



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR E GENÉTICA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOLOGIA MOLECULAR**

**FRANCIANNE SILVA ROCHA**

**ANÁLISE DO AUMENTO DA SINALIZAÇÃO DO EGFR E IGF-1R E SUA  
CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICAS E  
PERFIL BIOLÓGICO NO CÂNCER DE MAMA**

**BELÉM-PA**

**2022**

**FRANCIANNE SILVA ROCHA**

**ANÁLISE DO AUMENTO DA SINALIZAÇÃO DO EGFR E IGF-1R E SUA  
CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICAS E  
PERFIL BIOLÓGICO NO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular e Genética.

Orientador: Dr. Rommel Rodríguez Burbano

BELÉM-PA

2022

---

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

---

Rocha, Francianne Silva

Análise do aumento da sinalização do EGFR e IGF-1R e sua coerrelação com características sócio-epidemiológicas e perfil biológico no câncer mamário / Francianne Silva Rocha; orientador, Rommel Mario Rodríguez Burbano, co-orientadora, Cynthia Mara Brito Lins Pereira. – Belém, 2022.

63 f.

Tese (Doutorado em em Genética e Biologia Molecular) – Universidade Federal do Pará, Instituto de Ciências da Saúde, Departamento de Biologia Molecular e Genética, Programa de Pós-graduação em Genética e Biologia Molecular, Belém, 2010.

1. Câncer de Mama 2. EGFR 3. IGF-1R I. Burbano, Rommel Mario Rodríguez II. Pereira, Cynthia Mara Brito Lins III. Título

CDU: 618.19-006.6

**FRANCIANNE SILVA ROCHA**

**ANÁLISE DO AUMENTO DA SINALIZAÇÃO DO EGFR E IGF-1R E SUA  
CORRELAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS SÓCIO-EPIDEMIOLÓGICAS E  
PERFIL BIOLÓGICO NO CÂNCER DE MAMA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular, da Universidade Federal do Pará como requisito para obtenção do título de Doutor em Biologia Molecular e Genética.

**BANCA EXAMINADORA:**

\_\_\_\_\_ - Orientador  
Prof. Dr. Rommel Rodríguez Burbano  
Universidade Federal do Pará

\_\_\_\_\_ - Co-orientadora  
Profa. Dra. Cynthia Mara Brito Lins Pereira  
Universidade Federal do Pará

\_\_\_\_\_ - Avaliador  
Profa. Dra. Valéria Barbosa Pontes  
Universidade Federal do Pará

\_\_\_\_\_ - Avaliador  
Profa. Dra. Samia Demachki  
Universidade Federal do Pará

\_\_\_\_\_ - Avaliador  
Prof. Dr. André Salim Khayat  
Universidade Federal do Pará

\_\_\_\_\_ - Avaliador  
Prof. Dr. Paulo Pimentel de Assumpção  
Universidade Federal do Pará

**Apresentado em:** \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_

**Conceito:** \_\_\_\_\_

## Dedicatória

Dedico esta obra e todo o meu esforço ao meu maior incentivador e mestre de toda minha vida, meu paizinho querido, aonde o sr estiver saiba que sem o senhor nada seria possível para mim.

Manoel Juary Murta Rocha ( *in memoriam* )

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiro e imensamente a Deus, pela vida, pela saúde e pelas oportunidades que me trouxeram até aqui. Agradeço a minha família pelo apoio, paciência e carinho em todos os momentos e ressalto a cooperação do meu filho Andre Luiz Rocha Fiel com incondicional suporte de amor.

Agradeço ao meu orientador Prof. Rommel Mário Rodriguez Burbano pela grandeza e sabedoria na condução do projeto e em todo o desenvolvimento da tese, sempre com palavras e gestos de incentivo e apoio.

Agradeço a Profa Cynthia Mara Brito Lins Pereira por dividir sua experiência e conhecimento com generosidade e paciência.

Agradeço a todos os especiais colegas e queridos funcionários do Hospital Ofir Loyola que me auxiliaram no decorrer da coleta de dados

Agradeço ao Prof Jersey Heitor da Silva Maués e à Prof Carolina Aquino Moreira-Nunes pela contribuição decisiva no evoluir do projeto.

## Epígrafe

Não chores, meu filho;  
Não chores, que a vida  
É luta renhida:  
Viver é lutar.  
A vida é combate,  
Que os fracos abate,  
Que os fortes, os bravos  
Só pode exaltar.

Gonçalves Dias

## RESUMO

Mesmo com intenso progresso da biologia molecular o câncer ainda constitui um desafio na avaliação prognóstica e no tratamento. O câncer de mama apresenta grande diversidade biológica e heterogeneidade, o que estimula contínuos estudos sobre seu perfil biológico e molecular. Os fatores de crescimento são elementos importantes da função celular e participantes ativos da sinalização celular. Os receptores do fator de crescimento epidérmico tipo 1 e do fator de crescimento insulina like são componentes determinantes na avaliação do câncer de mama, a sinalização celular alterada, decorrente da super expressão destes fatores de crescimento, tem papel relevante na origem e progressão da neoplasia maligna, mantendo estímulo constante a proliferação e o bloqueio à apoptose. Neste estudo vamos avaliar como a super expressão dos receptores EGFR RNAmg e EGFR proteína e do IGF-1R RNAmg e IGF-1R proteína podem influenciar tipos biológicos específicos na evolução do câncer de mama e relacionar sua expressão com fatores epidemiológicos. Nos resultados observamos que a proteína do EGFR é mais expressa entre 18-40 anos, enquanto que no IGF-1R a superexpressão é mais vista entre 41-60 anos; o mRNA e proteína do EGFR foi mais expresso em nulíparas, nas tabagistas, nas que possuem como antecedentes familiares parentes com câncer de mama, em pacientes com índice de massa corpórea (IMC) > que 25, o perfil biológico que mais expressou o EGF-1R foi o HER. Enquanto que o mRNA e proteína do IGF-1R foi mais expresso nas que gestaram; nas tabagistas e etilistas, em pacientes com antecedentes familiares de outros canceres que não o de mama e mais associado ao perfil biológico Luminal B. Ambas as proteínas estão super expressas em pacientes com acometimento linfonodal presente (de 1-3 linfonodos comprometidos) e em pacientes que evoluíram com desfecho desfavorável como recidivas, metástases e óbitos. Mais estudos são necessários para o aprofundamento do tema e introdução de novas possibilidades terapêuticas no câncer de mama.

Palavras chave: câncer de mama; EGFR; IGF-1R;

## ABSTRACT

Even with intense progress in molecular biology, cancer still poses a challenge in the prognostic evaluation and treatment. The breast cancer has the great biological diversity and heterogeneity that require continuous studies on its biological and molecular profile. Growth factors have been shown important elements of cellular function and active cell signaling participants. Receptors of type 1 epidermal growth factor and insulin like growth factor are important components in the current evaluation of breast cancer, there are promising indications that altered cell signaling, due to the super expression of these factors of growth, plays a relevant role in the origin and progression of malignant neoplasia, maintaining constant stimulation of proliferation and blockage to apoptosis. In this study we want to evaluate whether how the super expression of receptors EGFR RNA m and EGFR protein and the IGF-1R RNA m and IGF-1R protein can influence specific biological types in the evolution of breast cancer and relate to the expression of epidemiological factors. In the results we observed that EGFR protein is more expressed in 18-40 years, while in IGF-1R overexpression is more seen between 41-60 years; mRNA and EGF-1R protein was more expressed in nulliparous, in smokers, in those with relatives with breast cancer as family history, in patients with body mass index (BMI) > that 25, the biological profile that most expressed the EGFR was HER.. While mRNA and IGF-1R protein was more expressed in those who were left; in smokers and alcoholics, in patients with family history of cancers other than breast cancers and more associated with the biological profile Luminal B. Both proteins are super expressed in patients with lymph node involvement present (of 1-3 lymph nodes and in patients who evolved with unfavorable outcome such as relapses, metastases and deaths. Further studies are needed to deepen the theme and introduce new therapeutic possibilities in breast cancer.

Key words: breast cancer; EGFR; IGF-1R.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1</b> - Habilidades do câncer.....	14
<b>Figura 2</b> - Estadiamento clínico do câncer de mama segundo a AJCC, 2018.....	23
<b>Figura 3</b> - Modelos de ativação dos receptores de estrogênio.....	30
<b>Figura 4</b> - Mecanismos de ação dos estrogênios .....	31
<b>Figura 5</b> - Distribuição dos perfis biológico nas amostras .....	50
<b>Figura 6</b> - Correlação entre o EGFR RNAm e proteína e os perfis moleculares .....	51
<b>Figura 7</b> - Correlação entre IGF-1R RNAm e proteína e os subtipos moleculares.....	51

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Acs	Anticorpos
ADC	Anticorpo Droga-Conjugado
AJCC	<i>Câncer da American Joint Committee on Cancer</i>
ASCO	<i>American Society Clinical of Oncology</i>
BLS	Biópsia do Linfonodo Sentinela
CDI	Carcinoma Ductal Invasor
CDIS	Carcinoma Ductal <i>In Situ</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CLI	Carcinoma Lobular Invasor
CMTN	Câncer de Mama Triplo Negativo
DM1	Mertansine
EGF	Fator de Crescimento Epidérmico
EGFR	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
RE	Receptor de Estrogênio
FC	Fatores de Crescimento
FGF	Fator de Crescimento Fibroblático
FISH	Hibridização <i>in situ</i> Fluorescente
GH	Hormônio do Crescimento
<i>HER</i>	Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico Humano
HOL	Hospital Ophir Loyola
IAs	Inibidores de Aromatase
IGF	Fator de Crescimento Insulina
IGF-R	Receptores do Fator de Crescimento Insulina Like
IHQ	Imunohistoquímica
IMC	Índice de Massa Corporal
IR	Receptor de Insulina
Ki	Índice de Proliferação
LRF	Riscos de Falha Locorregional
MAPK	Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MCE	Migração da Célula Endotelial
NF-Kb	Fator Nuclear Kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde

PMRT	Radioterapia Pós Mastectomia
RH	Receptores Hormonais
RNA	Ácido Ribonucleico
RNA <sub>m</sub>	RNA Mensageiro
RP	Receptor da Progesterona
SBR	Classificação de Scarff, Bloom e Richardson
SERMs	Moduladores Seletivos do Receptor de Estrogênio
SLD	Sobrevida Livre de Doenças
SUS	Sistema Único de Saúde
TGF- $\beta$	Fator de Crescimento Tumoral Beta
TKI	Inibidores de Tyrosina Quinase
TNM	Classificação de Tumores Malignos
UICC	<i>Union for International Cancer Control</i>
VEFG	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
v-ErbB	Oncogene análogo viral

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>1.1</b>	<b>Biologia Molecular e o Câncer de Mama.....</b>	<b>13</b>
<b>1.2</b>	<b>Vias de Sinalização e Fatores de Crescimento .....</b>	<b>15</b>
1.2.1	Fator de Crescimento Epidérmico (EGF) .....	16
1.2.2	Fator de Crescimento Insulina Like (IGF).....	18
<b>1.3</b>	<b>Epidemiologia do Câncer de Mama.....</b>	<b>20</b>
<b>1.4</b>	<b>Classificação Histológica do Câncer de Mama .....</b>	<b>21</b>
1.4.1	Carcinoma ductal <i>in situ</i> .....	24
1.4.2	Carcinoma ductal invasor (CDI).....	25
1.4.3	Carcinoma lobular invasor (CLI).....	26
<b>1.5</b>	<b>Gradação Histológica do Câncer de Mama .....</b>	<b>26</b>
<b>1.6</b>	<b>Subtipos Moleculares.....</b>	<b>28</b>
1.6.1	Luminais A e B .....	29
1.6.2	HER-2 .....	32
1.6.3	Basaloide / Triplo negativo.....	34
1.6.4	Normal-like.....	35
<b>1.7</b>	<b>Abordagem Terapêutica.....</b>	<b>35</b>
<b>1.8</b>	<b>Receptores Hormonais e Fatores de Crescimento .....</b>	<b>37</b>
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>39</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>40</b>
<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral.....</b>	<b>40</b>
<b>3.2</b>	<b>Objetivos Específicos .....</b>	<b>40</b>
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>41</b>
<b>4.1</b>	<b>Aspectos éticos.....</b>	<b>41</b>
<b>4.2</b>	<b>Delineamento do Estudo/Coleta de Dados.....</b>	<b>41</b>

<b>4.3</b>	<b>Análise das Amostras.....</b>	<b>42</b>
<b>4.4</b>	<b>CrITÉrios de Inclusão e Exclusão.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>44</b>
<b>5.1</b>	<b>Resultados Sócio-epidemiológicos .....</b>	<b>44</b>
<b>5.2</b>	<b>Resultados da Expressão de EGFR e IGF-1R.....</b>	<b>47</b>
<b>5.3</b>	<b>Relação entre expressões EGFR e IGF-1R.....</b>	<b>48</b>
<b>5.4</b>	<b>Análise de Sobrevivência.....</b>	<b>49</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>52</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>55</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>56</b>

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Biologia Molecular e o Câncer de Mama

A biologia molecular tem evoluído muito nos últimos 30 anos, clareando muitos aspectos a respeito do câncer, no entanto, muitas lacunas ainda permanecem sem esclarecimento, tanto no aspecto clínico quanto científico. O câncer é uma doença genética, apresenta etapas de iniciação, promoção e a progressão que expressam lesões cumulativas do DNA e transmitem suas características fenotípicas alteradas às células filhas. Várias funções celulares e teciduais são reguladas por hormônios, fatores de crescimento (FC) e neurotransmissores, são os ligantes, eles dependem das interações com seus receptores específicos, encontrados, em sua maioria, na superfície celular<sup>1,2</sup>.

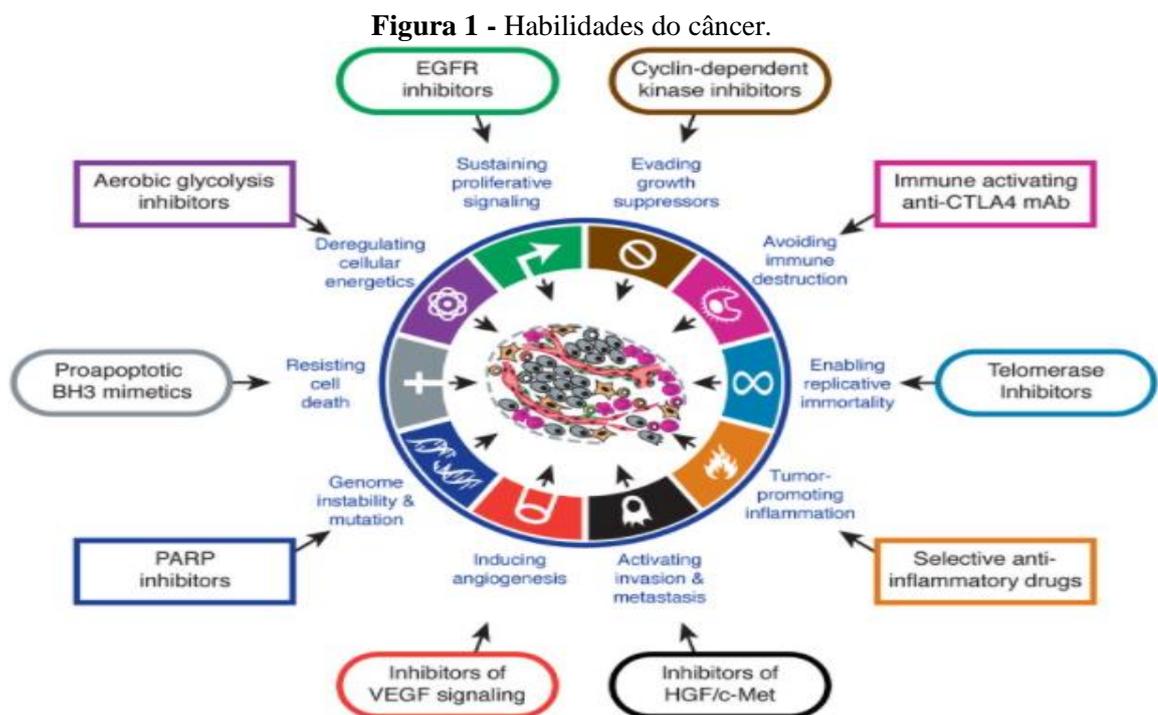
O câncer é uma doença caracterizada pela intensa proliferação celular e com comunicação inter e intracelular<sup>2</sup>. Alguns autores definiram “habilidades” do câncer que mostravam capacidades funcionais adquiridas pelas células malignas para sobreviver, proliferar e disseminar. Estas aquisições foram determinadas por duas peculiaridades: desenvolvimento da instabilidade genômica e o status inflamatório de lesões pré-malignas e francamente malignas e, ainda, outras aptidões como a maior reprogramação do metabolismo celular e a fuga das células malignas do ataque das células imunológicas. O início da transformação neoplásica maligna apresenta etiologia multifatorial, notadamente com a superexpressão de protooncogenes e a inibição dos genes supressores tumorais provocando assim a perda do controle da proliferação celular. Há a formação de um micro ambiente tumoral propício a tumorigênese: auto-suficiência do sinal de crescimento; insensibilidade aos fatores inibitórios; evasão a apoptose; sustentação a angiogênese; potencial replicativo ilimitado; reprogramação do metabolismo energético; evasão da vigilância imune; invasão celular e metástase, caracterizando o fenótipo maligno<sup>2</sup>.

Este estado de proliferação crônica é uma habilidade adquirida pela célula tumoral, que passa a controlar a produção e o estímulo à sinalização, controlar a homeostase e com a desregulação das vias de sinalização, as células se tornam auto-suficientes<sup>2,3</sup>.

A ativação da angiogênese durante a progressão tumoral facilitará a expansão e o crescimento do tumor, e este processo é fundamental para a recuperação contínua do fornecimento de oxigênio e nutrientes. Novos vasos sanguíneos surgem com a dissolução da membrana basal vascular, aumento da permeabilidade vascular e degradação da matriz extracelular, seguido pela migração da célula endotelial (MCE), invasão, proliferação e

formação de tubos. A neovascularização durante a progressão tumoral, auxilia na invasão vascular, as células que sobrevivem na corrente sanguínea alcançam órgãos distantes, vencem as barreiras físicas e também o desafio da disseminação do carcinoma em sítio diferente do tumor primário. A angiogênese patológica é principalmente uma marca registrada do câncer, onde a vasculatura desenvolvida é mais complexa e anormal<sup>4</sup>.

