

UNIVERSIDADE SÃO FRANCISCO
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde

PAULO ROBERTO DE ANDRADE FIGARO CALDEIRA

**AVALIAÇÃO DAS METÁSTASES ÓSSEAS DO CARCINOMA
DE MAMA PARA OSSOS LONGOS OU CHATOS
CONFORME OS SUBTIPOS MOLECULARES**

Bragança Paulista
2018

**PAULO ROBERTO DE ANDRADE FIGARO CALDEIRA – R.A.
001201603563**

**AVALIAÇÃO DAS METÁSTASES ÓSSEAS DO CARCINOMA
DE MAMA PARA OSSOS LONGOS OU CHATOS
CONFORME OS SUBTIPOS MOLECULARES**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de Concentração: Biologia Molecular e Celular

Orientador: Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez

Bragança Paulista
2018

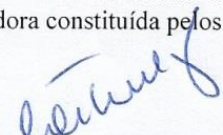
QZ 203 Caldeira, Paulo Roberto de Andrade Figaro.
C151a Avaliação das metástases ósseas do carcinoma de mama para ossos longos ou chatos conforme os subtipos moleculares / Paulo Roberto de Andrade Figaro Caldeira. -- Bragança Paulista, 2018.
66 p.

Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

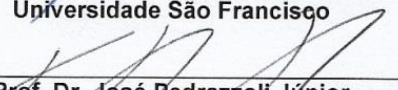
Orientação de: Carlos Augusto Real Martinez.

1. Biologia molecular. 2. Neoplasias da mama.
3. Metástase neoplásica. 4. Subtipos moleculares.
5. Caderinas. I. Martinez, Carlos Augusto Real. II. Título.

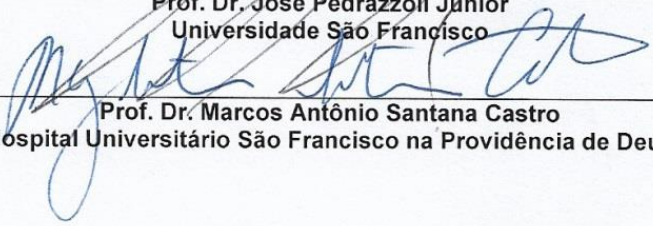
FÍGARO, Paulo. R. A. C. “Avaliação das metástases ósseas do carcinoma de mama para ossos longos ou chatos conforme os subtipos moleculares”. Dissertação defendida e aprovada no programa de Pós Graduação Stricto Sensu em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco em 22 de Fevereiro de 2018 pela Banca examinadora constituída pelos professores:



Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez
Universidade São Francisco



Prof. Dr. José Pedrazzoli Júnior
Universidade São Francisco



Prof. Dr. Marcos Antônio Santana Castro
Hospital Universitário São Francisco na Providência de Deus

DEDICATÓRIA

**Dedico este trabalho a:
Deus, fonte de inspiração e sustento espiritual.
Denise, pelo amor e companheirismo.
À minha família, pela formação e incentivo ao estudo.**

AGRADECIMENTOS

Ao orientador Prof. Dr. Carlos Augusto Real Martinez pela orientação e pelo suporte acadêmico no decorrer deste trabalho.

À Universidade São Francisco pela bolsa concedida.

Ao Hospital Amaral Carvalho de Jau, que propiciou a realização desta pesquisa.

Ao Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências da Saúde da Universidade São Francisco.

Aos membros da Banca Examinadora que contribuíram para a qualidade do texto final.

