,5	4	2
12	satisfatória	3,5	45	32	12	4	2,5	1
13	satisfatória	2	43,5	27	16	7	3,5	1
14	satisfatória	0,5	41,5	24	24,5	5,5	3	1
15	satisfatória	2	44	29,5	22	4,5	2	0,5
16	satisfatória	1	40	25	21,5	6	4,5	2
17	satisfatória	1	42	29,5	17	4	3	3,5
18	satisfatória	1	37,5	25	20	7,5	4	5
19	satisfatória	1	41	24,5	25	4,5	2	2
20	satisfatória	0	43,5	33	15	5	3	0,5
21	satisfatória	2	41,5	30	20	3,5	2	1
22	satisfatória	0	45,5	30	16	4,5	3	1
23	satisfatória	3	41	28	19,5	5,5	2	1
24	satisfatória	2,5	42	31,5	18	2	2	2
25	satisfatória	0	40,5	38	12	4	2	3,5
26	insatisfatória	1	36,5	21	13	11	9,5	8
27	insatisfatória	1	40	18	15,5	14,5	4	7
28	insatisfatória	0,5	42	21,5	14,5	9	7	5,5
29	insatisfatória	0	29	19	17	13,5	12	9,5
30	insatisfatória	1	30	28	15,5	11	7,5	7
31	insatisfatória	1,5	44	17	13,5	9,5	8	6,5
32	insatisfatória	2	38	14	12,5	13	12	8,5
33	insatisfatória	1	28,5	13	18	9,5	16,5	13,5
34	insatisfatória	0,5	31,5	22,5	13,5	12	9	11
35	insatisfatória	1	35	21	15,5	15,5	5,5	6,5
36	insatisfatória	0,5	32,5	19,5	17	16	6	8,5
37	insatisfatória	0,5	35,5	23	15,5	11,5	6,5	7,5
38	insatisfatória	1	32	19,5	10,5	14,5	10	12,5
39	insatisfatória	0,5	40,5	23,5	16	8	5,5	6
40	insatisfatória	1,5	38	21	16,5	14,5	4,5	4
41	insatisfatória	2	39,5	19	14,5	13,5	6	5,5
42	insatisfatória	2,5	27,5	12	28	17	4,5	8,5
43	insatisfatória	3	37	18	13	15,5	6	7,5
44	insatisfatória	2,5	27,5	18	19,5	13	10,5	9
45	insatisfatória	3,5	31	30	9	11,5	6,5	8,5
46	insatisfatória	1	27	15,5	14	14,5	15	13
47	insatisfatória	2,5	40	17,5	13	11,5	8,5	7
48	insatisfatória	2,5	38	30	12,5	7	3,5	6,5

49	insatisfatória	2,5	35,5	17,5	13,5	14	8	9
50	insatisfatória	2	34,5	19,5	16,5	13,5	6	8
Linfocito		1	99					