A próxima etapa da evolução tumoral é a disseminação destas células mutadas através da invasão local, de modo individual ou coletivo, como grupos celulares, seguida de entrada ao sistema linfático ou hematopoiético e posterior evasão do lúmen dos vasos para tecidos, existe a princípio a formação de pequenos grupos de células neoplásicas (micrometástases) e com a evolução do processo há o crescimento destas lesões para macrometástases, fenômeno conhecido como colonização<sup>5</sup>. Após a ruptura da membrana basal pelo aumento da expressão de proteases, como as metaloproteases, estas células podem apresentar comportamento agressivo e dar início ao processo de transição epitélio-mesenquimal, passo importante na progressão tumoral, caracterizado pela perda da adesão celular, perda da polaridade celular e pelo aumento da invasão e da mobilidade das células do câncer. Nesta transição epitélio mesenquimal as vias de sinalização envolvidas são: Wnt, Notch, fator nuclear kappa B (NF-Kb), fator de crescimento tumoral beta (TGF- $\beta$ ), fator de crescimento endotelial vascular (VEFG)<sup>5</sup>.



Fonte: Hanahan<sup>2</sup>.

Demonstrar as repercussões da expressão dos FC na evolução do câncer de mama é fundamental para a compreensão da evolução clínica e de possíveis manejos terapêuticos da neoplasia de mama. A sinalização celular alterada, pela a super expressão de alguns FC, é responsável pela progressão da neoplasia maligna, promovendo a manutenção do estímulo constante à proliferação e o bloqueio à apoptose, o que poderia culminar em uma resistência as drogas usualmente utilizadas e comprometer a boa evolução clínica<sup>3;5</sup>.

## **1.2 Vias de Sinalização e Fatores de Crescimento**

O avanço na compreensão da biologia do câncer permitiu maior conhecimento das vias envolvidas na transdução de sinais, motivados pela ativação de receptores por seus ligantes, tornando possível a introdução de novos tratamentos no câncer de mama. As vias de sinalização ocorrem entre uma molécula extracelular que se liga ao seu receptor intrínseco, alterando sua conformação e afetando o espaço citoplasmático, segue-se uma sequência de alterações intracelulares que culminam numa sinalização nuclear capaz de influenciar a expressão gênica<sup>1;3</sup>.

Os FC desempenham um papel importante no controle da maioria dos processos celulares fundamentais, incluindo proliferação, diferenciação, metabolismo e sobrevivência celular, bem como migração celular e controle do ciclo celular. Os receptores dos FC podem sofrer desregulação em muitos processos patológicos, dentre os quais o câncer, a diabetes mellitus, as inflamações, doenças ósseas graves, arteriosclerose. Os sinais de desregulação dos FC estão presentes em várias das características que configuram o fenótipo maligno, podemos ressaltar a aquisição de auto-suficiência na produção dos FC, a insensibilidade aos supressores do crescimento, a resistência à morte celular e ao escape a destruição imune, a indução de angiogênese, a ativação da invasão e metastatização, aquisição de um potencial replicativo ilimitado, a instabilidade genômica e mutação, o status de inflamação promovida pelo tumor, e a desregulação energética celular<sup>2</sup>.

Nos tecidos normais a quantidade de FC é controlada por células adjacentes ou distantes que os produzem e os lançam na circulação. Esta produção proporciona níveis normais de proliferação, no entanto, quando a célula replica FC produzidos por ela própria, sucede uma condição de estimulação autócrina ou auto estimulação que pode resultar numa proliferação celular aberrante<sup>1;2;3</sup>, a própria sinalização dos receptores pode também sofrer desregulação pela elevação dos níveis de proteínas receptoras da superfície celular, tornando tais células hiperresponsivas. Os FC são moléculas dinâmicas por serem capazes de induzir a reposta celular,

sua atuação é controlada pela expressão gênica, principalmente pela inibição de sua síntese nas células que apresentam os receptores cognatos, quando existe uma modificação dos fatores regulatórios que ajem subregulando a comunicação prolongada do FC com seu receptor há estímulo à transformação maligna. Os FC podem criar sinais desordenados capazes de provocar desequilíbrio na proliferação (fator de crescimento fibroblático - FGF, fator de crescimento epidérmico - EGF), na migração celular (FGF, EGF, VEGF - fator de crescimento do endotélio vascular), na síntese de proteinases (FGF, EGF) e na angiogênese (FGF, VEGF), estes estímulos impulsionam não apenas o crescimento tumoral, mas também, possibilitam condições para a propagação do tumor para outros tecidos<sup>3</sup>. A biodisponibilidade dos FC é regulada pelo sequestro do espaço pericelular, pela matrix extracelular e por uma complexa rede de proteases, sulfatases e possivelmente outras enzimas que liberam e os ativam, aparentemente, com uma alta especificidade e de forma localizada<sup>4;6</sup>.

Comumente a superexpressão de FC está associado ao desenvolvimento do câncer. O EGF e sua família estão fortemente relacionados ao prognóstico e tratamento do câncer de mama. O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) está envolvido em angiogênese, proliferação celular, metástases, bem como inibição da apoptose<sup>6</sup>.

Há outro FC que comumente associa fatores sócio epidemiológicos, diabetes, obesidade e síndrome metabólica ao câncer, talvez por ser resultantes destas condições a resistência à insulina e a hiperinsulinemia. Os receptores do fator de crescimento insulina like (IGF-R) e insulina (IGF) formam uma complexa rede de receptores de superfície celular, e todos funcionam para mediar as respostas de insulina e IGF. A maioria dos tumores malignos tem receptores de insulina e IGF-1. Os IGF e IGF-R são capazes de estimular a proliferação de células malignas e favorecer a metástase, além de sua função metabólica<sup>7</sup>. Estas peculiaridades estudadas nestes dois FC nos motivou a estudá-los.

### 1.2.1 Fator de Crescimento Epidérmico (EGF)

O EGF é um 53 citocina de aminoácido (6,2 kDa) que é secretado por células ectodérmicas, monócitos e glândulas renais e duodenais e estimula o crescimento das células epidérmicas e epiteliais. O EGF e pelo menos sete outros FC e seus quinases de receptores transmembrana desempenham um papel importante na proliferação celular, sobrevivência, adesão, migração e diferenciação. A família do receptor do EGF (EGFR) consiste de quatro receptores transmembranares, que incluem EGFR HER1 (erbB-1), HER2 (erbB-2/neu), HER3 (erbB-3) e HER4 (erbB-4)<sup>8</sup>. O gene EGFR está localizado no braço curto do cromossomo 7, na

região 7p12.3p12.1 e codifica, via splicing alternativo, 04 isoformas, a mais descrita na oncologia e a que estudaremos é a isoforma 1 (p170) composta por 28 exons, 1.210 aminoácidos e transcreve 1500pb em seu RNAm, esta isoformas apresenta três domínios funcionais principais: um domínio extracelular com estrutura acopladora do ligante, um domínio transmembrana hidrofóbico que ancora e estabiliza a estrutura do receptor e um domínio intracelular com sitio catalítico da tirosina quinase e múltiplos sítios de autofosforilação agrupados na porção C-terminal<sup>8;9</sup>.

HER1, bem como HER2 são superexpressos em muitas células de tumores sólidos, tais como a mama, pulmão não-pequenas células, cabeça e pescoço e câncer de cólon<sup>9</sup>. Os altos níveis de expressão HER1 e HER2 em células de câncer estão associados um mau prognóstico<sup>10</sup>. A desregulação dos receptores HER ocorre por uma variedade de mecanismos, entre eles: superexpressão do receptor<sup>11</sup>; superprodução de ligantes<sup>12</sup>; superexpressão do receptor acrescido de superprodução de ligantes, o que resulta numa alça autócrina<sup>13</sup>; mutações que provocam a ativação constitutiva do domínio tirosina-quinase<sup>14</sup>; efeito na internalização com consequente não desativação dos receptores, mecanismo conhecido como *downregulation*<sup>14</sup>.

Além dos mecanismos de desregulação, os receptores tirosina-quinase podem ser estimulados por outras vias de sinalização, processo conhecido como transativação ou cross-talk. Essas vias marginais podem advir da ativação de receptores acoplados a proteína G, de receptores de citocinas/proteínas de adesão, de receptores ativados por canais de cálcio voltagem dependentes, várias formas de estresse celular (radiação ultravioleta, radiação gama, além de vários compostos oxidantes). Com os processos de desregulação, as células tornam-se propensas à perpetuação tumoral<sup>14</sup>.

Devido à alta frequência da expressão EGFR no câncer de mama, os inibidores de tirosina quinase (TKI) e anticorpos monoclonais anti-EGFR foram estudados sozinhos e em combinação com a quimioterapia e os resultados foram desanimadores sem nenhum benefício visto no estágio inicial ou configuração metastática<sup>6</sup>, entretanto o objetivo de um recente estudo<sup>15</sup> foi desenvolver um conjugado de anticorpos (do inglês, *antibody-drug conjugates* - ADC: brentuximabe vedotin, trastuzumabe emtansine e trastuzumabe deruxtecan) para tratar cânceres de mama sem expressão hormonal e nem HER 2 (câncer de mama triplo negativo - CMTN), mas que tenham grande expressão de EGFR. O ADC foi desenvolvido conjugando anticorpos monoclonais anti-EGFR com uma potente carga citotóxica de mertansine (DM1) que bloqueiam a polimerização de microtúbulos. E os resultados mostraram que o anti-EGFR ADC é uma terapia-alvo promissora para os CMTN. A frequência de superexpressão do EGFR

pode variar muito de 13% a 76% e alguns estudos já demonstraram que a expressão proteica do EGFR é mais frequentemente superexpressa nos tumores que são receptores hormonais negativos. A expressão EGFR tem se mostrado um indicador prognóstico independente de pior sobrevida livre de doenças (SLD)<sup>15</sup>.

### 1.2.2 Fator de Crescimento Insulina Like (IGF)

O fator de crescimento semelhante à insulina-1 (IGF-1) é uma proteína semelhante à insulina com efeitos anabólicos, cuja produção é estimulada pelo hormônio do crescimento (do inglês, *Growth Hormone* - GH). De modo mais específico o IGF promove a progressão do ciclo celular e inibe a apoptose, esta atuação pode ocorrer por ação direta com outros FC e também por ação indireta interagindo com outros sistemas moleculares intracelulares envolvidos na promoção e/ou progressão do câncer.

Vários fatores podem ativar a atividade de quinase do seu receptor, o IGF-1R, levando à interação com seu substrato, receptor de insulina (IR) e o Drc-homology-2 contendo proteína SH2. Após a fosforilação, essa proteína, ativa as quinases celulares e inicia diferentes vias de sinalização a jusante. Especificamente, o IGF-1R ativa o pi3K/AKT/mTOR e as vias de sinalização ras/raf/MEK, levando à carcinogênese<sup>16;17</sup>.

Membros do IGF: IGF-I, IGF-II, receptores de IGF-I e IGF-II (IGF-IR e IGF-IIR), e as IGF-binding proteins (IGFBPs 01-06), IGFBP proteases, e proteínas subreguladas estão envolvidas na sinalização intracelular distal do IGF-IR e portanto podem ter um papel no desenvolvimento e na progressão de neoplasias. Altos níveis plasmáticos de IGF-1 e IGFBP-3 representam um fator de risco para o desenvolvimento e recorrência de câncer de mama na população geral. Isso é particularmente avaliado nos de tumores hormono positivos, independente do estado da menopausa<sup>18;19</sup>.

Enquanto caminhos individuais têm sido associados a fenótipos específicos de câncer, é evidente que os sinais intracelulares iniciados após a ativação do IGF-IR constituem uma rede de interação de eventos moleculares<sup>20;21;22</sup>.

As principais diferenças entre as IGFs e a insulina concentram-se na estrutura, nos receptores preferenciais, nas interações com as proteínas ligadoras, e, conseqüentemente, na função. A insulina age como um ligante solto para ativar o seu receptor, designado como IR, enquanto as IGF-I e II, uma vez ligadas às IGFBPs, ativam predominantemente o IGF-IR, que tem estrutura semelhante ao IR<sup>23;24;25;26</sup>.

Altos níveis de insulina induzem um nível mais alto de soro IGF-I que, por sua vez, têm propriedades mitogênicas e promovem comportamento anti-apoptótico nas células. Por isso, a hiperinsulinemia crônica tem sido associada à carcinogênese. O IGF-1R não está apenas envolvido no processo de transformação dos cânceres, mas também desempenha um papel importante na manutenção da transformação maligna<sup>27;28;29</sup>.

As concentrações circulantes de IGF-I, IGF-II e IGFBPs variam entre indivíduos normais, influenciadas por fatores genéticos e estilo de vida, em especial a alimentação. Pesquisas têm revelado risco elevado de câncer nos indivíduos com concentrações de IGF-I no limite superior do normal. Estes dados são confirmados com estudos de carcinogênese in vivo, mostrando aumento da taxa de divisão celular e efeito anti-apoptótico da IGF-I. A diminuição da IGF-I diminui as condições permissivas para a proliferação neoplásica<sup>30;31;32</sup>.

Bjorner<sup>32</sup>, realizou um estudo clínico que investigou o IGF-1R, o IR e o receptor do fator de crescimento tipo insulina-fosfo-insulina/IR no câncer de mama mostrando sua implicação nos diferentes grupos, esta investigação sugeriu a necessidade de encontramos biomarcadores preditivos de resposta terapêutica para selecionar adequadamente as pacientes para o tratamento hormonal, neste estudo foi avaliada a expressão, individual e combinada, de proteínas específicas do tumor por imunohistoquímica de IGF-1R, IR, IGF-1R fosforilada/rei, em 1.026 pacientes portadoras de câncer de mama sem tratamento pré-operatório, na Suécia. A forte expressão do IGF-1R impactou a resposta ao tratamento endócrino, dependendo da idade das pacientes e do tipo de terapia hormonal a ser administrada. Mostrou ainda que após a ativação dos receptores IGF1 R e IR, mediada por ligantes, estes tornam-se fosforilados e iniciam um sinal de transdução ajusante envolvendo as vias da fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) e a proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK), além disso há interferência entre a sinalização do IGF e as vias de sinalização do receptor de estrogênio (ER) e que esta rede de sinalização do IGF também pode conferir resistência a outros tratamentos, inclusive as direcionadas ao HER-2, a radioterapia e a quimioterapia. A expressão tumoral do IGF 1R foi associado ao tamanho do tumor invasivo, comprometimento linfonodal e a forte expressão dele foi mais relacionado a canceres mais agressivos. Este estudo ressalta a complexidade de sinalização do hétero-homodímero IGF e sua interação com tratamento endócrino, sugerindo que as combinações dos fatores envolvidos podem melhorar a seleção dos pacientes para a terapia alvo de IGF-1R<sup>32</sup>.

As implicações centrais da via IGF-1R na proliferação de células tumorais e metástase estão, principalmente, na resistência aos bloqueadores hormonais, agentes de alvo do receptor HER2 e na quimioterapia<sup>33</sup>.

### 1.3 Epidemiologia do Câncer de Mama

O câncer de mama é o segundo tipo de câncer mais comum entre as mulheres no mundo. Em 2021 foi estimado que 281.550 novos casos de câncer mamário serão diagnosticados entre as mulheres e 2.650 casos diagnosticados em homens. Aproximadamente 43.600 mulheres e 530 homens morrerão por câncer de mama em 2021. Um pouco mais da metade desses casos (53%) ocorrem em países em desenvolvimento econômico, o que representa cerca de 82% da população mundial. O relato de mortes por câncer de mama em 2018 foi de 626.700 casos no mundo<sup>34</sup>.

Existe grande variação nas taxas de incidência no câncer de mama ao redor do mundo. As maiores taxas são observadas na América do Norte, Austrália e Europa, enquanto que taxas de incidência menores, em partes da África e Ásia. Estudos sugerem que a larga variação internacional na incidência do câncer de mama reflete principalmente as diferenças do estilo de vida e a influência do meio ambiente, de forma mais importante que heranças genéticas. As baixas taxas de incidência dos países em desenvolvimento, provavelmente, também refletem baixo rastreamento e dados incompletos em sua notificação<sup>35</sup>. O Brasil, apresenta incidência de 43,74 casos por 100.000 mulheres e uma estimativa nacional para 2021 de 66.280 novos casos, no homem esta incidência é muito baixa, em cerca de 1%, não estando entre os 10 mais frequentes. No estado do Pará a incidência desta neoplasia, no ano de 2020, apresentou uma taxa bruta de 18,24/100 mil habitantes e na capital, Belém, taxa bruta de 37,80/100.000 habitantes, mostrando a distribuição desigual entre a capital e o resto do estado, com grande concentração em Belém.

A faixa etária do câncer de mama apresenta maior incidência entre 45 a 55 anos. Estudos demonstram uma incidência menor de casos novos antes dos 35 anos, embora percebamos uma onda crescente de casos novos de câncer de mama em idades mais precoces em todas as regiões do Brasil. Estatísticas indicam aumento da sua incidência tanto nos países desenvolvidos quanto países em desenvolvimento<sup>35</sup>.

Foi realizado um estudo sobre a proporcionalidade de óbitos por câncer em mulheres, em 2019, as mortes por neoplasia maligna da mama estão em primeiro lugar no país, representando 16,1% do total. Esse padrão se repete em quase todas as regiões brasileiras, na região Norte a percentagem é em torno de 13,2%. Os maiores percentuais na mortalidade proporcional por câncer de mama foram os do Sudeste (16,9%) e Centro-Oeste (16,5%), seguidos pelo Nordeste (15,6%) e Sul (15,4%)<sup>35</sup>.

O crescente aumento da incidência e mortalidade se deve, provavelmente, a grande heterogeneidade biológica dos tumores malignos mamários. Esta característica é, reconhecidamente, importante entrave à previsibilidade da resposta terapêutica, esta variabilidade observada na resposta ao tratamento e na própria evolução pode ser observada em todas as faixas etárias. Existem avanços na compreensão da carcinogênese e na biologia do câncer, no entanto, os questionamentos persistem especialmente na predição da resposta terapêutica. Usando parâmetros de prognóstico clínico comprovado, deduz-se que várias proteínas que apresentam funções celulares essenciais têm sido propostas como potenciais preditoras de resposta no câncer de mama<sup>35</sup>.

#### 1.4 Classificação Histológica do Câncer de Mama

A nova classificação de tumores da mama elaborada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2019, apresentou mudanças em relação às edições anteriores, Há o reconhecimento dos subtipos relevantes do tratamento do carcinoma invasivo, com base no estado de RE e HER2 (fator de crescimento epidérmico tipo 2)<sup>36,37</sup>.

Os tumores mamários classificados segundo a classificação de tumores malignos, 8ª edição do *Union for International Cancer Control* (UICC), se aplicam apenas aos carcinomas e tanto no câncer masculino como feminino. No caso de múltiplos tumores primários simultâneos na mesma mama o tumor com a maior categoria T deve ser usado para classificação. Os cânceres simultâneos devem ser classificados independentemente para permitir a divisão dos casos pelo tipo histopatológico.