RESUMO

O câncer de mama é a entidade maligna mais comum entre as mulheres do mundo e a sua incidência têm aumentado a cada ano. O potencial metastático pode estar determinado nos mesmos genes que originam o tumor primário. Fazem-se necessários estudos sobre o processo de progressão tumoral e do respectivo potencial metastático. Acometimento ósseo é o sitio mais comum de metástase do carcinoma de mama. A identificação de possível preferência conforme os subtipos moleculares, na precocidade ou acometimento de ossos longos ou chatos, poderia alterar a prática médica de oncologistas, dirigindo especial atenção a estes grupos de pacientes e suas possíveis complicações, em atendimento multidisciplinar com ortopedistas, minimizando possíveis sequelas deste processo metastático. Detectar a instalação dos diferentes sítios metastáticos para ossos longos ou chatos (curtos), conforme os subtipos moleculares e sua possível correlação. Foram selecionados 58 casos de pacientes com câncer de mama que apresentaram exclusivamente metástases ósseas. O material de estudo foi obtido dos tumores primários emblocados em parafina. Realizaram-se análises imunoistoquímicas de expressão de E-caderina e estatística dos dados. Foram identificados os subtipos moleculares Luminal A, Luminal B, Luminal Híbrido, HER2+ e Triplo Negativo/Basal Like. Os subtipos moleculares comparados com a idade de implantes ósseos, distribuição de implantes ósseos e intervalo livre de doença não mostrou significância estatística. Analisado o nível de expressão da proteína E-caderina não foi demonstrado relação de significância com os implantes ósseos e o intervalo livre de doença. Os subtipos moleculares Luminais formam a maioria das metástases ósseas, mais evidentes entre 0 e 30 meses de intervalo livre de doença; nos subtipos Triplo Negativo/Basal Like, as metástases ocorreram ao longo de 50 meses, assim como nos Luminais Híbridos; no subtipo HER2, 50% dos implantes ósseos ocorreram precocemente (primeiros 10 meses); não foram encontradas diferenças significativas entre intervalo livre (implantes metastáticos) e subtipos moleculares; não foram encontradas diferenças significativas entre idade menor ou igual e maior ou igual a 50 anos; encontrada prevalência de 60% de implantes ósseos para os subtipos Luminais (35 de 58 casos) e 70% (24 de 35 casos) para ossos chatos.

Palavras chave: Biologia Molecular. Neoplasias da Mama. Metástase Neoplásica. Subtipos moleculares. Caderinas.

ABSTRACT

Breast cancer is the most common malign disease affecting women worldwide and its incidence has been increasing through the years. The metastatic potential of these cancers can be linked to the same genes of the primary tumor. More studies are needed to elucidate the tumoral progressing process and its ability to spread. Bone is the most frequent site for breast cancer metastasis. Identifying the possible preference of bone metastasis, such as long or short bones, according to molecular subtypes, could alter oncologists approach paying special attention to these particular group of patients reducing the side effects of the bone metastatic process, involving multidisciplinary team with orthopedists, minimizing some possibles sequelae of this metastatic process. Detect different metastatic sites to long or short bones, according to the molecular subtypes. Fifty-eight patients with only bone metastasis were chosen. Histological parts of primary breast cancer were analyzed. Immunohistochemistry analysis, expression of E-caderine was studied and statistic data were obtained. Luminal A, Luminal B, Luminal Hybrid, HER2+ and Triple Negative/ Basal like subtypes were identified. The molecular subtypes compared to age of bone metastasis, distribution of the bone metastasis and free disease interval didn't show statistical significance. Evaluation of the E-caderine protein expression also did not show statistical significance concerning the bone metastasis and free disease interval. The Luminal molecular subtypes are the vast majority of breast cancer bone metastasis, more evident between 0 and 30 months of free disease interval. In the Triple Negative/Basal like subtypes the metastasis occurred through 50 months, just like Hybrid Luminal subtypes. In the HER2 subtypes, 50% of the bone metastasis occurred early (first 10 months); No statistical significance between free disease interval (metastatic ingrown) and molecular subtypes; no statistical significance in ages lower then or higher than 50 years old. Prevalence of 60% in bone metastasis for the subtypes Luminal (35 out of 58 cases) and 70% (24 out of 35 cases) for flat bones. No particular preference for E-caderine expression was observed to any molecular subtypes in these samples.

Key Words: Molecular Biology. Breast Cancer. Neoplastic metastasis. Molecular subtypes. Caderines.

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIACÕES

CK: Citoqueratina.

Dvl: Disheveled.

EGFR: Receptor do fator de crescimento epidemal.

ER: Receptor de estrógeno.

ERBB2/HER2: Receptor de tirosina quinase.

ER α : Receptor de estrogênio α .

ER β : Receptor de estrogênio β .

HER2: Oncogene.

I.Q.: Imunoistoquímica.

INCA: Instituto Nacional do Câncer.

PBS: Solução salina tamponada com Fosfato.

PGR: Receptor de progesterona.

pH: Potencial hidrogeniônico.

PgR-A: Receptor de progesterona A.

PgR-B: Receptor de progesterona B.

G1: Grau de diferenciação histológica bem diferenciado.

G2: Grau de diferenciação histológica moderadamente diferenciado.

G3: Indiferenciado.

Ki 67: Índice de proliferação celular (marcador).