HA : high amplification

### APENDICE C - BANCO DE DADOS

CASOS	IDADE	GRAU	RE	RP	HER-2	C-MYC	RESPOSTA	TNM	HA
1	34	G2	neg	neg	3+	pos	satisfatória	T3N1	2
2	46	G2	pos	pos	2+	negat	satisfatória	T3N1	2
3	46	G2	pos	pos	1+	Inconclusivo	satisfatória	T3N1	1
4	31	G2	neg	neg	3+	pos 10%	satisfatória	T3N1	5,5
5	42	G2	pos	pos	1+	Inconclusivo	satisfatória	T3N1	2
6	35	G2	pos	pos	2+	pos	satisfatória	T3N1	0,5
7	41	G1	neg	neg	1+	negat	satisfatória	T3N1	1
8	55	G2	neg	neg	1+	negat	satisfatória	T3N1	2
9	44	G2	pos	pos	1+	pos	satisfatória	T3N1	1
10	54	G2	pos	pos	1+	pos	satisfatória	T3N1	0,5
11	38	G2	pos	pos	1+	pos	satisfatória	T3N1	2
12	41	G2	neg	neg	3+	pos	satisfatória	T3N1	1
13	48	G2	pos	pos	1+	pos 10%	satisfatória	T3N1	1
14	38	G2	pos	pos	3+	Inconclusivo	satisfatória	T3N1	1
15	43	G2	neg	neg	1+	negat	satisfatória	T3N2	0,5
16	45	G2	neg	neg	1+	negat	satisfatória	T4bN1	2
17	61	G2	neg	neg	0	negat	satisfatória	T4bN1	3,5
18	53	G2	pos	pos	0	Inconclusivo	satisfatória	T4bN1	5
19	37	G2	pos	pos	1+	pos	satisfatória	T4bN1	2
20	39	G2	neg	neg	1+	Inconclusivo	satisfatória	T4bN1	0,5
21	37	G2	pos	pos	3+	pos	satisfatória	T4cN2	1
22	54	G2	pos	pos	1+	pos	satisfatória	T4bN2	1
23	36	G2	pos	pos	1+	pos	satisfatória	T4bN2	1
24	43	G2	pos	pos	2+	negat	satisfatória	T4bN2	2
25	78	G2	pos	pos	1+	negat	satisfatória	T4bN2	3,5
26	55	G2	neg	neg	3+	pos	insatisfatória	T2N2	8
27	51	G2	pos	pos	1+	negat	insatisfatória	T3N1	7
28	55	G2	neg	neg	0	negat	insatisfatória	T3N1	5,5
29	58	G2	pos	pos	1+	Inconclusivo	insatisfatória	T3N1	9,5
30	33	G3	neg	neg	3+	pos 10%	insatisfatória	T3N1	7
31	49	G2	pos	pos	1+	pos	insatisfatória	T3N1	6,5
32	53	G3	pos	pos	2+	negat	insatisfatória	T3N2	8,5
33	35	G2	pos	pos	1+	negat	insatisfatória	T3N2	13,5
34	44	G2	neg	neg	2+	pos	insatisfatória	T3N3	11
35	53	G2	neg	neg	1+	pos	insatisfatória	T4bN0	6,5
36	44	G2	pos	pos	3+	Inconclusivo	insatisfatória	T4bN1	8,5
37	42	G2	neg	neg	1+	Inconclusivo	insatisfatória	T4bN1	7,5
38	54	G3	pos	pos	2+	Inconclusivo	insatisfatória	T4bN1	12,5
39	55	G2	pos	pos	1+	Inconclusivo	insatisfatória	T4bN1	6
40	70	G1	neg	neg	2+	negat	insatisfatória	T4bN1	4
41	46	G2	neg	neg	1+	negat	insatisfatória	T4bN2	5,5
42	57	G1	pos	pos	3+	pos	insatisfatória	T4bN2	8,5
43	58	G2	neg	neg	3+	pos	insatisfatória	T4bN2	7,5
44	50	G2	neg	neg	2+	negat	insatisfatória	T4bN2	9
45	59	G3	pos	pos	1+	pos	insatisfatória	T4bN2	8,5
46	52	G2	neg	neg	1+	negat	insatisfatória	T4bN2	13
47	34	G2	pos	pos	0	negat	insatisfatória	T4cN1	7
48	47	G3	pos	pos	1+	negat	insatisfatória	T4bN1	6,5

49	53	G2	neg	neg	1+	Inconclusivo	insatisfatória	T4cN1	9
50	36	G2	neg	neg	3+	Inconclusivo	insatisfatória	T4cN2	8

---

HA: high amplification

Pos: positivo

Neg: negativo

G: grau histológico

T: tumor

N: linfonodos

## **ANEXOS**

## ANEXO A – APROVAÇÃO DO CONSELHO DE ÉTICA EM PESQUISA



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

### PARECER DE ÉTICA DE PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

1. **Protocolo:** Nº043 /2008-CEP/NMT
2. **Projeto de Pesquisa:** C-MYC COMO PREDITOR DE RESPOSTA À QUIMIOTERAP NEOADJUVANTE EM CÂNCER MAMÁRIO.
3. **Pesquisador Responsável:** Cyntia Mara Brito Lins Pereira.
4. **Instituição / Unidade:** ICB/UFPA.
5. **Data de Entrada:** 10/09/2008.
6. **Data do Parecer:** 28/10/2008.

#### PARECER

O Comitê de Ética em Pesquisa do NMT/UFPA apreciou o protocolo em tela e verificou que foram atendidas todas as exigências da Resolução 196/96-CNS/MS. Portanto manifesta-se pela sua aprovação.

Parecer: **APROVADO.**

Belém, 19 de dezembro de 2008.

  
Prof. Teiichi Oikawa  
Coordenador do CEP-NMT/UFPA.

*aprovado 28/10/08 r.lins*