T ( tamanho do tumor): Exame físico e imagem, por exemplo: mamografia/ us mama

N (linfonodos): Exame físico e imagens

M ( Metástases): Exame físico e imagem

TNM - Classificação Clínica

TX O tumor primário não pode ser avaliado.

T0 Não há evidência de tumor primário.

Tis Carcinoma in situ: carcinoma intraductal, ou doença de Paget do mamilo sem tumor.

T1 - Tumor de 2 cm ou menos em sua maior dimensão.

T1mic - Microinvasão de 0,1 cm ou menos em sua maior dimensão.

T1a - Mais de 0,1, porém não mais de 0,5 cm em sua maior dimensão.

T1b - Mais de 0,5 cm, porém não mais de 1 cm em sua maior dimensão.

T1c - Mais de 1 cm, porém não mais de 2 ctn em sua maior dimensão.

T2 - Tumor de mais de 2 cm, porém não mais de 5 cm em sua maior dimensão.

T3 - Tumor de mais de 5 cm em sua maior dimensão.

T4 - Tumor de qualquer dimensão, com extensão direta à parede torácica ou à pele.

T4a - Extensão à parede torácica.

T4b - Edema (inclusive "peau d'orange"), ou ulceração da pele mamária, ou nódulos cutâneos satélite confinados à mesma mama.

T4c - Ambos (T4a e T4b).

T4d - Carcinoma inflamatório.

N -Linfonodos Regionais

NX Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0 - Ausência de metástase em linfonodos regionais.

N1 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es), homolateral(ais), móvel(eis).

N2 - Metástase em linfonodo(s) axilar(es) homolateral (ais)fixo(s) uns aos outros ou a outras estruturas.

N3 - Metástase em linfonodo(s) mamário(s) interno(s) homolateral(ais).

M -Metástase à Distância

MX -A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.

M0 -Ausência de metástase à distância.

M1 - Metástase à distância.

Segundo o manual de Estadiamento do *Câncer da American Joint Committee on Cancer* (AJCC), oitava edição, 2018, a classificação TNM pode ser usada como prognóstico clínico, utilizando o grau histológico, receptores hormonais e HER 2.

**Figura 2 - Estadiamento clinico do câncer de mama segundo a AJCC, 2018.**

TNM	Grau	HER2	RE	PR	Estágio
Tis N0 M0	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Qualquer	0
T1* N0 M0 T0 N1mi M0 T1* N1mi M0	G1	Positiva	Positiva	Positiva	IA
			Negativa	Positiva	
			Negativa	Negativa	
		Negativa	Positiva	Negativa	
			Positiva	Positiva	
			Negativa	Negativa	
	G2	Positiva	Positiva	Positiva	IA
			Negativa	Positiva	
			Negativa	Negativa	
		Negativa	Positiva	Positiva	
			Positiva	Negativa	
			Negativa	Negativa	
G3	Positiva	Positiva	Positiva	IA	
		Negativa	Positiva		
		Negativa	Negativa		
	Negativa	Positiva	Positiva		
		Positiva	Negativa		
		Negativa	Negativa		

TNM	Grau	HER2	RE	PR	Estágio
T0 N1** M0 T1* N1** M0 T2 N0 M0	G1	Positiva	Positiva	Positiva	IB
Negativa			Negativa	IIA	
Positiva			Negativa		
Negativa		Positiva	Positiva	IB	
		Positiva	Negativa	IIA	
		Negativa	Negativa	IIA	
G2	Positiva	Positiva	Positiva	IB	
		Negativa	Positiva	IIA	
		Negativa	Negativa	IIA	
	Negativa	Positiva	Positiva	IB	
		Positiva	Negativa	IIA	
		Negativa	Negativa	IIA	
G3	Positiva	Positiva	Positiva	IB	
		Negativa	Positiva	IIA	
		Negativa	Negativa	IIA	
	Negativa	Positiva	Positiva	IB	
		Positiva	Negativa	IIA	
		Negativa	Negativa	IIA	

TNM	Grau	HER2	RE	PR	Estágio
T2 N1*** M0 T3 N0 M0	G1	Positiva	Positiva	Positiva	IB
			Negativa	Negativa	IIA
			Positiva	Positiva	IIA
		Negativa	Positiva	Negativa	IIA
			Positiva	Positiva	IIA
			Negativa	Negativa	IIA
	G2	Positiva	Positiva	Positiva	IB
			Negativa	Positiva	IIA
			Negativa	Negativa	IIA
		Negativa	Positiva	Positiva	IIA
			Positiva	Negativa	IIA
			Negativa	Negativa	IIA
G3	Positiva	Positiva	Positiva	IB	
		Negativa	Positiva	IIA	
		Negativa	Negativa	IIA	
	Negativa	Positiva	Positiva	IIA	
		Positiva	Negativa	IIA	
		Negativa	Negativa	IIA	

TNM	Grau	HER2	RE	PR	Estágio
T0 N2 M0 T1* N2 M0 T2 N2 M0 T3 N1*** M0 T3 N2 M0	G1	Positiva	Positiva	Positiva	IIA
			Negativa	Negativa	IIIA
			Positiva	Positiva	IIA
		Negativa	Positiva	Negativa	IIIA
			Positiva	Positiva	IIIB
			Negativa	Negativa	IIIB
	G2	Positiva	Positiva	Positiva	IIA
			Negativa	Positiva	IIIA
			Negativa	Negativa	IIIA
		Negativa	Positiva	Positiva	IIA
			Positiva	Negativa	IIIA
			Negativa	Positiva	IIIB
G3	Positiva	Positiva	Positiva	IIA	
		Negativa	Positiva	IIIA	
		Negativa	Negativa	IIIB	
	Negativa	Positiva	Positiva	IIA	
		Positiva	Negativa	IIIA	
		Negativa	Negativa	IIIB	

TNM	Grau	HER2	RE	PR	Estágio
T4 N0 M0 T4 N1*** M0 T4 N2 M0 Qualquer T N3 M0	G1	Positiva	Positiva	Positiva	IIIA
			Negativa	Negativa	IIIB
			Positiva	Positiva	
		Negativa	Positiva	Negativa	IIIC
			Positiva	Positiva	
			Negativa	Negativa	
	G2	Positiva	Positiva	Positiva	IIIA
			Negativa	Positiva	IIIB
			Negativa	Negativa	
		Negativa	Positiva	Positiva	IIIC
			Positiva	Negativa	
			Negativa	Negativa	
G3	Positiva	Positiva	Positiva	IIIB	
		Negativa	Positiva	IIIC	
		Negativa	Negativa		
	Negativa	Positiva	Positiva	IIIC	
		Positiva	Negativa		
		Negativa	Negativa		
Qualquer T Qualquer N M1	Qualquer	Qualquer	Qualquer	Qualquer	IV

Fonte: American Cancer Society. AJCC <sup>34</sup>

A atualização da OMS organizou os tumores mamários de modo amplo incluindo os tumores benignos, precursores e malignos<sup>37</sup>. Dentre os tumores malignos destacamos os principais achados na pesquisa:

Carcinoma ductal *in situ* (CDIS), que compreende três apresentações: de baixo grau nuclear, de grau nuclear intermediário e alto grau nuclear.

Carcinoma mamários invasores: Carcinoma ductal invasor (CDI) e Carcinoma lobular invasor (CLI)<sup>37</sup>.

#### 1.4.1 Carcinoma ductal *in situ*

O CDIS, ou intraductal, é clínico, radiológico e histologicamente heterogêneo e não precursor obrigatório do CDI. Aproximadamente 20% dos screening mamográficos são de CDIS, pode apresentar-se como massa ou microcalcificações agrupadas, descarga papilar ou doença de Paget. A classificação de três níveis para CDIS não indica progressão de baixo para alto grau nuclear, existem evidências que lesões de CDIS de baixo e alto grau nuclear seguem caminhos diferentes, têm diferentes perfis moleculares e genéticos, e estipulam diferentes taxas de progressão para CDI, altos níveis de instabilidade genômica são vistos no CDIS de alto grau nuclear, enquanto CDIS de baixo grau nuclear mostra menos alterações genômica. Na histopatologia CDIS é caracterizado como uma doença unifocal limitada a um sistema de ductos, mas pode se estender até os lóbulos. O CDIS foi classificado de acordo com o padrão arquitetônico e categorizado como sólido, cribriforme, micropapilar ou papilar. Alguns sistemas utilizam a presença ou ausência de comedonecrose em combinação com grau nuclear para categorização. A comedonecrose é vista como folhas de material eosinófilico granular dentro do ducto lúmen com detritos nucleares associados<sup>37;38</sup>.

CDIS de baixo grau nuclear é composto de pequenas células monomórficas, crescendo em um padrão sólido cribriforme, micropapilar, ou sólido envolvendo mais de dois espaços completos ou medindo > 2 mm. Os núcleos são uniformes em tamanho e forma, com cromatina regular e nucléolos imperceptíveis. Os núcleos CDIS de baixo grau nuclear são 1,5-2 vezes o tamanho de um eritrócito, as figuras mitóticas são raras. A microcalcificação é vista em secreções dentro dos espaços luminiais.

O CDIS de grau nuclear intermediário é composto por células que mostram variabilidade moderada em tamanho, forma e polarização. Os núcleos têm cromatina variavelmente grosseira e às vezes têm nucléolo proeminente. A necrose e figuras de mitose podem ser vista. Microcalcificações podem estar presentes em secreções e/ou em material necrosado.

CDIS de alto grau nuclear é formado por grandes células atípicas mais comumente com uma arquitetura sólida. No entanto, podem ser vistos padrões micropapilar, cribriforme. A polarização em torno dos espaços de luminárias é mínima. Os núcleos são grandes e tipicamente pleomórficos, com contornos irregulares, cromatina grosseira, e muitas vezes nucléolo proeminente. Em CDIS de alto grau, os núcleos são > 2,5 vezes o tamanho de um eritrócito de diâmetro. Mitoses são usualmente evidentes. A comedonecrose central com microcalcificação é frequentemente presente, mas não é obrigatória para o diagnóstico<sup>37;38</sup>.

#### 1.4.2 Carcinoma ductal invasor (CDI)

O CDI representa 80% a 90% dos carcinomas da mama e engloba um grande e heterogêneo grupo de neoplasias epiteliais malignas da mama. Carcinomas que mostram um padrão histológico especial em 90% dos tumores são designados como um tumor especial puro, como os carcinomas lobulares, mucinosos e tubulares. Tumores sem características específicas, são designados como carcinoma invasores NST (*no special tipe*), que responde pela maioria dos casos, aqueles com padrões mistos<sup>39</sup>. Macroscopicamente, forma um nódulo sólido ou uma área de condensação no parênquima, de coloração acinzentada ou branquicenta, com consistência de “pêra verde” ao corte (carcinoma cirroso), o que depende da quantidade de fibrose de estroma, da elastose peritumoral e da presença de necrose e de calcificações relativamente grosseiras<sup>40</sup>.

Os CDI são agrupados em subtipos definidos por biomarcadores para fins de tratamento com base no status RH e do HER 2. Apesar de características morfológicas sobrepostas, esses subtipos definidos por biomarcadores mostram resultados distintos na terapia, bem como diferenças no perfil genômico.

- RH-positivo, HER2-negativo;
- RH-positivo, HER2-positivo;
- RH-negativo, HER2-positivo;
- RH-negativo, HER2-negativo.

Os CDI formam a maior parte dos casos de câncer de mama, e suas características e manejo prognóstico são semelhantes ou ligeiramente pior. O prognóstico é profundamente influenciado pelas variáveis clássicas: idade do paciente, grau histológico tumoral, estágio tumoral, invasão linfo-vascular e TILs que são células linfoides mononucleadas infiltrando-se no tumor e seu estroma, eles refletem a resposta imune hospedeiro contra as células tumorais. Além de preditores de resposta bem definidos, como RE, RP e status HER2. O índice de proliferação KI-67 e o status AR (receptores androgênicos) mostraram ter valor prognóstico também. Aproximadamente 70-80% dos CDI são RE-positivos e 12-20% de casos são HER2 positivos.

#### 1.4.3 Carcinoma lobular invasor (CLI)

CLI é composto de células não coesivas que são mais frequentemente dispersas ou organizadas em um padrão linear de fileira única. Se apresenta uma massa palpável mal definida. Radiologicamente, o achado mais comum é massa espiculada/ou distorção de arquitetura. Tumores podem ser impalpáveis, não avaliados ao ultrassom e à mamografia e já apresentar metástases. Calcificações são pouco frequentes, mas podem aparecer em lesões adjacentes. A mamografia tem menor sensibilidade para a detecção, com taxas falsas negativas tão altas quanto 19%. A ultrassonografia é mais sensível em torno de 78-95%, embora o tamanho do tumor possa ser subestimado. A ressonância é mais útil no diagnóstico do CLI, particularmente em lesões multifocais, mas pode apresentar falsos positivos e superestimação do tamanho do tumor. A maioria das pacientes apresenta apenas um adensamento ou um endurecimento local mal definido, por vezes, surgindo como uma nodularidade palpável. O CLI tende a ser frequentemente multifocal e/ou multicêntrico. A bilateralidade é descrita em 6% a 28% dos casos, O CLI constitui de 05 a 15% de todos os carcinomas mamários<sup>37;39</sup>.

Os tumores malignos mamários apresentam grande heterogeneidade clínica e biológica, e graus de agressividade diversos, houve a necessidade de padronização da linguagem anatomopatológica com fins prognósticos e terapêuticos. Patey e Scarff em 1928 idealizaram um sistema de graduação no carcinoma mamário, em 1957 Bloom e Richardson acrescentaram uma escala numérica a este sistema de graduação e desde 1968 usamos a classificação de Scarff, Bloom e Richardson (SBR), adotada pela OMS, em 1991, o grupo de Nottingham introduziu modificações que acrescentaram parâmetros para avaliar a agressividade tumoral.

### 1.5 Graduação Histológica do Câncer de Mama

O sistema mais utilizado para graduação histológica no câncer de mama é o de Nottingham baseado no arranjo tubular, pleomorfismo nuclear e contagem mitótica<sup>41</sup>, um *score* de 01 a 03 é usado para garantir que cada fator seja avaliado independentemente. O arranjo tubular é avaliado no tumor inteiro em baixa ampliação, somente estruturas que exibem lúmen central rodeado por células neoplásicas polarizadas são contadas, os pontos de corte são 75% e 10% da área do tumor são usados para determinar o *score*, referentes a identificação da quantidade de estruturas ductais bem diferenciadas formam a lesão: grau 1 é considerado quando mais de 75% dos ductos bem diferenciados estão presentes, grau 2 quando 10% a 75% de estruturas ductais bem diferenciadas e grau 3 quando menos de 10% de formação ductal bem diferenciada.

O pleomorfismo nuclear é avaliado na área que mostra maior grau de pleomorfismo em comparação com a regularidade do tamanho e do contorno do núcleo de células epiteliais normais do tecido mamário. O aumento da irregularidade do contorno nuclear, do tamanho do núcleo e uniformidade da cromatina são usados como características adicionais determinando o *score* do pleomorfismo, este *score* varia de 01, quando o tamanho do núcleo está muito semelhante a de células epiteliais pré existentes, mostra mínimo pleomorfismo, um padrão uniforme de cromatina e nucléolo que não são visíveis ou imperceptíveis. *Score* 02 que mostra aumento do núcleo, leve a moderado pleomorfismo e nucléolo pequeno mas, visível. *Score* 03 quando o tamanho do núcleo apresenta um aumento de 02 vezes maior do que os núcleos das células epiteliais pré existentes, eles variam significativamente em tamanho e forma e muito mostram nucléolo proeminente<sup>37</sup>.

Uma mudança importante da última edição da OMS, sobre a classificação de tumores mamários é a conversão da contagem mitótica do denominador tradicional de 10 campos de alta potência para uma área definida expressa em mm<sup>2</sup>. Isso serve para padronizar a verdadeira área sobre a qual as mitoses são enumeradas, porque diferentes microscópios possuem campos de alta potência de diferentes tamanhos<sup>42</sup>. Contagem mitótica requerem padronização para uma área de campo fixo, contabilizando o número total de mitoses por campos de alta potência. A pontuação é realizada na área que apresenta a maior frequência de figuras mitóticas, normalmente a borda periférica do tumor. Se houver heterogeneidade, devem ser escolhidas regiões que apresentem maior frequência de mitoses, somente os campos com uma carga celular tumoral representativa devem ser avaliados. Os três valores são somados para produzir uma pontuação de 03 a 09, as notas são atribuídas da seguinte forma: 3-5 pontos = grau 1, bem diferenciado; 6-7 pontos = grau 2, moderadamente diferenciado; e 8-9 pontos = grau 3,

indiferenciado, com a finalidade da garantia de qualidade, recomenda-se que os componentes de pontuação individual sejam relatados, além da nota calculada. A classificação de amostras de pequenos tecidos como amostras de *core biopsy* ou punção de agulha grossa é possível e muitas vezes necessária na era do tratamento neoadjuvante, mas devemos reconhecer que há limitações, em particular devido à capacidade reduzida de avaliar com precisão a frequência mitótica. Isso pode levar a subestimar o verdadeiro grau em tal espécime<sup>37;42</sup>.

Avaliação morfológica do grau de diferenciação tem importante papel por fornecer informações úteis de prognósticos no câncer de mama. Pacientes classificadas como tumores grau I têm uma sobrevida significativamente melhor do que aqueles com tumores II e III grau ( $p < 0,0001$ ). Estes resultados demonstram que este método de classificação histológica fornece informação prognóstica importante e, se, o protocolo de classificação for seguido de forma consistente, resultados reproduzíveis podem ser obtidos. Grau histológico juntamente com o tamanho do tumor tamanho e o status linfonodal, são variáveis que nos oferecem conhecimento necessário para selecionar pacientes objetivando a terapia adequada<sup>42</sup>.

## 1.6 Subtipos Moleculares

Após o relevante estudo de Perou<sup>43</sup> utilizando “cDNA microarray” de 38 carcinomas invasivos (36 carcinomas ductais e 2 carcinomas lobulares), 1 carcinoma ductal *in situ*, 1 fibroadenoma e 3 amostras de mama normal, formou uma lista de genes “intrínsecos” cuja análise agrupada e hierarquizada mostrou a existência de quatro subtipos moleculares de câncer de mama: luminal, mama “normal-like”, HER2 e “basal-like”. A classificação molecular por microarray de DNA é baseada em análise complexa de expressão gênica, muito relevante e precisa, mas que possui restrito acesso por parte da maior parte da população, o que dificulta sua implementação na prática em larga escala. Uma classificação semelhante com modelos imunohistoquímicos, mesmo que, as vezes, imprecisa, foi mais acessível e intensamente difundida. A imunohistoquímica (IHQ) usa anticorpos (Acs) específicos contra proteínas intracelulares presentes no núcleo, no citoplasma e/ou na membrana celular, identifica o status dos receptores hormonais: estrógeno (RE) e progesterona (RP); a super expressão da proteína de membrana HER-2 e o índice de proliferação do Ki 67. São usados para esse fim os seguintes marcadores: RE, RPg, HER-2, CK 5/6, EGFR (HER-1) e Ki 67.