LISTA DE GRÁFICOS E FIGURAS

Figura 1 - Corte histológico de mama onde observa-se positividade ou negatividade do Receptor de Estrogênio α (200x) (A) Estrogênio α positivo (B) Estrogênio α negativo.....	19
Figura 2 - Corte histológico de mama onde observa-se positividade ou negatividade do Receptor de Progesterona (PGR) (200x) (A) Progesterona (PGR) positivo (B) Progesterona (PGR) negativo.....	19
Figura 3 - Corte histológico de mama onde observa-se positividade ou negatividade do gene HER2 (200x) (A) HER2 positivo (B) gene HER2 negativo.....	20
Figura 4 - Corte histológico de mama onde observa-se positividade ou negatividade do E-caderina (200x) (A) E-caderina positivo (B) E-caderina negativo.....	20
Gráfico 1 - Análise comparativa dos subtipos Luminais A e B da amostra e os respectivos intervalos livres.....	21
Gráfico 2 - Análise comparativa do subtipo Triplo negativo da amostra e os respectivos intervalos livres.....	21
Gráfico 3 - Análise comparativa do subtipo Híbrido da amostra e os respectivos intervalos livres.....	22
Gráfico 4 - Análise comparativa do subtipo HER2 da amostra e os respectivos intervalos livres.....	22

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1 - Estimativa para o ano de 2016 da taxa de incidência de câncer de mama por 100 mil habitantes.....	1
Tabela 2 - Perfil imunofenotípico para aproximação da classificação molecular em carcinoma de mama.....	15
Tabela 3 - Grupos de subtipos moleculares.....	16
Tabela 4 - Tipos histológicos e respectiva classificação do grau histológico.....	18
Tabela 5 - Distribuição das metástases ósseas conforme os subtipos moleculares.....	24
Tabela 6 - Distribuição dos subtipos moleculares e idade de implante ósseos.....	25
Tabela 7 - Análise comparativa entre os subtipos moleculares em relação à frequência e idade de implantes ósseos.....	26
Tabela 8 - Análise comparativa entre os subtipos moleculares (agrupados) em relação à frequência e idade de implantes ósseos.....	26
Tabela 9 - Relação da expressão da E-caderina com intervalo livre de doença.....	27
Tabela 10 - Relação entre o nível de expressão da E-caderina com os subtipos moleculares.....	28
Quadro 1 - Análise comparativa entre os subtipos moleculares, suas respectivas frequências em relação ao intervalo livre de doença.....	23
Quadro 2 - Análise comparativa entre intervalo livre de doença e idade.....	23

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 Câncer de mama feminina	13
1.2 Presença de metástases	15
1.3 Metástases ósseas	16
1.4 Diagnóstico das metástases	18
1.5 Marcadores tumorais	18
1.5.1 Receptor de estrogênio α (<i>Era</i>)	19
1.5.2 Receptor de progesterona (<i>PGR</i>)	20
1.5.3 Gene <i>HER2</i>	21
1.5.4 <i>E-caderina</i>	23
1.6 Justificativa	23
2 OBJETIVOS	24
2.1 Objetivo Geral	24
2.2 Objetivos Específicos.....	24
3 MATERIAIS E MÉTODOS	25
3.1 Amostra	25
3.1.1 Seleção de Casos.....	25
3.1.2 Critérios de Inclusão e exclusão dos casos.....	25
3.1.3 Identificação dos sítios metastáticos.....	25
3.2 Estudo Imunoistoquímico para identificação dos subtipos moleculares	26
3.2.1 Conservação das Amostras	26
3.2.2 Análise Imunoistoquímica – (<i>I.Q.</i>)	26
3.2.3 Análise de <i>E-caderina</i>	28
3.3 Análise estatística	29
4 RESULTADOS	30
4.1 Quanto à classificação de subtipos moleculares e o tempo de intervalo livre de detecção de implantes ósseos	30

4.1.1 <i>Aplicação do Teste da Razão de Verossimilhança, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre ambas as categorias das variáveis de interesse, para as categorias de intervalo livre</i>	35
4.1.2 <i>Aplicação do Teste de Mann-Whitney, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre as duas categorias da variável 'idade', para a variável 'intervalo livre (meses)</i>	35
4.2 Quanto aos subtipos moleculares e a detecção dos implantes em ossos longos, chatos (curtos) ou ambos.....	36
4.3 Quanto aos subtipos moleculares e a detecção dos implantes em ossos em relação a idade das pacientes (pré e pós menopausadas – idade de corte de 50 anos)	37
4.4 Quanto à expressão da E-caderina e possível precocidade de instalação de metástases ósseas	39
5 DISCUSSÃO	41
6 CONCLUSÕES	46
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	48
ANEXOS E APÊNDICES	58

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer de mama feminina

O câncer de mama é a entidade maligna mais comum entre as mulheres do mundo e sua incidência tem aumentado a cada ano. Embora tenham ocorrido melhoras significativas no diagnóstico precoce, nas técnicas cirúrgicas, na terapia hormonal, quimioterapia e radioterapia, esta doença ainda é uma das primeiras causas de mortalidade por câncer entre mulheres (SUNPAWERAVONG, S.; SUNPAWERAVONG, P., 2005).

Os dois subtipos mais comuns são o carcinoma ductal infiltrante e o carcinoma lobular infiltrante, os quais diferem biologicamente e na apresentação clínico-patológica. O carcinoma ductal é o tipo histológico mais comum, compreendendo aproximadamente 70 a 80% dos cânceres de mama invasivos. Os carcinomas lobulares ocorrem em aproximadamente 10% das pacientes, com maior frequência em mulheres idosas. Apesar de estar associada a um fenótipo biológico menos agressivo, a recorrência e a sobrevivência são muito similares ao observado nas pacientes com carcinoma ductal infiltrante (ARPINO et al., 2004).

A estimativa da incidência de câncer de mama para o Brasil no ano de 2016 foi de 57.960 novos casos. Na Tabela 1 constam os dados da estimativa incidência do câncer de mama em cada região do Brasil para o ano de 2016 (INCA, 2016).

TABELA 1. Estimativa para o ano de 2016 da taxa de incidência de câncer de mama por 100 mil mulheres. Fonte: INCA (2016).

Regiões do Brasil	Estimativa de Incidência
Sudeste	68,08/100.000 mulheres
Sul	74,30/100.000 mulheres
Centro Oeste	55,87/100.000 mulheres
Nordeste	38,74/100.000 mulheres
Norte	22,26/100.000 mulheres

O carcinoma de mama é uma doença heterogênea clínica e histopatologicamente, assim como a resposta apresentada pelas pacientes a determinado tratamento. Além disso, o tecido tumoral da mama mostra heterogeneidade em relação ao seu microambiente, incluindo os tipos celulares e seu número (linfócitos infiltrantes, células adiposas estromais e endoteliais). A composição celular dos tumores é um fator determinante das características clínicas da paciente e biológicas do tumor (SORLIE, 2004).

Historicamente, a progressão do câncer de mama é vista como um processo de múltiplos passos, semelhante ao modelo proposto para a carcinogênese de cólon (VOGELSTEIN et al., 1988), passando por alterações progressivas do epitélio normal, para hiperplasia sem e com atipias, carcinoma *in situ*, carcinoma invasivo e metástase (SHACHNEY; SILVERMAN, 2003). Com o acúmulo de alterações genéticas, novos clones celulares se originam, os quais possuem maior capacidade invasiva e de disseminação. Tal fenômeno está restrito a uma fração de células do tumor primário, que é fenotipicamente e biologicamente heterogênea, resultando assim em maior potencialidade metastática (YOKOTA, 2000).

Apesar da maioria dos conceitos a respeito das lesões precursoras de câncer de mama morfológicamente definidas permanecerem válidas ainda hoje, as técnicas de imunoistoquímica e moleculares alteraram o modelo de progressão em múltiplas etapas proposto anteriormente (BUERGER et al., 2001; FARABEGOLI et al., 2002). Estes estudos enfatizam que a progressão do câncer de mama compreende uma série complexa de eventos genéticos aleatórios, levando a vias distintas e divergentes em direção ao câncer de mama invasivo. Além disso, algumas alterações que faziam parte de determinada via foram reposicionadas, enquanto outras foram questionadas quanto ao seu envolvimento (FARABEGOLI et al., 2002; SHACHNEY; SILVERMAN, 2003).