Os subtipos moleculares foram agrupados em: luminais A e B, HER2, basal-símile e normal like<sup>43;44</sup>. Esses perfis de expressão gênica foram reproduzidos por IHQ e posteriormente comprovados<sup>44;45</sup>.

### 1.6.1 Luminais A e B

O subgrupo de tumores luminais indicam a presença de receptores hormonais (RH) nas células tumorais, representam cerca de 2/3 dos carcinomas mamários e são considerados de grande importância prognóstica e terapêutica, dividindo os carcinomas em RH negativos e RH positivos. Os receptores hormonais são proteínas que se ligam aos hormônios circulantes, mediando seus efeitos celulares. Existem 02 tipos de RE:  $\alpha$  e  $\beta$  que são codificados por genes independentes: *Esr1* e *Esr2*, localizados nos braços cromossômicos 6q25.1 e 14q22-24, respectivamente. Os dois receptores são classificados como receptores nucleares do tipo 1, devido a localização de ambos no citosol. A sinalização depende e se inicia através da ligação com o receptor do estrogênio, no entanto a resposta transcricional específica aos receptores estrogênicos depende de múltiplos fatores. Um dos fatores importantes é a composição das proteínas correguladoras em uma determinada célula e as características dos promotores dos genes responsivos ao estrogênio. Considerando que os hormônios são moduladores da transcrição, eles necessitam que outras vias de sinalização que estejam ativas no momento da exposição do hormônio<sup>46</sup>. Os receptores  $\alpha$  estão implicados na promoção do crescimento e sobrevivência de células epiteliais mamárias, enquanto que os RE  $\beta$  estão envolvidos em propriedades de inibição do crescimento<sup>46</sup>.

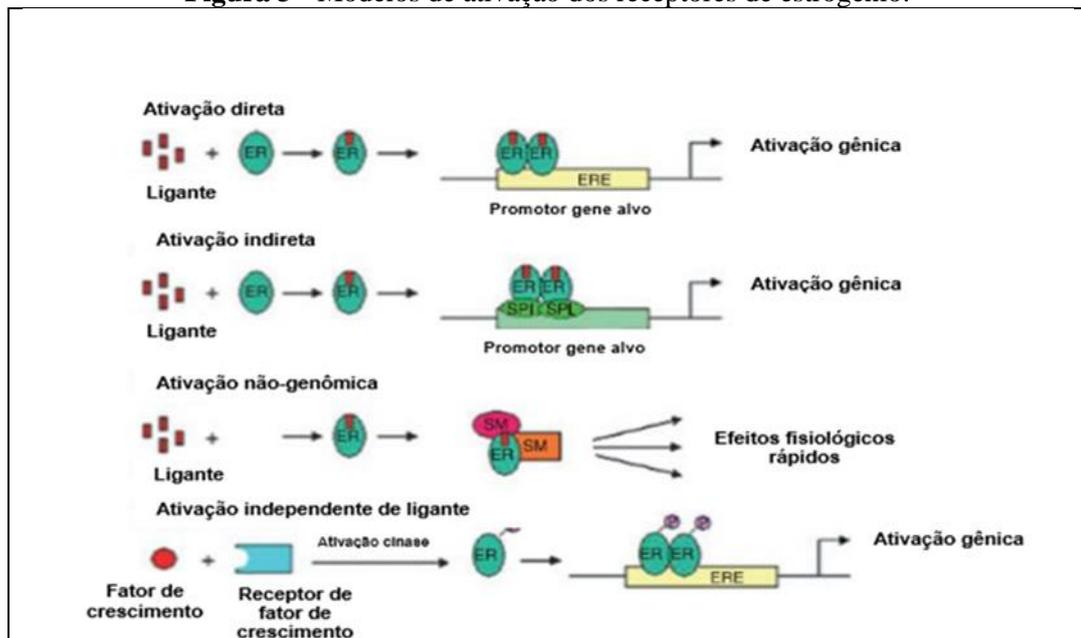
O receptor da progesterona (RP) faz parte da família dos receptores esteróides derivados do ácido retinóico. O gene para esse receptor encontra-se localizado no cromossomo 11q22-23. É importante regulador do crescimento da glândula mamária e também encontra-se envolvido na gênese de tumores malignos. Esse receptor possui duas isoformas: a isoforma "A" é capaz de inibir o gene de ativação dos receptores estrogênicos, e a isoforma "B" que tem a capacidade de ativar os RE<sup>47</sup>. A progesterona exerce ação mediadora na regulação das metaloproteinases de matriz extracelular, estimulando os fatores inibidores destas enzimas, age sobre a expressão de fatores angiogênicos e sobre os fatores que regulam o ciclo celular. Também atua por meio da estimulação de EGF e citocinas que contribuem diretamente para a carcinogênese mamária<sup>47</sup>.

Os estrogênios têm importante papel no desenvolvimento do câncer de mama, apresentam mais de um mecanismo de ação, em ligação com os receptores hormonais estimulam a proliferação das células mamárias, aumentam o número de células-alvo dentro dos tecidos, aumentam a divisão celular e a síntese de DNA elevando o risco de erros replicados os quais podem resultar na aquisição de mutações prejudiciais que interrompem processos celulares normais como a apoptose, proliferação celular ou a reparação do DNA e que além disso o metabolismo dos estrogênios conduz a fabricação de produtos genotóxicos que

poderiam diretamente danificar o DNA e novamente resultar em pontos de mutação, portanto existem evidências que o estrogênio pode, através de ambos os mecanismos, iniciar e/ou promover o câncer de mama<sup>48</sup>.

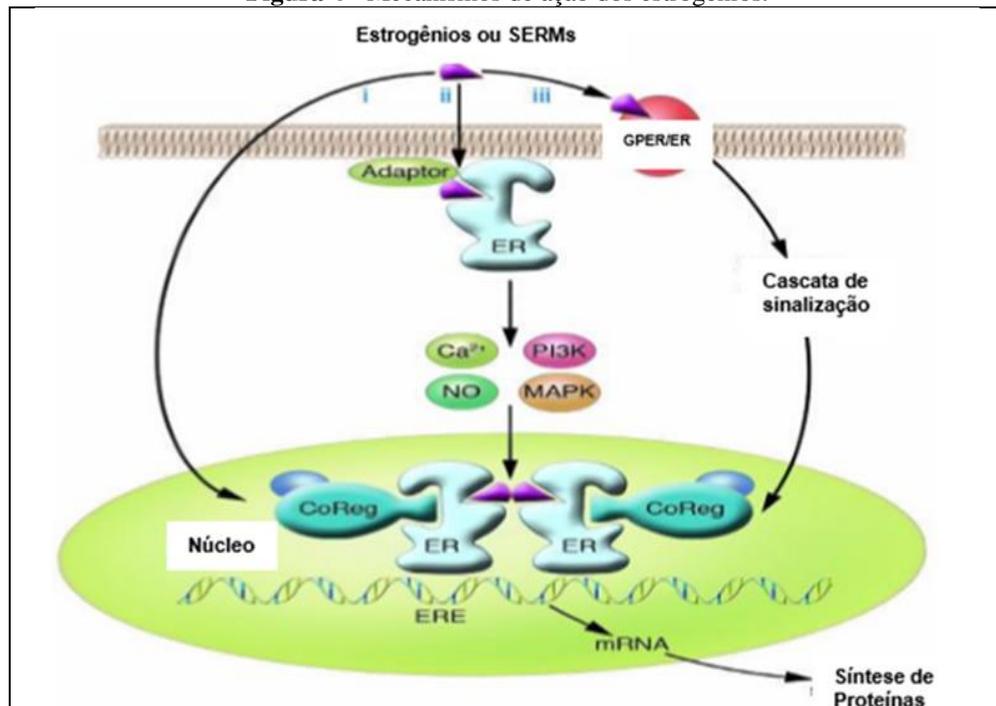
Os estrogênios mediam a transcrição gênica através de duas vias de sinalização celular: via genômica ou nuclear na qual há a difusão dentro da célula ligando-se ao RE localizado no núcleo que então liga-se a outros elementos responsivos ao estrogênio, via interação proteína-proteína com a proteína ativadora 1 (P1) ou em locais SP1 nas regiões promotoras dos genes responsivos ao estrogênio.

**Figura 3 - Modelos de ativação dos receptores de estrogênio.**



Fonte: Adaptado de Morani<sup>49</sup>.

O outro mecanismo dito não genômico ou extranuclear que ocorre através do RE localizado na membrana plasmática ou no citoplasma a partir de ativação de vias intracelulares como o aumento dos níveis de  $\text{Ca}^{2+}$  ou do óxido nítrico (NO) e a ativação das vias MAPK e PI3K, comuns aos receptores de FC com atividade tirosinoquinase<sup>49</sup>. O bloqueio da atividade do ER só é alcançado na via genômica, na via não genômica os receptores hormonais podem ser ativados mesmo na ausência do estrogênio<sup>49;50</sup>.

**Figura 4** - Mecanismos de ação dos estrogênios.

**Fonte:** Deroo e Korach<sup>36</sup>.

ER: receptor de estrogênio; Co-reg: coregulador; ERE: elemento responsivo ao estrogênio.

A observação de que o crescimento de certos tumores, principalmente aqueles derivados dos órgãos reprodutivos (mama, próstata, endométrio, ovário), é regulado pelos hormônios esteróides (estrógenos e andrógenos) e tem tido um impacto fundamental na abordagem terapêutica desse grupo de tumores. Aromatase e o RE  $\alpha$  são duas proteínas chaves para a resposta endócrina nos cânceres de mama hormônio dependentes. Aromatase é uma enzima envolvida na conversão de andrógeno (como a testosterona) em estrogênio (como 17  $\beta$ -estradiol), expressa especialmente na pós menopausa quando o androgênio, pela ação da enzima aromatase citocromo P450 (CYP19), é convertido a estrogênio na pele, músculos, tecido adiposo, e tecido mamário benigno e maligno<sup>49</sup>.

A mutação ou amplificação do RE pode causar resistência endócrina, e a fosforilação que modula a atividade de aromatase associada a ativação de vias de sinalização não genômicas são importantes mecanismos de ativação independente do ER. Suspeita-se da ativação da via não genômica quando há menor positividade ou mesmo negatividade do receptor de progesterona, maior expressão do HER1 e maior taxa de proliferação celular, conclui-se que, tomados em conjunto, estas características são fundamentais no desenvolvimento da resistência endócrina e maior risco de recorrência<sup>49;50</sup>.

Os carcinomas luminais podem ser divididos em luminal A de melhor prognóstico, mais diferenciados, com índice de proliferação (Ki67) mais baixo <14%, expressando proteínas

receptoras de estrogênio e progesterona, citoqueratinas luminais 08 e 18 e genes associados a ativação do ER como o LIV1 e a ciclina D1. Os luminais B apresentam a expressão dos receptores hormonais, índice de proliferação (Ki67) mais alto >14% e maior risco de recorrência local. Alguns perfis biológicos expressam RH e também amplificam o HER2, são os luminais híbridos ou triplo positivos estão, geralmente, associados a pior prognóstico. Dentro dos tumores Luminais podemos, ainda, quantificar o risco de bom ou mau prognóstico considerando o comprometimento axilar, o grau histológico, receptor de progesterona, a atividade proliferativa, a invasão vascular e a amplificação do HER 2 e classificá-los em grupo favorável de baixo risco e outro como de risco intermediário ou alto.

O anticorpo Ki67 (acKi67), ele age com o antígeno nuclear Ki67, está presente em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0. A imunomarcação pelo Ac Ki67 permite a determinação da fração de crescimento tumoral e a percentagem de células marcadas, portanto correlaciona-se com a fração de crescimento tumoral, determinada pelo número de células em fase S. Para a determinação de expressão do Ki67 avalia-se o percentual contados de núcleos para o antígeno Ki67. Este percentual apresenta estreita relação com a fração de crescimento das neoplasias. Este método de avaliação da proliferação celular tem sido cada vez mais utilizado, ancorado em sua validade biológica e aplicabilidade em tecido parafinado, através do anticorpo MIB-I. Ainda não há uma forma padronizada de avaliação deste marcador. Nas publicações científicas predominam os métodos de contagem, enquanto na prática diária costuma-se fazer uma estimativa do percentual de núcleos marcados pela reação imunohistoquímica. A estimativa apresentou grande concordância com a contagem, quando a área mais proliferativa era avaliada, pois esta é uma área pequena que determina uma variabilidade menor dos campos selecionados para avaliação. A concordância não foi tão elevada quando o padrão geral da neoplasia era avaliado. Os presentes resultados apontam para a validade da estimativa da fração proliferativa na prática da avaliação prognóstica em carcinoma de mama, principalmente quando selecionada a área de maior proliferação<sup>51</sup>. A análise deste índice nos permite caracterizar o grau de proliferação celular tumoral (taxa de crescimento) e, conseqüentemente, o seu grau de agressividade, maior risco de novos clones tumorais, mutações, dificultando pelo sistema imunológico a contenção tumoral<sup>52</sup>.

### 1.6.2 HER-2

O gene HER-2 está localizado no cromossomo 17q21 e tem como perfil codificar um receptor transmembrana de tirosina-quinase, é um membro da família dos EGFR ou família

HER. A amplificação deste gene está associada com a superexpressão de sua proteína na membrana das células neoplásicas, está expresso em 1/3 dos cânceres de mama. Os receptores do HER são também chamados ErbB, (proteínas tirosina-quinases transmembranosas que ligam o fator de crescimento epidérmico - EGF - e outras moléculas assemelhadas), esta terminologia se deve a descoberta de seu oncogene análogo viral (v-ErbB) na transformação leucêmica de progenitores eritróides em aves, sendo posteriormente descrito o receptor celular endógeno (c-ErbB, ou HER2)<sup>53</sup>.

Os tumores que expressam a amplificação do HER-2 apresentam fenótipo mais agressivo, geralmente com alto grau histológico, tumores maiores, com aumento da atividade mitótica, maior proliferação celular, níveis de receptores hormonais mais baixos e um pior prognóstico mesmo com linfonodos negativos e diminuição nas taxas de sobrevivência global<sup>54</sup>.

A amplificação do HER 2 pode ser detectada pela produção aumentada de proteína, através da imuno-histoquímica, diretamente pela quantificação gênica do número de cópias, pelos transcritos de RNA no citoplasma ou pela determinação sérica de fragmentos liberados da porção extracelular da molécula. São recomendadas pelo Colégio de Patologistas Americanos e pela Sociedade Americana de Oncologistas Clínicos apenas as duas primeiras técnicas. O resultado varia em 0, 1+, 2+ e 3+ , considerado positivo apenas o 3+, quando considerado duvidoso 2+ utiliza-se o estudo da amplificação do gene por FISH (hibridização *in situ* marcada por fluorescência) para confirmação da amplificação de cópias do gene HER 2.

Algumas terapêuticas foram desenvolvidas para os tumores que apresentam o aumento da expressão gênica do HER-2, a primeira descoberta de terapia alvo foi em 1998, com o Trastuzumab (Herceptin), um anticorpo monoclonal que se liga a este gene em seu domínio extracelular, depois o Lapatinib, aprovado no Brasil em 2009, esta droga é bloqueador intracelular que age nos receptores tirosina-quinase do HER-2 e no EGFR levando a um maior efeito inibitório. Posteriormente, em 2012, o Pertuzumab (Perjeta) anticorpo monoclonal recombinante humanizado com ligação em seu domínio extracelular, mas em domínio diverso do Trastuzumab, este inibe a hetero-dimerização tornando-se importante inibidor de crescimento. Em 2014 foi aprovado no Brasil o Adotrastuzumab emtansine (Kadcyla) é direcionado ao HER-2, trata-se de uma associação do Trastuzumab a um potente inibidor de microtúbulos derivado de mertansina (DM-1), esta droga possui a inibição do Trastuzumab, o efeito citotóxico do DM-1 e a especificidade para as células que expressam o HER-2<sup>55</sup>.

### 1.6.3 Basaloide / Triplo negativo

O tipo basalóide apresenta esta terminologia pela analogia com as células basais da glândula mamária mais indiferenciadas, precursoras das células epiteliais e mioepiteliais. Não apresenta expressão de receptores hormonais e nem de HER2, portanto não possuem alvo terapêutico, possuem células com alta atividade proliferativa, expressão variável de citoqueratinas basais (CK5/6 e CK17), presença de marcadores musculares lisos, expressão do receptor do fator de crescimento epidérmico tipo 1 (EGFR), c-kit e vimentina (presente em células mesenquimais). Apesar da grande similaridades alguns subtipos intrínsecos por classificação molecular e subtipos imunohistoquímicos não são iguais. Com efeito, a maior parte dos basaloides é de triplo-negativos e a maior parte dos triplo-negativos é de basaloide<sup>57</sup>. A estimativa de acerto de correspondência com o perfil basaloide aumenta quando os triplo-negativos exibem a expressão de citoqueratinas (CK) 5/6 e/ou EGFR e têm ausência de receptores androgênicos (RA). Prat e *col*<sup>57</sup>, em 2013, enfocaram especificamente esta questão - basaloides e triplo-negativos - por critérios moleculares e imunohistoquímicos. Foram testados 412 triplo negativos e 473 tumores basaloides e 21,4% e 31,5% foram identificados como não basaloides e não triplo negativos, respectivamente.

Alguns subtipos menos conhecidos como os subtipos claudin-low e o molecular apócrino também foram estudados e descritos, o perfil biológico do claudin-low foi reconhecido em 2007, são tumores também triplo-negativos, com baixa expressão de genes das claudinas 3, 4 e 7, e perda de E-caderina<sup>58</sup>. Sua frequência é estimada em 5% de todos os carcinomas de mama e sua origem está vinculada a células muito próximas hierarquicamente às primitivas células tronco-mamárias. Claudinas são proteínas transmembrana (família de 24 membros) envolvidas na adesão entre as células, e sabe-se que a downregulation de algumas delas está associada ao câncer de mama, talvez, por silenciamento epigenético, facilitando a migração celular e a invasão tecidual. Nos carcinomas claudin-low estão ausentes marcadores de diferenciação luminal, ao contrário, estas formas são ricas em marcadores de células-tronco, de células iniciadoras de câncer, de transição epitélio-mesênquima e de genes associados à resposta imune. É o tumor cujas células mais se assemelham às células-tronco<sup>59</sup>. Histologicamente, costumam ser do tipo invasivo (NST- *no specific type*), mas também podem ser medulares e/ou metaplásicos, e sobrevir em portadoras de mutação de BRCA1, têm alto grau histológico, pouca diferenciação e mostram acentuado infiltrado linfocitário.