O principal desafio nesta patologia é definir acuradamente os perfis de risco individuais para pacientes no início do diagnóstico e identificar modalidades apropriadas de tratamento loco-regional e sistêmico. A identificação de pacientes com baixo risco de recidiva, potencialmente curadas apenas com terapia loco-regional, daquelas com alto risco que necessitam de tratamentos agressivos e a seleção de terapia sistêmica adjuvante que é baseada em fatores prognósticos e preditivos. Os fatores prognósticos e preditivos aceitos no câncer de mama incluem características das pacientes que são doença-independentes (como a idade) e aquelas que são relacionadas à doença (como tamanho do tumor, envolvimento de linfonodos axilares e grau histológico) e características biológicas do tumor (obtidas por painéis de imunoistoquímica – Subtipos moleculares) (NIH CONSENSUS DEVELOPMENT CONFERENCE STATEMENTS, 2001).

1.2 Presença de metástases

A presença de metástases nos linfonodos axilares tem sido utilizada para prever o desenvolvimento de metástases distantes, entretanto, aproximadamente 20 a 30% das pacientes com câncer de mama livre de metástases em linfonodos axilares, desenvolverão a doença em sítios distantes (BRAUN et al., 2000).

Estudos de expressão gênica mostraram que são diferentes as vias moleculares envolvidas na disseminação linfática e hematopoética nos tumores de mama (WOELFLE et al., 2003).

Verificou-se por estudos de perfis de expressão gênica, que a maioria das células cancerosas em um tumor primário tem um “fenótipo metastático”, indicando que a capacidade metastática já está presente no início da tumorigênese (VAN'T VEER et al., 2002; VAN DE VIJVER et al., 2002).

Como o potencial metastático pode estar presente no início do desenvolvimento do tumor, foi proposto que os mesmos genes que originam o tumor primário, provavelmente causam metástase (BERNARDS; WEINBERG, 2002). Entretanto, a maioria desses estudos não usou técnicas de microdissecção para se isolar as células tumorais, portanto a assinatura metastática ficou comprometida.

Avanços no desenvolvimento de ensaios moleculares e de imunocitoquímica capacitaram a detecção de células tumorais disseminadas individualmente e auxiliaram na construção de modelo mais compreensivo da cascata metastática, ou dos diferentes eventos que levam às metástases primárias e secundárias em pacientes com câncer (PANTEL; BRAKENHOFF, 2004). Este modelo enfatiza que as células cancerosas podem se disseminar através de duas vias; do sítio primário para os linfonodos por via linfática ou do tumor primário para sítios distantes por via hematopoética, não passando assim pelos linfonodos. Estas vias são complementares, contudo seguem caminhos específicos.

Em pacientes com câncer de mama, a disseminação parece se iniciar precocemente no desenvolvimento tumoral. Os dados dos perfis de expressão gênica associados com metástase (VAN'T VEER et al., 2002; VAN DE VIJVER et al., 2002; BERNARDS; WEINBERG, 2002; WOELFLE et al., 2003) e as características genéticas das células tumorais circulantes isoladas de pacientes com câncer não metastático, suportam esta ideia (KLEIN et al., 2002; SCHMIDT-KITTLER et al., 2003). Contudo, ainda são necessários muitos estudos para o esclarecimento do processo de progressão tumoral e do potencial metastático dos tumores,

tanto em relação à definição das alterações genéticas que estão envolvidas na progressão, quanto à existência ou não de uma correlação entre genótipo e fenótipo tumoral.

1.3 Metástases ósseas

Os ossos representam o sítio mais comum de metástase à distância do carcinoma de mama. Ossos de diferentes partes do esqueleto, especialmente os ossos curtos (chatos), são frequentemente comprometidos por disseminação metastática em mulheres acometidas por câncer de mama. Os ossos longos apresentam uma escavação central que é o canal medular, onde se encontra a medula óssea e são constituídos por um corpo (diáfise) e duas extremidades (epífises). Os ossos chatos são ossos finos, em que o comprimento e a largura predominam sobre a espessura. Estudos necroscópicos demonstraram que a maioria das mulheres falecidas em decorrência do câncer de mama, apresentaram implantes ósseos secundários. Não está bem esclarecido o mecanismo inicial dos implantes metastáticos terem maior preferência pelos ossos. Dentre os ossos curtos (chatos), observa-se a sequência de comprometimento para esterno, costelas, vértebras e pelve. Os ossos curtos (chatos) são acometidos antes dos ossos longos (PIATO, S.; PIATO, J., 2006).