Farmer *et al.*<sup>60</sup> descreveram o subtipo molecular apócrino em 2005. Nos primeiros casos reportados foi observada morfologia apócrina, por isto esta terminologia. No entanto, achados

apócrinos não foram mais encontrados com muita frequência por outros autores, o tumor molecular apócrino foi chamado de luminal receptor de androgênio positivo por Lehman-Che *et al.*<sup>60</sup>, que o encontraram em 10% do *pool* de carcinomas triplo-negativos. Caracteristicamente, apresenta-se como triplo-negativo pela imunohistoquímica, porém com quase 100% de expressão de receptores androgênicos (RA), os quais estão ausentes nos basal-like e claudin-low. Existe alta atividade de autofagia nas células e foi proposta uma relação direta entre níveis de RA e mutações do gene codificador da phosphatidylinositol-3 kinase (PI3K), descortinando-se novas possibilidades terapêuticas para este subtipo<sup>59;60;61</sup>.

#### 1.6.4 Normal-like

Este termo foi utilizado porque seus genes estão normalmente presentes nos tecidos epiteliais normais, talvez sua descrição tenha ocorrido pela contaminação com amostras de tecido normal. É necessário relatar que a classificação imunohistoquímica tem a limitação de deixar uma série de casos sem catalogação, devido à mistura de marcadores (exemplo: RE+ e RPg- ou RE- e RPg+). Uma força-tarefa de peritos (*The Impakt 2012 Working Group*) adotou como critério RE e/ou RPg+ para aproximação com luminal A ou B e subdividiu os luminais B em HER-2 negativos e HER-2 positivos, criando o perfil triplo-positivo por imunohistoquímica<sup>62</sup>.

### 1.7 Abordagem Terapêutica

A cirurgia e a radioterapia são a base do controle locorregional da doença e de possíveis recidivas locais e a hormonioterapia e quimioterapia estabelecem o controle sistêmico no câncer de mama, metástases e suas complicações. O tratamento sistêmico no câncer de mama, encontra-se em constante aperfeiçoamento, os quimioterápicos representam um importante papel no tratamento do câncer de mama e muitos esquemas individualizados são descritos. A quimioterapia pode ser realizada antes da cirurgia com finalidade de avaliar a resposta *in vivo*, proporcionando uma avaliação quanto ao prognóstico, reduzir o tamanho tumoral e viabilizar a possibilidade de cirurgia conservadora da mama e também nos subtipos biológicos HER superexpresso e nos triplos negativos. Como acréscimo, na dependência de status axilar, tamanho tumoral, pode ser realizada também após o tratamento cirúrgico como complemento do tratamento sistêmico.

A escolha entre cirurgias conservadoras e cirurgias radicais da mama dependem da relação entre o volume do tumor e o tamanho da mama. O tamanho tumoral é considerado o segundo fator mais importante de prognóstico da doença, traduzindo o risco cumulativo de metástases. Todas as cirurgias oncológicas mamárias por câncer de mama invasor devem ser complementadas com a abordagem axilar, seja por meio da biópsia do linfonodo sentinela (BLS) nos casos de axilas clinicamente negativas ou submetendo-a a linfadenectomia axilar nos casos em que haja a confirmação citológica prévia de um linfonodo axilar clinicamente comprometido, resultando em efetivo controle local<sup>63</sup>. Isoladamente o comprometimento de linfonodos axilares no câncer de mama é o mais importante fator prognóstico descrito, quanto maior o acometimento de linfonodos maior a chance de metastatização e menor sobrevida livre de doença, considera-se grande envolvimento axilar quando mais de 10 linfonodos encontram-se positivos para a neoplasia<sup>63</sup>.

A radioterapia é indicada no tratamento cirúrgico conservador do câncer de mama, nos tumores T3 (tumores maiores que cinco cm) e T4 (envolvimento de pele e/ou parede torácica), e em casos de linfonodos axilares comprometidos. Segundo a American Society Clinical of Oncology (ASCO) as evidências disponíveis mostram que radioterapia pós mastectomia (PMRT) reduz os riscos de falha locoregional (LRF), reduz também recorrência e mortalidade de câncer de mama para pacientes com câncer de mama T1-T2; com um a três linfonodos axilares positivos. No entanto, refere que alguns subconjuntos desses pacientes são susceptíveis de ter um baixo risco de LRF e que o benefício absoluto de PMRT compensa os efeitos de suas toxicidades potenciais. O objetivo da radioterapia após mastectomia é a limpeza de doença sub clínica na parede torácica e em linfáticos regionais em pacientes de alto risco. Pacientes com comprometimento nodal axilar após sistêmica terapia neoadjuvante devem receber PMRT<sup>64;65</sup>.

A hormonioterapia refere-se ao bloqueio hormonal nos tumores RH positivos, que pode ser usado como tratamento inicial, isolado ou em combinação, exceto nos casos de doença avançada com risco imediatamente fatal. As opções terapêuticas atuais incluem os SERMs, agentes que agem seletivamente nos receptores de estrogênio, como tamoxifeno na dose de 20 mg e o fulvestranto 250mg, intramuscular, 28/28 dias que age na ligação e no bloqueio do receptor celular de estrogênio, causando degradação da proteína deste receptor, com consequente inibição da sinalização intracelular, para pacientes com câncer de mama metastático na primeira linha, ou após falha da primeira ou segunda linhas hormonais. O uso de terapias dirigidas aos mecanismos de resistência à terapia endócrina, como inibidores de mTOR e inibidores de CDK4/6, em combinação com hormonioterapia também tem demonstrado eficácia na prática clínica<sup>66</sup>. Há ainda a supressão ovariana ou ablação com a

radioterapia pélvica, o uso de análogos do hormônios hipofisários ou a ooforectomia, recursos a serem considerada nas mulheres de elevado risco<sup>66;67;68</sup>. Para as mulheres na pós menopausa usa-se os inibidores de aromatase (IAs) não-esteroidais como o anastrozol, letrozol que é um inibidor não esteróide e o exemestano avaliado como um inativador que possui estrutura esteróide. A aromatase é um complexo enzimático da família do citocromo P-450, produto do gene CYP19, altamente expressa na placenta, células da granulosa dos folículos ovarianos e em tecidos não glandulares, incluindo gordura subcutânea, músculo, fígado, cérebro, tecido mamário normal e tumoral. A aromatase catalisa a conversão da androstenediona e a testosterona em estrona e estradiol, respectivamente<sup>69;70</sup>.

## 1.8 Receptores Hormonais e Fatores de Crescimento

Evidências sugerem que o câncer evolui ao longo de duas vias sinalizações moleculares divergentes de progressão principalmente relacionada aos receptores hormonais. Os cânceres de RE-positivos e RE-negativos são doenças fundamentalmente distintas, dentro dos cânceres RE-positivos, o grau histológico e a proliferação estão fortemente associados à extensão, complexidade e tipo de aberrações genéticas. A primeira sinalização do RE-positivo é caracterizado por ganhos de 1q, perda de 16q e infrequentes ampliações do 17q12, e uma assinatura de expressão genética que é predominantemente em populações com genes associados ao fenótipo RE-positivo. A segunda via de RE-negativo é comumente caracterizada pela perda do 13q, ganho da região cromossômica 11q13, amplificação de 17q12, e uma assinatura de expressão genética por genes associados com proliferação celular. Esta via consiste predominantemente de tumores de médio e alto grau. Mutações PI3K geralmente ocorrem em ambas as vias, e mutações TP53 são frequentes na via RE-negativa. Os RE-negativos incluem ambos os grupos HER2-positivo e HER2-negativo. Nesses grupos (todos os quais são em sua maioria de alto grau, geneticamente instável, e principalmente aneuplóides), mutações TP53 são comuns. No grupo RE-negativo, HER2-positivo, as mutações PIK3CA são muito frequentes, além da amplificação de 17q12. Nos tumores RE-negativos, HER2-negativos há alta atividade proliferativa, aumento do infiltrado imunológico, um fenótipo basal-like e mesenquimal, e deficiência na recombinação homóloga.

O 17 beta estradiol (E2) associado a receptores de membrana ou do citoplasma é rapidamente ativado por sinalização intracelular que inclui ERK, PI3K, STAT<sup>71;72</sup>. A sinalização do E2 interage com as vias do IGF-1 e do EGF, em diferentes níveis, por exemplo, através da rápida ativação dos receptores do IGF-IR e do EGFR e consequente indução da

ativação do MAPK nas células do câncer de mama. Entretanto há efeitos mitogênicos do EGF que não são mediados pelo E2 sugerindo que a relação entre as vias de sinalização do estrogênio e do EGF podem ocorrer por outros mecanismos. Um grande número de genes parece estar implicado na resposta e resistência à terapêutica hormonal.

Segundo Hou<sup>73</sup>, em nível molecular vários fatores são responsáveis pela resistência a hormonioterapia, em particular ao tamoxifeno: super expressão/ ativação do co-ativador do ER; subregulação/inibição do co-repressor do ER; ativações de mutações ou ligantes independentes da ativação do ER. Além disso, a ativação de receptores de FC como o EGFR e o HER 2 também foram identificados na resistência celular ao tamoxifeno pela indução das vias de sinalização do MAPK e do PI3K/AKT, realçando os efeitos mitogênicos e anti apoptóticos, estes aspectos fornecem resistência à célula e dão a esta habilidade de sobrevivência compensatória que é independente das vias de sinalização dos receptores de estrogênio.

Segundo Milani *et al.*<sup>74</sup> a endócrino resistência no câncer de mama tem sido correlacionada a ativação de outras vias de sinalização que incluem a IGF e o EGF, associando também a super expressão de componentes da vias de sinalização do IGF e do EGF, incluindo o EGFR, HER 2, IGR-IR e c-Src. Além disso, segundo Masuda *et al.*<sup>75</sup> indica que há um efeito bifásico do EGF sobre a proliferação celular do câncer de mama e demonstrou que a Src funciona como um gatilho da sinalização do EGF, dependendo da sua concentração. O EGF parece induzir a inibição da proliferação através da estimulação da interleucina 6 e da oncostatina M tanto nos tumores mamários receptores positivos como nos receptores negativos<sup>76;77</sup>.

## 2 JUSTIFICATIVA

A sinalização celular tem assumido relevante papel no desenvolvimento e progressão do câncer de mama. O valor da super expressão dos receptores dos FC e dos receptores hormonais na evolução clínica tem sido objeto de projetos de pesquisa ao redor do mundo. Alguns estudos já correlacionam os RH negativos ao EGFR e a IGF-1R ao aumento do IMC , entretanto não avaliaram o perfil biológico associado a prognóstico e aos fatores sócio econômicos. Há, ainda, estudos que demonstram que tumores RE positivos com aparecimento precoce de recidivas e metástases, revelando resistência ao bloqueio hormonal, provavelmente por apresentarem também super expressão das vias EGF e IGF<sup>78;79</sup>. Portanto há grande interesse no estudo destas variáveis que impactam a evolução do câncer de mama.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

- Avaliar se a expressão do RNAm e da proteína do EGFR e do IGF-IR pode influenciar perfis biológicos específicos na evolução do câncer de mama.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Avaliar a associação da expressão do EGFR e IGF-IR, com o tamanho de tumor, número de linfonodos comprometidos, índice de massa corporal (IMC), receptores de estrogênio, invasão angio linfática e *follow up*;
- Descrever características epidemiológicas das pacientes cadastradas: idade, IMC, antecedentes morbidos pessoais e familiares, tempo de acesso ao tratamento, tempo de acesso ao tratamento complementar pós tratamento inicial.

## **4 METODOLOGIA**

### **4.1 Aspectos éticos**

O estudo foi realizado de acordo com a Resolução nº 466/2012 – Diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos e Resolução 580/2018 - Especificidades éticas das pesquisas de interesse estratégico para o Sistema Único de Saúde (SUS), do Conselho Nacional de Saúde (CNS). Seu desenvolvimento teve início após aprovação do projeto pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Ophir Loyola (HOL) em, 11/11/2016, parecer nº 2016/40198, CAAE 55/2016.

### **4.2 Delineamento do Estudo/Coleta de Dados**

Após a aprovação do estudo pelo CEP, foi coletado dados de 104 pacientes portadoras de câncer de mama cadastradas no HOL, entre novembro de 2016 e janeiro de 2017, através da livre demanda, de modo aleatório e acompanhadas até dezembro de 2018.

Estas pacientes, após orientação sobre a pesquisa, assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido e foram submetidas a um questionário (Anexo 1).

As pacientes foram submetidas a cirurgia ou quimioterapia neoadjuvante segundo protocolos do Serviço de Mastologia e Oncologia do HOL. Durante o ato cirúrgico, foram separados fragmentos tumorais após a excisão da peça, incluído em meio próprio e posteriormente congelados e transferidos para a realização das análises.

Os tumores foram coletados de modo randômico, portanto previamente à análise imuno-histoquímica. Depois os dados coletados pelas pacientes e as informações colhidas nos prontuários foram cadastrados em planilha de excel contendo: registro hospitalar, idade, paridade, menarca, menopausa, uso de terapia hormonal, antecedentes pessoais e familiares, peso, altura, IMC, tempo de doença, mamografia e ultrassonografia mamária realizadas, tempo de espera do exame (considerado o tempo entre a percepção do tumor pela paciente até a realização do exame), biópsia, tempo de espera à realização da biópsia (tempo de percepção do tumor pela paciente até a realização da biópsia).

Dados clínicos patológicos: tratamento inicial (cirurgia ou quimioterapia neoadjuvante), histopatológico (incluindo: tamanho do tumor, presença ou ausência de invasão angiolinfática e/ou invasão perineural, status axilar, estadiamento patológico), estadiamento clínico,

imunohistoquímica, tratamento pós quimioterapia neoadjuvante, início da quimioterapia pós cirurgia, início da radioterapia, início da hormonioterapia, follow up com 02 anos.

Foram coletadas também fragmentos tumorais, após consentimento livre e esclarecido de 18 pacientes portadoras de tumores benignos e 04 pacientes que foram submetidas a mastoplastia redutora e avaliadas quanto a idade, paridade, menarca, menopausa, dnm, antecedentes pessoais e familiares, peso e altura. Estas coletas destinam-se ao estudo comparativo entre o valor a ser considerado como normal e a superexpressão.

### **4.3 Análise das Amostras**

As amostras foram inicialmente fixadas em formol e posteriormente incluídas em parafina, rotina utilizada comumente para a análise histopatológica do tumor por hematoxilina e eosina (H&E), e para estudo do perfil imunohistoquímico, quando avaliado à expressão de ER e progesterona, HER-2, e Ki-67 por meio do método da estreptavidina-biotina-peroxidase com anticorpos primários comerciais. Além disso, os fragmentos foram submetidos a extração do RNA mensageiro e de sua proteína, através de PCR-RFLP para o estudo dos receptores dos fatores de crescimento: EGF e IGF. Estas amostras foram processadas e armazenadas no laboratório de anatomia patológica e de biologia molecular do HOL.

A análise estatística foi realizada pelo teste *Cohen's kappa*, utilizado para avaliar os resultados de IHC. Análise de regressão logística foi utilizada para avaliar a relação entre expressão proteica, amplificação e mutação gênica e variáveis clínicas e patológicas. Análise de regressão logística multivariada pelo método de passo a passo foi utilizada para identificar variáveis que viessem ajudar a prever a resistência à quimioterapia, especialmente em tumores triplos negativos que, normalmente, apresentam pior prognóstico e à hormonioterapia em tumores que expressam receptores hormonais.

Os resultados de IHC e PCR-RFLP, assim como o fenótipo molecular, foram considerados variáveis dependentes, e a idade dos pacientes foi utilizada como covariável. Valores de  $p < 0.05$  foram considerados significantes.

### **4.4 Critérios de Inclusão e Exclusão**

Foram convidadas a participar da pesquisa portadoras de câncer de mama, do sexo feminino com tumores operáveis.

Foram excluídas mulheres portadoras de sarcomas, gestantes, lactantes.



## 5 RESULTADOS

Os resultados desta tese foram publicados na revista *Breast Cancer: Targets and Therapy* 2021:13 325–339 (Anexo II).

### 5.1 Resultados Sócio-epidemiológicos

O HOL é o único Centro de Assistência de Alta Complexidade em Oncologia (CACON) de Belém, atende pacientes do SUS acolhendo a malha terciária das neoplasias malignas da mama, no entanto ainda não dispõe de infra estrutura que permita que o intenso fluxo de pacientes de todo o estado, seja submetida à rápido início de tratamento. Foram avaliadas 125 pacientes entre 28 e 89 anos de idade, o maior número das pacientes estavam na faixa etária entre 40 e 60 anos, a extensa maioria 88,8 % gestaram e amamentaram, o IMC mais prevalente foi entre 25 e 30, no entanto se somarmos os índices acima de 25 se evidencia que 62,4% das mulheres em análise se apresentavam com sobre peso. Uma paciente abandonou o tratamento.

**Tabela 1** - Perfil sócio-epidemiológico das participantes da pesquisa, no período: novembro/2016 a janeiro/2017.

Variáveis	Número	Porcentagem	Total
<b>Idade</b>			
< 40 anos	25	20,3%	
41-60 anos	70	56%	
> 60 anos	30	24,4%	
			<b>125</b>
<b>IMC</b>			
< 25	37	29,6%	
25 – 30	42	33,6%	
> 30	36	28,8%	
Não	10	8%	
			<b>125</b>
<b>Antec pessoais</b>			
Tabagismo	27	21,6%	
Etilismo	2	1,6%	
tabagismo e etilismo	13	10,4%	
Outros	83	66,4%	
			<b>125</b>
<b>Antec familiares</b>			
CA mama	30	24%	
outros canceres	38	30,4%	
Ndn	57	45,6%	
			<b>125</b>
<b>Paridade</b>			
Nulíparas	14	11,2%	
Gestaram	111	88,8%	
			<b>125</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Os antecedentes pessoais não mostraram predomínio de fumantes ou etilistas nas pacientes avaliadas, algumas outras comorbidades, mas, sem importância estatística. No que se refere aos antecedentes familiares a predominância foi de pacientes sem histórico oncológico. A maior parte das doentes avaliadas, após a percepção da doença, apenas conseguiu realizar o exame pretendido após 04 meses de procura, pela faixa etária predominante o exame mais realizado foi a mamografia ou ambos, mamografia e ultrassonografia mamária e, mesmo com o prova radiológica, a biópsia foi realizada, em sua maioria, após 06 meses da suspeita da doença. Na nossa amostra 03 pacientes não realizaram biópsia indo diretamente ao procedimento cirúrgico com congelação intra operatória.

**Tabela 2** - perfil relacionado ao diagnóstico e tratamento das participantes da pesquisa, no período: novembro/2016 a janeiro/2017.

Variáveis	Número	Percentagem	Total
<b>Tempo de acesso ao exame</b>			
01-03 meses	35	28%	
04-06 meses	27	21,60%	
mais de 06 meses	29	23,20%	
não realizaram	34	27,20%	
			<b>125</b>
<b>Exame usado para o diagnóstico</b>			
ultrassonografia mamária	16	12,80%	
mamografia	33	26,40%	
mamografia e ultrasson	42	33,60%	
Nenhum	34	27,20%	
			<b>125</b>
<b>Tempo de acesso a biópsia</b>			
até 01 mês	12	9,60%	
02 - 06 meses	49	39,20%	
mais de 06 meses	61	48,80%	
cirurgia	3	1,60%	
			<b>125</b>
<b>Tempo para o início do tratamento</b>			
quimioterapia neoadjuvante			
até 01 mês	20	16%	
02 - 06 meses	51	40,80%	
mais de 06 meses	2	1,60%	
		58,40%	<b>73</b>
cirurgia			
até 01 mês	2	1,60%	
02 - 06 meses	28	22,40%	

mais de 06 meses	21	16,80%	51
		40,80%	

**Tabela 2** - perfil relacionado ao diagnóstico e tratamento das participantes da pesquisa, no período: novembro/2016 a janeiro/2017.

Variáveis	Número	Porcentagem	Total
<b>Cirurgia realizada</b>			
Quadrantectomia	31	25%	
Mastectomia	92	74,1%	
			<b>124</b>
<b>Início da radioterapia após cirurgia</b>			
até 01 mês	1	0,80%	
02 - 04 meses	24	19,20%	
mais de 04 meses	53	42,00%	
não realizou	47	37,60%	
			<b>125</b>
<b>Presença de IAL e/ou IPN</b>			
Sim	62	49,60%	
Não	61	48,80%	
sem neoplasia residual	2	1,60%	
			<b>125</b>
<b>Estadio no diagnóstico</b>			
estadio 1	3	2,40%	
estadio 2 <sup>a</sup>	20	16%	
estadio 2B	21	16,80%	
estadio 3 <sup>a</sup>	43	34,40%	
estadio 3B	36	28,80%	
estadio 4	0	0,00%	
tx	2	1,60%	
			<b>125</b>

Fonte: Dados da pesquisa.

Após a confirmação histopatológica, as pacientes, em sua grande maioria, foram destinadas a quimioterapia neoadjuvante, no entanto o início deste tratamento ocorreu apenas entre 02 a 06 meses após a biópsia. As que foram selecionadas para a cirurgia também só conseguiram realizá-la após 02 a 06 meses na maioria das vezes. Mais de 70% das pacientes foram submetidas a mastectomia e 26,4% ao tratamento conservador, o tratamento complementar com radioterapia apresentou um início tardio em grande número de pacientes, apenas após 04 meses após a cirurgia e a presença da invasão angiolinfática e perineural apresentou distribuição homogênea entre as pacientes. As pacientes apresentavam tumores maiores e comprometimento axillar na entrada ao nosso serviço, portanto a predominância foi do estadio III.



## 5.2 Resultados da Expressão de EGFR e IGF-1R

Foram avaliadas a expressão quantitativa de RNAm e proteína de EGFR e IGF-1R em amostras de fragmentos tumorais de 124 pacientes com câncer de mama. Identificamos os níveis de expressão genética EGFR com significância estatística ( $p < 0,001$ ) para IMC, invasão angiolímfática, linfonodos comprometidos, follow up e perfis biológicos. Pacientes com IMC  $\leq 25$ , apresentaram níveis mais elevados de EGFR [RNAm mediana (intervalo interquartil, IQR): 1,96 (1,13); mediana proteica (IQR): 1,78 (1,03)]. Observou-se também que os níveis de proteína RNAm e EGFR aumentaram mais de 1,5 vezes (pelo menos 50% de expressão) em 54,8% das amostras de tumores desses pacientes. Identificamos pacientes positivos para invasão angiolímfática com níveis mais elevados de EGFR [RNAm mediana (IQR): 2,51 (1,05); mediana proteica (IQR): 2,14 (0,92)], neste caso, o aumento dos níveis de RNAm e proteína de EGFR foi superior a 1,5 vezes em 57% dessas amostras de tumores. Os pacientes com mais de 03 linfonodos comprometidos, apresentaram maiores níveis de EGFR [RNAm mediana (IQR): 2,37 (1,27); mediana proteica (IQR): 1,91 (1,01)]. Esse aumento foi identificado mais de 1,5 vezes em 40,9% dos tumores com maior número de linfonodos. Os resultados do seguimento dos pacientes que evoluíram à óbito, apresentaram aumento significativo no EGFR [mediana do IQR): 2,57 (1,27); mediana proteica (IQR): 2,11 (1,02)]. Os níveis de RNAm e proteína de EGFR aumentaram mais de 1,5 vezes em apenas 22,6% dessas amostras de tumores. Pacientes com perfil biológico de RE negativo (40,3%) apresentaram aumento significativo no EGFR [RNAm mediano (IQR): 2,48 (1,11); mediana proteica (IQR): 1,93 (0,82)] e HER superexpresso com aumento em [RNAm mediana (IQR): 2,74 (1,86); mediana proteica (IQR): 2,62 (1,75)]. Os níveis de RNAm e proteína deste gene aumentaram mais de 1,5 vezes em 58,1% das amostras de tumores de pacientes.

Identificamos um aumento significativo no IGF-1R ( $p < 0,001$ ) apenas para as variáveis de perfil biológico. Este aumento foi no Luminal A com [mediana RNAm (IQR): 1,99 (1,18); mediana proteica (IQR): 1,81 (1,17)], no Luminal B com [mediana RNAm (IQR): 2,78 (1,87); mediana proteica (IQR): 2,47 (1,74)] e no Luminal B HER com [RNAm mediana (IQR): 1,01 (0,21); mediana proteica (IQR): 0,94 (0,24)]. Encontramos níveis de IGF-1R, RNAm e proteína, aumentados em mais de 1,5 vezes em 41,9% dessas amostras de tumores em comparação com as 22 amostras de tecido mamário normal extraído das mamoplastias redutoras.

**Tabela 3 - Perfil de RNA m e proteína do EGFR e do IGF-1R relacionado às variáveis, das participantes da pesquisa, no período de novembro/2016 a janeiro/2017.**

Characteristics	N, (%)	p-valor(a)	EGFR RNAm		EGFR Proteína		IGF-1R RNAm		IGF-1R proteína	
			RQ (Median±IQR)	p-value (b)	RQ (Median± IQR)	p-value (b)	RQ (Median± IQR)	p-value (b)	RQ (Median± IQR)	p-value (b)
<b>Idade (Anos)</b>										
18-40	26 (21.0)	< 0.001*	1.85 ± 1.06	0,286	1.71 ± 0.92	0,546	1.30 ± 0.49	0,042*	1.19 ± 0.48	0,056
41-60	68 (54.8)		1.86 ± 1.31		1.77 ± 0.93		1.43 ± 0.86		1.31 ± 0.86	
Acima de 60	30 (24.2)		1.57 ± 1.27		1.46 ± 1.24		1.81 ± 1.70		1.50 ± 1.59	
<b>Paridade</b>										
Nulípara	14 (11.3)	< 0.001*	1.98 ± 1.27	0,453	1.81 ± 0.78	0,434	1.23 ± 0.65	0,125	1.09 ± 0.60	0,109
Gestaram	110 (88.7)		1.79 ± 1.29		1.65 ± 1.08		1.45 ± 0.94		1.33 ± 0.89	
<b>Antecedentes Pessoais</b>										
Tabagismo	27 (21.8)	< 0.001*	1.59 ± 1.31	0,372	1.51 ± 0.74	0,439	1.47 ± 1.27	0,782	1.29 ± 1.31	0,698
Etilismo	2 (1.6)		1.42 ± 0.09		1.33 ± 0.08		1.92 ± 0.02		1.81 ± 0.02	
Tabagismo + Etilismo	13 (10.5)		2.46 ± 1.62		2.12 ± 1.45		1.31 ± 1.76		1.22 ± 1.63	
ndn	82 (66.1)		1.87 ± 1.16		1.77 ± 0.99		1.42 ± 0.86		1.32 ± 0.87	
<b>Antecedentes Familiares</b>										
CA mama	29 (23.4)	0,011	2.00 ± 1.24	0,413	1.84 ± 0.83	0,537	1.31 ± 1.99	0,519	1.20 ± 1.80	0,478
Outros cânceres	39 (31.5)		1.86 ± 1.33		1.71 ± 1.07		1.60 ± 1.14		1.49 ± 1.24	
ndn	56 (45.2)		1.68 ± 1.21		1.58 ± 1.12		1.43 ± 0.69		1.30 ± 0.63	
<b>IMC</b>										
≤25	47 (37.9)	< 0.001*	1.96 ± 1.13	0,049*	1.78 ± 1.03	0,027*	1.42 ± 0.78	0,831	1.29 ± 0.82	0,789
>25	68 (54.8)		1.82 ± 1.36		1.67 ± 1.09		1.46 ± 1.33		1.30 ± 1.30	
IMC não avaliado	9 (7.3)		1.35 ± 0.44		1.28 ± 0.33		1.68 ± 1.56		1.47 ± 1.52	
<b>Invasão angiolinfática</b>										
Presente	55 (44.4)	< 0.001*	2.51 ± 1.05	0,001*	2.14 ± 0.92	0,001*	1.42 ± 0.87	0,087	1.27 ± 0.90	0,072
Ausente	67 (54.0)		1.55 ± 0.61		1.41 ± 0.52		1.49 ± 0.85		1.38 ± 0.81	
Invasão Não avaliada	2 (1.6)		1.21 ± 0.17		1.18 ± 0.17		0.88 ± 0.03		0.82 ± 0.01	
<b>Linfonodos comprometidos</b>										
0	55 (44.4)	0,009	1.57 ± 1.24	0,005*	1.41 ± 0.93	0,002*	1.42 ± 1.36	0,609	1.26 ± 1.22	0,487
1 - 3	27 (21.8)		1.85 ± 0.98		1.74 ± 0.89		1.62 ± 1.38		1.52 ± 1.38	
>3	42 (33.9)		2.37 ± 1.27		1.91 ± 1.01		1.40 ± 0.53		1.25 ± 0.35	
<b>Tamanho do tumor (cm)</b>										
≤2	14 (11.3)	< 0.001*	2.12 ± 1.53	0,067	1.78 ± 1.12	0,114	1.42 ± 1.88	0,123	1.28 ± 1.80	0,282
2 - 5	69 (55.6)		1.59 ± 1.24		1.51 ± 1.00		1.54 ± 1.10		1.40 ± 0.97	
>5	41 (33.1)		2.47 ± 1.27		1.89 ± 0.97		1.33 ± 0.61		1.22 ± 0.56	
<b>Imunohistoquímica</b>										
RE >10	105 (84.7)	0,002	1.80 ± 1.28	0,718	1.61 ± 1.11	0,752	1.44 ± 1.37	0,584	1.29 ± 1.38	0,562
RE ≤10	19 (15.3)		1.96 ± 1.09		1.77 ± 0.84		1.42 ± 0.56		1.33 ± 0.56	
<b>Follow up</b>										
SLD	81 (65.3)	< 0.001*	1.59 ± 1.15	0,024*	1.51 ± 0.90	0,013*	1.60 ± 1.31	0,351	1.46 ± 1.26	0,425
Recidiva ou metástases	19 (15.3)		1.96 ± 1.20		1.80 ± 0.78		1.35 ± 0.64		1.20 ± 0.54	
Óbito	24 (19.4)		2.55 ± 1.28		2.20 ± 1.01		1.30 ± 0.28		1.23 ± 0.37	
<b>Tempo de acesso ao tratamento</b>										
1 mês	27 (21.8)	0,015	1.58 ± 1.23	0,502	1.45 ± 0.88	0,322	1.42 ± 0.79	0,396	1.33 ± 0.70	0,414
02 - 03 meses	53 (42.7)		1.89 ± 1.34		1.74 ± 1.15		1.38 ± 0.98		1.24 ± 0.92	
>03 meses	44 (35.5)		1.83 ± 1.01		1.71 ± 0.92		1.47 ± 1.21		1.37 ± 1.32	
<b>Perfil Biológico</b>										
Luminal A	25 (20.2)	< 0.001*	1.54 ± 0.65	0,001*	1.39 ± 0.61	0,001*	1.99 ± 1.18	0,001*	1.81 ± 1.17	0,001*
Luminal B	33 (26.6)		1.58 ± 1.17		1.51 ± 1.03		2.78 ± 1.87		2.47 ± 1.74	
Luminal B HER	8 (6.5)		1.38 ± 0.39		1.33 ± 0.30		1.01 ± 0.21		0.94 ± 0.24	
Tripló Negativo	50 (40.3)		2.48 ± 1.11		1.93 ± 0.82		1.25 ± 0.43		1.14 ± 0.34	
HER Super expresso	8 (6.5)		2.74 ± 1.86		2.62 ± 1.75		1.28 ± 0.36		1.19 ± 0.30	

Fonte: Dados da pesquisa.

### 5.3 Relação entre expressões EGFR e IGF-1R

Identificamos diferentes variações da expressão genética EGFR e IGF-1R nos tipos de perfis biológicos utilizando o status dos receptores de estrogênio. Por exemplo, identificamos que os níveis de EGFR, RNAm e proteína, elevaram mais de 1,5 vezes em 58,1% dos tumores

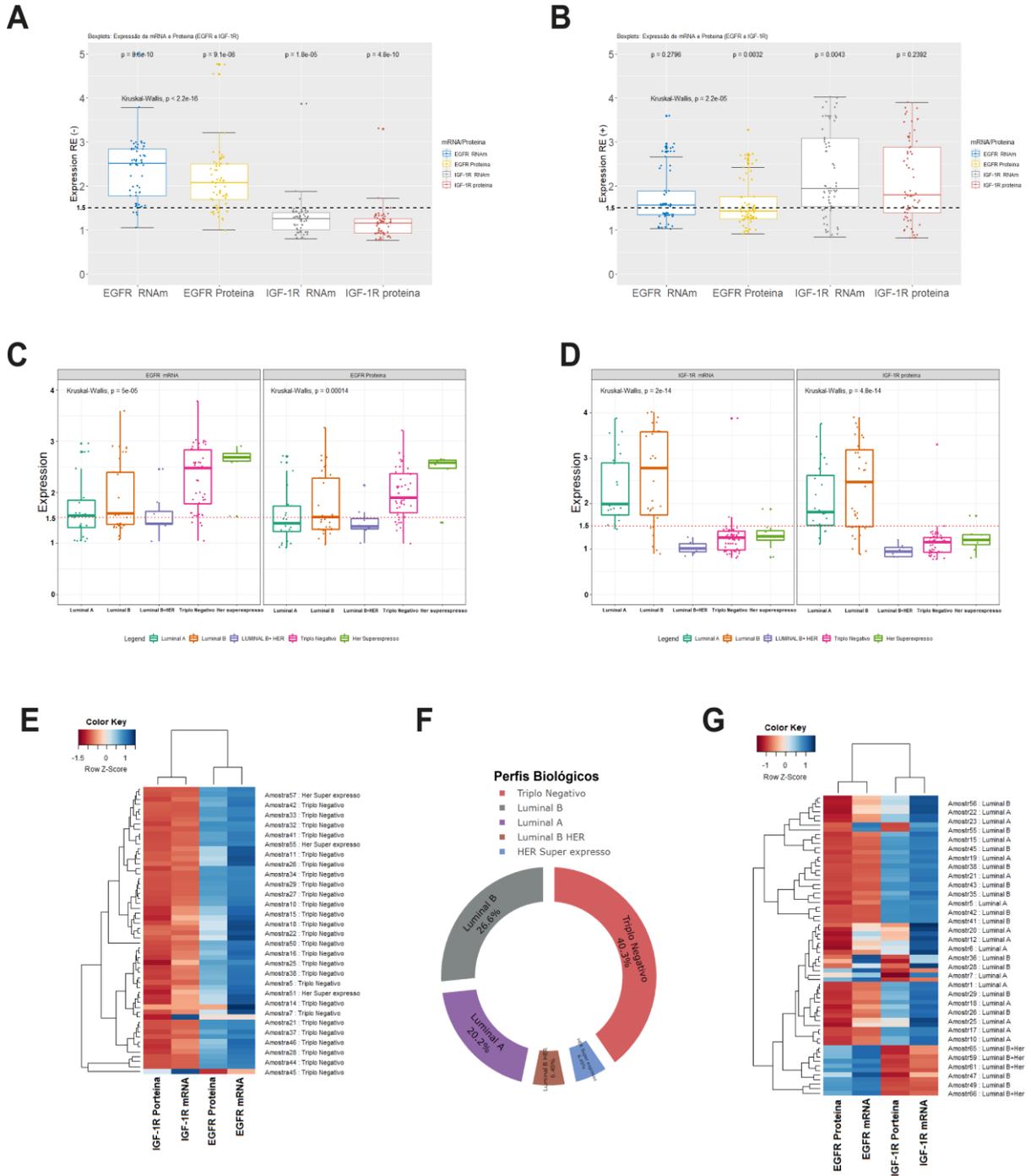
com perfis negativos de receptores. Por outro lado, os níveis de IGF-1R, RNAm e proteína, foram 1,5 vezes maiores em apenas 41,9% em tumores receptores positivos.

Nossas amostras apresentavam 46,75% de tumores RE negativos (triplo-negativo e HER) e 53,25% para receptores positivos em A luminal, B e B/HER. Analisamos a relação das expressões entre EGFR e IGF-1R através do agrupamento no mapa de calor, e se deduz desta análise a influência da expressão genética associada a receptores negativos e positivos. Os pacientes que mais expressam (>1,5 vezes) EGFR, expressavam receptores negativos e evoluíram com mau desfecho após 1 ano de tratamento. Enquanto os pacientes que mais expressam (>1,5 vezes) IGF-1R, expressam receptores positivos e são pacientes que evoluíram com sobrevida livre de doença.