Encontra-se metástase óssea de câncer de mama com porcentagem significativa; estava associada com receptor de estrógeno positivo/receptor de progesterona negativo em comparação com tumores sem metástase óssea. Portanto, metástase óssea está fortemente associada com receptor estrogênico positivo/receptor progesterona negativo nos tumores. Diferença significativa em tumores com expressão do receptor estrogênico, entre alto grau e baixo grau com metástase óssea, sugere que diferentes painéis de marcadores moleculares poderiam ser usados para prever metástases ósseas nestes dois grupos de tumores (WEI et al., 2008).

O tempo médio do diagnóstico de somente metástase óssea do câncer de mama do último seguimento (*follow-up*) ou morte foi de 55,2 meses. Tumores com receptores de estrogênio e receptores de progesterona positivos, baixo ou intermediário grau histológico e baixa taxa mitótica tem maior propensão para metastatizar para ossos do que para vísceras. Câncer de mama metastático com sincrônicos múltiplos sítios de recorrência são comuns e, metástases sistêmicas limitadas aos ossos são menos frequentes. Somente metástases ósseas têm sido reportadas de ocorrer em 17-37% dos pacientes com metástases à distância. Metástase à distância confinada ao esqueleto apresentam prognóstico mais favorável que outros tipos de metástase à distância ou múltiplas metástases para ossos e vísceras. Outros

investigadores reportaram que a sobrevida média de pacientes com somente metástase óssea foi 24-54 meses. A característica favorável do tumor primário explica o prognóstico modesto de mulheres com somente metástases ósseas (AHN et al., 2013).

O longo período de latência entre a apresentação do carcinoma primário e o subsequente desenvolvimento de metástases de certos tipos tumorais, sugerem que a disseminação das células que interagem com o microambiente para um órgão particular, tem caminho complexo, sobretudo longo período. Apesar disso, pequeno é o conhecimento sobre preditores para disseminação metastática, órgão susceptível para metástases e subsequentes resultados para muitos tumores. A progressão metastática do câncer de mama está hipoteticamente mediada por ambos, hospedeiro e fatores tumorais, incluindo diferentes classes de graus para metástases. Embora mulheres idosas tenham risco diminuído de desenvolver metástase, quando isto ocorre, elas têm um maior risco de morte comparado com pacientes mais jovens. Estes achados nas grandes coortes de pacientes sugerem que os mecanismos implícitos na relação entre idade e metástase requer mais estudos na exploração molecular e estudos clínicos para obter implicação mais importante no tratamento sistêmico do câncer de mama (PURUSHOTHAM et al., 2014).

Existe grande evidência sobre as diferenças na disseminação entre os subtipos biológicos do câncer de mama. Estudo realizado para analisar o padrão de metastatização de acordo com o subtipo biológico, explora o prognóstico correspondente. Subtipo biológico foi definido pela imunistoquímica de acordo com o critério de St. Gallen (2013)¹. Associação entre subtipos biológicos e as distantes e diferentes localizações foram analisadas. Resultado foi reportado tomando luminal A do carcinoma de mama como referência. Triplo negativo do câncer de mama demonstrou grande tropismo para pulmão, enquanto o não luminal subtipo HER2 foi associado com grande taxa de metástase hepática. Todos os subtipos foram associados com baixo risco de localização somente óssea. Sumariamente, este estudo adicionou informações para compreender a complexidade do câncer de mama e nas manifestações clínicas. Propõe ainda categorização entre diferentes subgrupos com base nos recursos da imunistoquímica, como poderia predizer o sítio anatômico preferencial da primeira metástase à distância, assim, como prognóstico específico. Por conseguinte, é tentador levantar hipóteses de alguma implicação prática nos termos do gerenciamento “adaptado”, isto é, protocolos de vigilância e/ou estratégias terapêuticas, que necessitam ser verificadas por ensaios clínicos (GERRATANA et al., 2015).

¹ St. Gallen – Cidade suíça onde ocorrem encontros anuais de oncologistas em que consensos de prognósticos e tratamentos são construídos.

1.4 Diagnóstico das metástases

Para o diagnóstico de metástase óssea, utilizou-se da Cintilografia Óssea (alta sensibilidade e baixa especificidade), da Radiografia convencional, da Tomografia Computadorizada e da Ressonância Nuclear Magnética, principalmente para lesões de coluna vertebral, demonstrando ou não compressão medular. Quando as metástases estão localizadas exclusivamente no esqueleto, o prognóstico torna-se relativamente favorável. A sobrevida média varia de 66 a 78 meses, pois tem comportamento indolente, tornando até questionáveis medidas terapêuticas agressivas (PIATO, S.; PIATO, J., 2006).