#### **5.4 Análise de Sobrevivência**

Utilizou-se análise de sobrevivência para avaliar a contribuição de alta expressão do EGFR e IGF-1R para a sobrevida global das 124 pacientes estudadas. A análise da curva ROC classificou os pacientes de alta e baixa expressão, associados ao acompanhamento em dois grupos: sobrevida livre de doenças e desfecho ruim (recidiva/metástase e óbito) para avaliar o valor prognóstico desses genes após 1 ano de doença e tratamento. O ponto mais alto da curva AUC foi escolhido como ponto de corte para (EGFR: AUC = 0,891; sensibilidade = 94,2%, especificidade = 75,4% e para IGF-1R: AUC = 0,60; sensibilidade = 80,1%, especificidade = 69,5%). Sensibilidade é o percentual de verdadeiros positivos e especificidade é o percentual de verdadeiros negativos. A partir desses dados, os valores de expressão foram considerados 1,5 para ambos os destinatários. A análise kaplan-Meier mostrou que há associação entre alta expressão de EGFR (teste de classificação de log,  $p = 0,038$ ) e diminuição da sobrevida geral no grupo de pacientes que expressaram muito EGFR dentro dos perfis RE negativos (TN e HER2). Isso não aconteceu com o grupo de pacientes que expressaram IGF-1R (Teste de classificação de log,  $p = 0,0023$ ), revelando associação entre a baixa expressão IGF-1R e a diminuição da sobrevida geral dos pacientes.

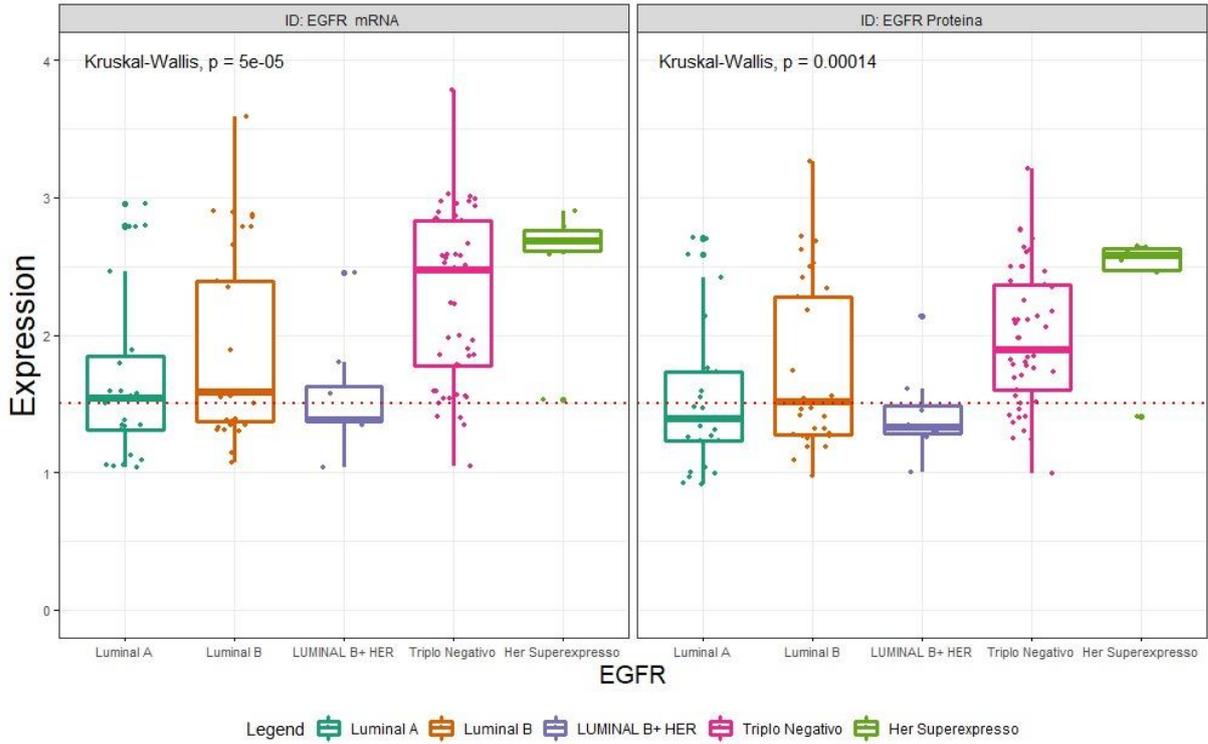
**Figura 5 - Distribuição dos perfis biológico nas amostras.**



Fonte: Dados da pesquisa.

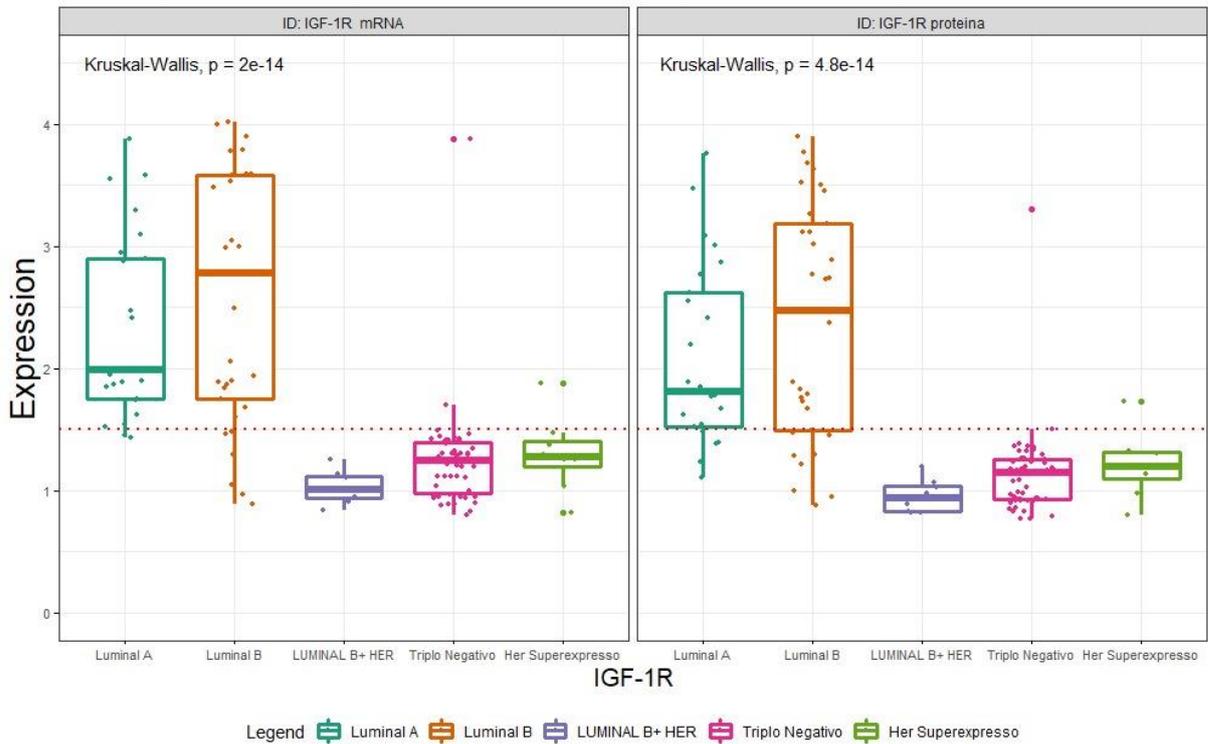
Nota: A – relação entre a expressão de EGFR RNAm e proteína e IGF-1R RNAm e proteína com os tumores receptores negativos. B- relação entre a expressão de EGFR RNAm e proteína e IGF-1R RNAm e proteína com os tumores receptores positivos. C- relação entre a expressão de EGFR RNAm e proteína e os subtipos moleculares. D- relação entre IGF-1R RNAm e proteína e os subtipos moleculares. E – relação entre os RE negativos e o EGFR RNAm e proteína e os RE positivos e o IGF-1R RNAm e proteína.

**Figura 6 -** Correlação entre o EGFR RNAm e proteína e os perfis moleculares.



Fonte: Dados da pesquisa.

**Figura 7 -** Correlação entre IGF-1R RNAm e proteína e os subtipos moleculares



Fonte: Dados da pesquisa.

## 6 DISCUSSÃO

As características moleculares do câncer de mama incluem a expressão do HER2, codificado por ERBB2, receptores hormonais, e/ou mutações BRCA. Este estudo analisou 124 pacientes com câncer de mama cujas características sociodemográficas mencionadas, estão de acordo com as estatísticas populacionais brasileiras e sul-americanas, porém a idade média de desenvolvimento do câncer de mama e do IMC é menor do que a índices do programa iniciativa norte-americana de saúde da mulher (WHI), por outro lado, o percentual de indivíduos que gestaram e amamentaram é maior neste estudo do que o WHI. Investigamos a influência da expressão genética EGFR e IGF-1R na evolução do câncer de mama, pois há indícios promissores da ativação de diferentes vias de sinalização celular pelos fatores de crescimento, atuando na progressão da malignidade, prevenção da apoptose, resistência a medicamentos e metástase. Nossos resultados da qPCR e da *western blot*, mostraram um aumento significativo na expressão EGFR para IMC, invasão angiolinfática, linfonodos comprometidos, *follow up* e perfis biológicos ( $p < 0,001$ ). A análise dessas variáveis mostrou que os níveis de EGFR RNAm e proteína aumentaram mais de 1,5 vezes nos tumores dos pacientes. Por outro lado, o aumento dos níveis de expressão do IGF-1R em mais de 1,5 nos tumores mamários das pacientes foi significativo apenas nos perfis biológicos.

Observamos que o EGFR foi mais expresso em pacientes de 41 a 60 anos, nulos, fumantes e alcoólatras, que tinham tumores maiores que 5 cm de tamanho, com mais de três linfonodos afetados, expressando uma taxa de ER <10 que evoluíram ao óbito. A análise da expressão de 58,1% das amostras tumorais desses pacientes, mostrou altos níveis de proteína EGFR em perfis triplo-negativos e superexpressão de HER. Os Triplo Negativo (TN) tem pior prognóstico, em nossos dados, encontramos expressão proteica EGFR em 40,3% (50 casos) e de HER em 6,5% (8 casos).

Consistentemente, nossa análise da sobrevida global com o estimador Kaplan-Meier mostrou que o tempo de sobrevivência para o grupo de pacientes com alta expressão de EGFR após 1 ano de tratamento foi menor do que pacientes com baixa expressão (teste de classificação de tronco,  $p = 0,038$ ). O EGFR tem sido extensivamente estudado na análise de mecanismos moleculares que regulam o tráfego endocítico e o papel desse tráfego na transdução de sinal. O papel da superexpressão/mutação do EGFR e os novos moduladores do tráfego de EGFR no câncer e a resposta à terapêutica do câncer ainda estão sendo amplamente estudados. Há hipóteses de que haja uma relação entre o tráfego do EGFR e a sobrevivência celular<sup>80</sup>. No trabalho de Jeong *et al.*<sup>81</sup>, a expressão aberrante de EGFR foi associada com o pior prognóstico

em cânceres de mama RH + e especialmente com o subtipo Luminal B. Ele conclui que a diminuição ou perda dos RH induzida pela ativação EGFR leva a resistência ao tamoxifeno e que o EGFR pode ser um alvo terapêutico para superar a recorrência do câncer de mama RH + com expressão de EGFR elevada. Nesta pesquisa encontramos 27 pacientes que evoluíram à obito, dentre elas apenas 07 eram receptores positivos, mesmo as 42 mulheres que apresentaram maus eventos: recidiva ou metástase, apenas 13 eram luminais.

A expressão e a atividade de tirosina quinases no IGF-1R, no EGFR e HER 2 estão significativamente aumentados em cânceres de mama mais resistentes. A ativação das vias de proteína ativada por mitogênio (MAPK) e fosfoinositida 3-kinases (PI3K)/AKT pelo EGFR e pelo HER2 contribui para a fosforilação de RE  $\alpha$  e esta pode afetar a resposta à hormonioterapia. A perda de expressão RE- $\alpha$  é observada em 15-20% dos pacientes com câncer de mama metastático<sup>81</sup>. Estudos anteriores sugeriram que os resultados decepcionantes dos ensaios clínicos de fase II podem estar associados à incapacidade de identificar populações adequadas para prever os benefícios dos inibidores do EGFR. O estudo avaliou a expressão de EGFR e seu valor como um fator prognóstico para investigar a possibilidade de terapia EGFR-alvo para pacientes com câncer de mama ER +. Nos resultados deste estudo de Jeong, as taxas de sobrevida de pacientes com câncer de mama EGFR e ER+ foram piores do que os pacientes com câncer de mama ER+ sem a super expressão do EGFR. Além disso, o co-tratamento com tamoxifeno e gefitinib sinérgicamente aumentou a morte de células apoptóticas em EGFR e ER + câncer de mama in vivo e in vitro. Portanto, demonstramos que a terapia combinada com inibidores de tirosina (TKIs) e o tamoxifeno contra o EGFR e RH +, foi mais eficaz do que o tratamento único para pacientes com câncer de mama EGFR e ER (+).

A IGF-1R foi expressa mais em pacientes com mais de 60 anos de idade que tiveram filhos e alcoólatras, tumores entre dois e cinco centímetros de tamanho, com um e até três linfonodos afetados, expressando uma taxa de ER >10. A coorte de amostras com maior expressão de IGF-1R teve um aumento na sobrevida livre de doenças. A análise de expressão mostrou 41,9% das amostras de tumores com altos níveis de proteína IGF-1R com perfis biológicos de luminal A e B. Em nossos dados, encontramos a maior expressão IGF-1R em luminal B com 26,6% (33 casos), luminal A com 20,2% (25 casos) e HER B luminal com 6,5% (apenas oito casos), respectivamente.

Na avaliação do RNAm e RNAProteína do IGF-1R, este apresentou super expressão mais predominantemente no perfil biológico Luminal B, no estudo de Lee *et al.*<sup>82</sup> pacientes com câncer de mama tendem a apresentar altos níveis no soro de IGF-1 e a ativação da assinatura do gene IGF tem sido observada em linhas de células de câncer de mama triplo-

negativas ou basais. Além disso, há evidências que o IGF-1R altamente expresso foi fortemente associado à recorrência precoce de tumores, a ativação da sinalização de IGF-1R reduz a susceptibilidade das células tumorais às quimioterapias; ambos os resultados resultam da indução de marcadores pluripotentes. Portanto, a sinalização do IGF continua a ser um alvo terapêutico promissor para as células tronco do câncer e para as doenças quimioresistentes.

Uma hipótese para explicar a redução da sobrevida no grupo de pacientes com expressão reduzida de IGF-1R pode ser explicada pela possibilidade de que esses tumores que expressam receptores hormonais e evoluíram de eventos desfavoráveis durante a hormonioterapia, apresentam uma expressão desregulada do IGF-1R. A expressão reduzida do IGF-1R nas células malignas está associada à diminuição da expressão e-cadherina e ao aumento da motilidade celular, a E-cadherin é frequentemente expressa em células epiteliais da mama e sua presença está relacionada a um fenótipo não metastático, portanto a diminuição dos níveis de expressão de E-cadherina no câncer de mama estão associadas a indicadores prognósticos ruins.

Enquanto isso, o tempo de sobrevivência do grupo de pacientes com alta expressão de IGF-1R foi maior em comparação com pacientes com baixa expressão (teste de classificação de log,  $p = 0,0023$ ). Esse resultado confirma a influência do EGFR em pacientes com RE negativos, com alta sensibilidade (94,2%) e especificidade (75,4%) em contraste com a diminuição da sensibilidade (80,1%) e especificidade (69,5%) do IGF-1R na curva ROC, revelando associação entre baixa expressão IGF-1R e diminuição da sobrevida geral para o grupo de pacientes.

## **7 CONCLUSÃO**

Condições desfavoráveis na evolução do câncer de mama podem ocorrer devido à combinação de alterações genéticas/epigenéticas, incremento das vias de sinalização dos FC que se cruzam com a sinalização alterada/estimulada dos RE. Concluimos que os subtipos moleculares RE negativos e que superexpressam EGFR, tendem a evoluir mal (recidiva, metástase ou morte) e que a análise da expressão de EGFR e IGF-1R associadas às características clínicas dos pacientes, isoladas ou em conjunto, influenciou a evolução da câncer de mama.

## REFERÊNCIAS

- 1 MENDELSON, J *et al.* Oncogenes and signal transduction. *In: MENDELSON, J et al.* (ed). **The Molecular basis of cancer**. 2th ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2001. p. 115-133,
- 2 HANAHAN, D; WEINBERG, RA. The hallmarks of cancer - next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, Marc. 2011. DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2011.02.013>.
- 3 MAREEL, M; LEROY, A. Clinical, cellular and molecular aspects of câncer invasion. **Physiol Rev.**, v. 83, n. 2, p. 337-376, 2003. DOI 10.1152/physrev.00024.2002.
- 4 GACCHE, RN. Compensatory angiogenesis and tumor refractoriness. **Oncogenesis**, v. 4, n. 6, p. e1532015. DOI 10.1038/oncsis.2015.14.
- 5 MARYÁŠ, J *et al.* Proteomics in investigation of cancer metastasis: functional and clinical consequences and methodological challenges. **Proteomics.**, v. 14, n. 4-5, p. 426-440. DOI 10.1002/pmic.201300264
- 6 SUKUMAR, J *et al.* Triple-negative breast cancer: promising prognostic biomarkers currently in development. **Expert Rev Anticancer Ther.**, v. 21, n. 2, p. 135-148, 2021. DOI 10.1080/14737140.2021.1840984
- 7 EL-KHAYAT, SM *et al.* The effect of metformin when combined with neoadjuvant chemotherapy in breast cancer patients. **Med Oncol.**, v. 39, n. 1, p. 1. Nov. 2021. DOI 10.1007/s12032-021-01599-3.
- 8 GRÜNWARD, V; HIDALGO, M. Developing inhibitors of the epidermal growth factor receptor for cancer treatment. **J Natl Cancer Inst.**, v. 95, n. 12, p. 851-867, 2003. DOI 10.1093/jnci/95.12.851
- 9 ANG, KK *et al.* Impact of epidermal growth factor receptor expression on survival and pattern of relapse in patients with advanced head and neck carcinoma. **Cancer Res.**, v. 62, n. 24, p. 7350-7356, 2002.
- 10 MENDELSON, J. The epidermal growth factor receptor as a target for cancer therapy. **Endocr Relat Cancer**, v. 8, n. 1, p. 3-9, 2001. DOI 10.1677/erc.0.0080003.
- 11 UMEKITA, Y; OHI, Y; SAGARA, Y; YOSHIDA, H. Co-expression of epidermal growth factor receptor and transforming growth factor- $\alpha$  predicts worse prognosis in breast-cancer patients. **Int J Cancer.**, v. 89, n. 6, p. 484-487, 2000. DOI 10.1002/1097-0215(20001120)89:6<484::aid-ijc3>3.0.co;2-s.
- 12 MEIERJOHANN, S *et al.* MMP13 mediates cell cycle progression in melanocytes and melanoma cells: in vitro studies of migration and proliferation. **Mol Cancer.**, v. 9, p. 201, Jul. 2010. DOI 10.1186/1476-4598-9-201.
- 13 PINES, G *et al.* EGFRvIV: a previously uncharacterized oncogenic mutant reveals a kinase autoinhibitory mechanism. **Oncogene**, v. 29, n. 43, p. 5850-60, 2010.

- 14 ABELLA JV; PARK M. Breakdown of endocytosis in the oncogenic activation of receptor tyrosine kinases. **Am J Physiol Endocrinol Metab.**, v. 296, n. 5, p. E973-E984, 2009. DOI 10.1152/ajpendo.90857.2008
- 15 SI, Y *et al.* Anti-EGFR antibody-drug conjugate for triple-negative breast cancer therapy. **Eng Life Sci.**, v. 21, n. 1-2, p. 37-44. Oct 2020. DOI 10.1002/elsc.202000027.
- 16 KIM, HS *et al.* Insulin-like growth factor-binding protein 3 induces caspase-dependent apoptosis through a death receptor-mediated pathway in MCF-7 human breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 64, n. 6, p. 2229-2237. 2004. DOI 10.1158/0008-5472.can-03-1675.
- 17 HAKUNO, F; TAKAHASHI, S. 40 Years of IGF1: IGF1 receptor signaling pathways. **J Mol Endocrinol.**, 2018. v. 61, n. 1, p. T69-T86, Jul. 2018. DOI 10.1530/JME-17-0311.
- 18 ENDOGENOUS HORMONES AND BREAST CANCER COLLABORATIVE GROUP; KEY, TJ; APPLEBY, PN; REEVES, GK, RODDAM, AW. Insulin-like growth factor 1 (IGF1), IGF binding protein 3 (IGFBP3), and breast cancer risk: pooled individual data analysis of 17 prospective studies. **Lancet Oncol.**, v. 11, n. 6, p. 530-542, 2010. doi:10.1016/S1470-2045(10)70095-4.
- 19 PANDINI, G *et al.* Insulin/insulin-like growth factor I hybrid receptors have different biological characteristics depending on the insulin receptor isoform involved. **J Biol Chem.**, v. 277, n. 42, p. 39684-39695, 2002. DOI 10.1074/jbc.M202766200
- 20 ZHANG, X; YEE, D. Tyrosine kinase signalling in breast cancer: insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 2, n. 3, p. 170-5, 2000. DOI 10.1186/bcr50.
- 21 AHMAD, S; SINGH, N; GLAZER, RI. Role of AKT1 in 17beta-estradiol- and insulin-like growth factor I (IGF-I)-dependent proliferation and prevention of apoptosis in MCF-7 breast carcinoma cells. **Biochem Pharmacol.**, v. 58, n. 3, p. 425-430. 1999. DOI 10.1016/s0006-2952(99)00125-2
- 22 BAKER, J; LIU, JP; ROBERTSON, EJ; EFSTRATIADIS, A. Role of insulin-like growth factors in embryonic and postnatal growth. **Cell.**, v. 75, n. 1, p. 73-82, 1993.
- 23 SHEPPARD, MC. Growth hormone – from molecule to mortality. **Clinical Medical**, v. 4, n. 5, p. 437-40, 2004.
- 24 FIRTH, SM; BAXTER, RC. Cellular actions of the insulin-like growth factor binding proteins. **Endocr Rev.**, v. 23, n. 6, p. 824-854, 2002. DOI 10.1210/er.2001-0033.
- 25 SIDDLE, K *et al.* Specificity in ligand binding and intracellular signaling by insulin and insulin-like growth factor receptors. **Biochem Soc Trans.**, v. 29, n. Pt 4, p. 513-525, 2001. DOI 10.1042/bst0290513.
- 26 DE MEYTS, P; WHITTAKER, J. Structural biology of insulin and IGF-1 receptors: implications for drug design. **Nat Rev Drug Discov.**, v. 1, n. 10, p. 769-783, 2002. doi:10.1038/nrd917.

- 27 PASHA, MK; JABEEN, I; SAMARASINGHE, S. 3D QSAR and pharmacophore studies on inhibitors of insuline like growth factor 1 receptor (IGF-1R) and insulin receptor (IR) as potential anti-cancer agents. **Biology**, v. 22, p. 100019, 2022. DOI <https://doi.org/10.1016/j.crchbi.2022.100019>.
- 28 SØRENSEN, H *et al.* Mapping of the insulin-like growth factor II binding site of the Type I insulin-like growth factor receptor by alanine scanning mutagenesis. **FEBS Lett.**, 2004;v. 565, n. 1-3, p. 19-22, 2004. DOI 10.1016/j.febslet.2004.03.077.
- 29 POLLAK, MN; SCHERNHAMMER, ES; HANKINSON, SE. Insulin-like growth factors and neoplasia. **Nat Rev Cancer**, v. 4, n. 7, p. 505-518, 2004. DOI 10.1038/nrc1387.
- 30 IBRAHIM, YH; YEE, D. Insulin-like growth factor-I and cancer risk. **Growth Horm IGF Res.**, v. 14, n. 4, p. 261-269. 2004. DOI 10.1016/j.ghir.2004.01.005.
- 31 JENKINS, PJ; BUSTIN, SA. Evidence for a link between IGF-I and cancer. **Eur J Endocrinol.**, v. 151, Suppl 1, p. S17-S22, 2004. DOI 10.1530/eje.0.151s017.
- 32 BJÖRNER, S. Combined and individual tumor-specific expression of insulin-like growth factor-I receptor, insulin receptor and phospho-insulin-like growth factor-I receptor/insulin receptor in primary breast cancer: Implications for prognosis in different treatment groups. **Oncotarget.**, v. 8, n. 6, p. 9093-9107, Feb. 2017. DOI 10.18632/oncotarget.
- 33 IANZA, A; SIRICO, M; BERNOCCHI, O; GENERALI, D. Role of the IGF-1 Axis in Overcoming Resistance in Breast Cancer. **Front Cell Dev Biol.**, v. 9, p. 641449. Mar. 2021. DOI 10.3389/fcell.2021.641449.
- 34 AMERICAN CANCER SOCIETY, 2021.  
<https://www.cancer.org/content/dam/CRC/PDF/Public/8577.00.pdf>
- 34 INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (INCA). **Tipos de Câncer: Câncer de mama**. Rio de janeiro. 9 set. 2021. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>. Acesso em: 06 out. 2021.
- 35 DEROO, BJ; KORACH, KS. Estrogen receptors and human disease. **J Clin Invest.**, v. 116, n. 3, p. 561-70, Mar. 2006. doi: 10.1172/JCI27987.
- 36 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Breast tumours: WHO Classification of Tumours**. 5th. ed. Lyon (France): International Agency for Pesearch on Cancer, 2019. v. 2. (WHO classification of tumours series). Available from: <https://publications.iarc.fr/581>.
- 37 PINDER, SE; HARRIS, G; O'MALLEY, FP. Invasive carcinoma – special types. *In*: O'MALLEY, FP; PINDER, SE; Mulligan, AM (ed.). **Breast Pathology: A volume in the Foundations in Diagnostic Pathology series**. Philadelphia: Saunders, 2011. p. 227-59.
- 38 GOBBI, H. Classificação dos tumores da mama: atualização baseada na nova classificação da Organização Mundial da Saúde de 2012. **J Bras Patol Med Lab.**, v. 48, n. 6, p. 463-474, dez. 2012.

- 39 CHAGAS, CR (ed.) *et al.* **Tratado de Mastologia**. São Paulo: Thieme Revinter, 2011. Cap. 35/42.
- 40 ELSTON, CW; ELLIS, IO. 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. **Histopathology**, v. 19, n. 5, p. 403-410. 1991. DOI 10.1111/j.1365-2559.1991.tb00229.x
- 41 TAN, PH *et al.* The 2019 World Health Organization classification of tumours of the breast. **Histopathology**, v. 77, n. 2, p. 181-185 Aug. 2020. DOI 10.1111/his.14091.
- 42 PEROU, CM *et al.* Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-752, 2000. DOI 10.1038/35021093.
- 43 SØRLIE, T *et al.* Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 98, n. 19, p. 10869-10874, 2001. DOI 10.1073/pnas.191367098
- 44 SØRLIE T *et al.* Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. **BMC Genomics**, v. 7, p. 127, May 2006. DOI 10.1186/1471-2164-7-127
- 45 HELDRING, N *et al.* Estrogen receptors: how do they signal and what are their targets. **Physiol Rev.**, v. 87, n. 3, p. 905-931, 2007. DOI 10.1152/physrev.00026.2006
- 46 LINHARES, JJ *et al.* Polymorphism in genes of the progesterone receptor (PROGINS) in women with breast cancer: a case-control study. **Rev Bras Ginecol Obst** [online], v. 27, n. 8, p. 473-478, 2005. Available from: <https://doi.org/10.1590/S0100-72032005000800007>. Accessed: 6 Feb. 2022.
- 47 VIEDMA-RODRÍGUEZ, R *et al.* Mechanisms associated with resistance to tamoxifen in estrogen receptor-positive breast cancer (review). **Oncol Rep.**, 2014; v. 32, n. 1, p. 3-15, 2014. doi:10.3892/or.2014.3190
- 48 MORANI, A; WARNER, M; GUSTAFSSON, JA. Biological functions and clinical implications of oestrogen receptors alfa and beta in epithelial tissues. **J Intern Med.**, v. 264, n. 2, p. 128-142, 2008. DOI 10.1111/j.1365-2796.2008.01976.x.
- 49 ZHOU, BP; HUNG, MC. Dysregulation of cellular signaling by HER2/neu in breast cancer. **Semin Oncol.**, v. 30, 5 Suppl 16, p. 38-48, 2003. DOI10.1053/j.seminoncol.2003.08.006.
- 50 LOURENÇO, SQC *et al.* Histological classifications of oral squamous cell carcinoma: a review of the proposed systems. **Rev. bras. Cancerol**, v. 53, n. 3), p. 325-333, jul.-set. 2007.
- 51 LIPS, SM *et al.* Breast cancer subtyping by immunohistochemistry and histological grade outperforms breast cancer intrinsic subtypes in predicting neoadjuvant chemotherapy response. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 140, n.1, p.63-71, jul. 2013. DOI 10.1007/s10549-013-2620-0.

- 52 BRAVATA, V *et al.* “Omics” of HER-2 positive breast cancer. **OMICS: A Journal of Integrative Biology**, v.17, n.13, p.119-129, Mar. 2013. DOI 10.1089/omi.2012.0099.
- 53 RECONDO, G *et al.* Therapeutic options for HER-2 positive breast cancer ; Perspectives and future directions. **World J Clin Oncol.**, v. 5, n. 3, p. 440-454, 2014. DOI 10.5306/wjco.v5.i3.440.
- 54 FRUTUOSO, C *et al.* Valor prognóstico das proteínas p53, C-erB-2 E Ki67 no carcinoma do ovário [Prognosis value of p53, C-erB-2 and Ki67 proteins in ovarian carcinoma]. **Acta Med Port.**, 2001;v. 14, n. 3, p. 277-283.
- 55 BARROS, A; LEITE, K. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea Molecular classification of breast cancer: a contemporary view. **Rev Bras Mastologia.**, v. 25, n. 4, p. 146-55, 2015.
- 56 PRAT, A *et al.* Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triplenegative breast cancer. **Oncologist.**, v. 18, n. 2, p.123-133, 2013. DOI 10.1634/theoncologist.2012-0397.
- 57 HERSCHKOWITZ, JI *et al.* Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. **Genome Biol.**, v. 8, n. 5, p. R76, 2007. DOI 10.1186/gb-2007-8-5-r76.
- 58 PRAT, A *et al.* Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. **Breast Cancer Res.**, v. 12, n. 5, p. R68, 2010. DOI 10.1186/bcr2635.
- 59 LEHMAN-CHE, J *et al.* Molecular apocrine breast cancers are aggressive estrogen receptor negative tumors overexpressing either HER-2 or GCDFP15. **Breast Cancer Res.**, v. 15, n. 3, p. R37, May 2013. doi:10.1186/bcr3421.
- 60 FARMER, P *et al.* Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene* 24, 4660–4671 (2005). <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1208561>
- 61 GUIU, S *et al.* Molecular subclasses of breast cancer: how do we define them? The IMPACT 2012 Working Group Statement. **Ann Oncol.**, v. 23, n. 12, p. 2997-3006, 2012. DOI 10.1093/annonc/mds586.
- 62 ELUF-NETO, J. Controle do Câncer de Mama - Documento de Consenso [Consensus for the Management of Breast Cancer]. **Rev Bras Cancerol.**, v. 50, n. 2, p. 77-90, 2004.
- 63 AMERICAN SOCIETY OF CLINICAL ONCOLOGY. <https://www.asco.org/practice-patients/guidelines/breast-cancer>
- 64 MA, C *et al.* Mechanisms of aromatase inhibitors resistance. **Nat Rev Cancer**, v. 15, p. 261-75, 2015. DOI <https://doi.org/10.1038/nrc3920>.
- 65 SMITH, RA *et al.* Cancer screening in the United States, 2011: A review of current American Cancer Society guidelines and issues in cancer screening. **CA Cancer J Clin.**, v. 66, n. 2, p. 96-114, 2016. DOI10.3322/caac.21336.

- 66 ROBERTSON, JF. Fulvestrant (Faslodex) - how to make a good drug better. **Oncologist.**, v. 12, n. 7, p. 774-784, 2007. DOI 10.1634/theoncologist.12-7-774.
- 67 HOWELL, A *et al.* Fulvestrant, formerly ICI 182,780, is as effective as anastrozole in postmeno-pausal women with advanced breast cancer progressing after prior endocrine treatment. **J Clin Oncol.**, v. 20, n. 16, p. 3396-403, 2002. DOI 10.1200/JCO.2002.10.057
- 68 CLEMONS, M; GOSS, P. Estrogen and the risk of breast cancer. **N Engl J Med.**, v. 344, n. 4, p. 276-85, 2001. DOI 10.1056/NEJM200101253440407.
- 69 LEITE, CAVG. Receptores Tirosina-quinase: implicações terapêuticas no câncer. **Rev Bras Oncol Clín.**, v. 8, n. 29, jul./ago./set. 2012.
- 70 CARDOSO, F *et al.* ESO-ESMO 2nd international consensus guideline for advanced breast cancer (ABC2). **Breast**, v. 23, n. 5, p. 489-502, 2014. DOI10.1016/j.breast.2014.08.009.
- 71 FOX, EM; DAVIS, RJ; SHUPNIK, MA. ERbeta in breast cancer--onlooker, passive player, or active protector? **Steroids**, v. 73, n. 11, p. 1039-51, Oct. 2008. DOI 10.1016/j.steroids.2008.04.006.
- 72 HOU, MF *et al.* Decreased Total MKP-1 Protein Levels Predict Poor Prognosis in Breast Cancer. **World J Surg.**, v. 36, n. 8, p. 1922-1932, Aug. 2012. DOI 10.1007/s00268-012-1608-y.
- 73 MILANI, A; GEUNA, E; MITTICA, G; VALABREGA, G. Overcoming endocrine resistance in metastatic breast cancer: Current evidence and future directions. **World J Clin Oncol.**, v. 5, n. 5, p. 990-1001. Dec. 2014. DOI 10.5306/wjco.v5.i5.990.
- 74 MASUDA, H *et al.* Role of epidermal growth factor receptor in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat.**, v. 136, n. 2, p. 331-345, 2012. DOI 10.1007/s10549-012-2289-9.
- 75 WITZIG, TE *et al.* Detection of circulating cytokeratin-positive cells in the blood of breast cancer patients using immunomagnetic enrichment and digital microscopy. **Clin Cancer Res.**, v. 8, n. 5, p. 1085-1091, 2002.
- 76 YAO, W *et al.* EBP50 inhibits EGF-induced breast cancer cell proliferation by blocking EGFR phosphorylation. **Amino Acids**, v. 43, n. 5, p. 2027-2035, 2012. DOI 10.1007/s00726-012-1277-z.
- 77 SHUPINIK, MA. Crosstalk between steroid receptors and the c-Src- receptor tyrosine kinase pathways: implications for cell proliferation. **Oncogene**, v. 23, n. 48, p. 7979-7989, 2004. DOI 10.1038/sj.onc.1208076.
- 78 GEE, JM *et al.* Epidermal growth factor receptor/HER2/insulin-like growth factor receptor signaling and estrogen receptor activity in clinical breast cancer. **Endocr Relat Cancer**, v. 12, Suppl 1, p. S99-S111, 2005. DOI 10.1677/erc.1.01005.
- 79 TOMAS, A; FUTTER, CE; EDEN, ER. EGF receptor trafficking: consequences for signaling and cancer. **Trends Cell Biol.**, v. 24, n. 1, p. 26-34, 2014. DOI 10.1016/j.tcb.2013.11.002.

- 80 JEONG, Y *et al.* EGFR is a Therapeutic Target in Hormone Receptor-Positive Breast Cancer. **Cell Physiol Biochem.**, v. 53, n. 5, p. 805-819, 2019. DOI 10.33594/000000174.
- 81 LEE, KL; KUO, YC; HO, YS; HUANG, YH. Triple-Negative Breast Cancer: Current Understanding and Future Therapeutic Breakthrough Targeting Cancer Stemness. **Cancers (Basel)**, v. 11, n. 9, p. 1334, Sep 2019. DOI 10.3390/cancers11091334.

**ANEXO 1**  
**QUESTIONÁRIO**

PRONTUÁRIO =

NOME=

IDADE=

PARIDADE=

MENARCA=

MENOPAUSA =

ANTECEDENTES PESSOAIS E HÁBITOS=

PESO/ ALTURA/ IMC=

ANTECEDENTES FAMILIARES =

TEMPO DE DOENÇA= PERCEPÇÃO DA PACIENTE

MAMOGRAFIA ( DATA / LAUDO COMPLETO)=

US MAMA ( DATA/ LAUDO COMPLETO)=

BIÓPSIA ( DATA/ LAUDO COMPLETO)=

CIRURGIA (DATA/ LADO/PROCEDIMENTO)

HISTOPATOLÓGICO =

IMUNOHISTOQUIMICA=

TNM=

QUIMIOTERAPIA ( DATA DOS CICLOS ; INÍCIO E TÉRMINO)=

RADIOTERAPIA ( PERÍODO)=

EVOLUÇÃO EM 06 MESES =

EVOLUÇÃO EM 01 ANO=