1.5 Marcadores tumorais

Marcadores tumorais são úteis na detecção do câncer em estágio precoce, na avaliação do tumor, no monitoramento da progressão da doença e na determinação da resposta à terapia (SIDRANSKY, 2002).

As diferenças nas características biológicas do câncer de mama podem ser explicadas por diferenças no padrão de alterações entre os genes que atuam na carcinogênese. Vários estudos têm sido realizados para se determinar o valor das alterações genéticas como marcadores prognósticos para estes pacientes. Os marcadores prognósticos moleculares utilizados na prática clínica são: receptor de estrógeno (ER), o receptor de progesterona (PGR) e receptor de tirosina quinase (ERBB2/HER2). A presença ou ausência dessas proteínas é comumente detectada utilizando-se a análise de imunistoquímica. Assim, foram estabelecidos praticamente três classes moleculares principais: os tumores receptores hormonais positivos, tumores HER2 positivo e tumores negativos para todos os marcadores utilizados. Estas classes têm sido integradas no diagnóstico e tratamento e ajudam a estratificar o risco de recorrência, especialmente em pacientes linfonodos negativos (ROBISON; PERREARD; BERNARD, 2004).

Até o presente, apenas os receptores de estrógeno e progesterona e o HER2 estão incluídos nas guias de prática clínica da *American Society of Clinical Oncology* (ASCO) como marcadores biomoleculares para câncer de mama, principalmente, como preditores de resposta a terapias específicas (BAST et al., 2001). A Sociedade Brasileira de Oncologia Clínica utiliza os protocolos de consenso com a ASCO.

Os estrógenos agem sobre o tecido mamário normal promovendo o desenvolvimento do estroma, o crescimento de extenso sistema de ductos e a disposição de gordura nas mamas. Estes hormônios iniciam o crescimento mamário e são responsáveis pelo crescimento característico e aspecto externo das mamas femininas maduras (VERGOTE et al., 2000; CLEMONS; GOSS, 2001).

Em contraposição, a exposição prolongada ao estrógeno no epitélio ductal da mama parece estar relacionada à iniciação, progressão e metástase do câncer de mama (CLEMONS; GOSS, 2001; FUQUA, 2001; SOMMER; FUQUA, 2001). Desta forma, a administração prolongada destes hormônios em mulheres após a menopausa, com menarca precoce ou menopausa tardia, pode identificar os pacientes como pertencentes a um grupo de alto risco para o desenvolvimento do câncer de mama (WILLET et al., 1999).

O receptor de estrogênio (ER) é importante para o desenvolvimento e função normal da mama, mas desempenha função no desenvolvimento e progressão do câncer de mama (DIAZ; SNEIGE, 2005). A presença de receptores de estrogênio (ER) nos tumores prediz a resposta à terapia hormonal.

A expressão aumentada do *ER α* (*Receptor de Estrogênio α*) é um fator prognóstico e preditivo bem estabelecido em pacientes com câncer de mama. Os resultados de alguns estudos têm sugerido que o *ER α* e *ER β* (*Receptor de Estrogênio β*) são co-expressados na maioria dos cânceres de mama, mas há evidências da existência de uma relação mais complexa entre estas duas moléculas (HAYASHI et al., 2003; FUQUA et al., 2003).

Os níveis de *ER β* parecem ser relativamente mais altos que do *ER α* no epitélio da mama normal e em doença não proliferativa (ROGER et al., 2001). Um estudo demonstrou que a expressão do *ER β* é mais alta em doença pré-maligna que em doença invasiva e em carcinomas lobulares comparados com carcinomas ductais (SKLIRIS et al., 2003). Contudo, a função e significado prognóstico do *ER β* não são caracterizados (SHAABAN et al., 2003).

1.5.1 *Receptor de estrogênio α (ER α)*

O gene do receptor do estrogênio humano *ER α* está mapeado em 6q25.1, é composto por oito éxons e a posição dos íntrons é altamente conservada (PONGLIKITMONGKOL; GREEN; CHAMBON, 1988). Um dos efeitos da exposição prolongada ao estrógeno é um aumento na atividade mitótica do epitélio mamário, aumentando assim a taxa de mutação e persistindo o acúmulo de defeitos genéticos (KING; WILLIAM, 1993; PIKE et al., 1993). A

expressão aumentada da proteína $ER\alpha$ é detectada no epitélio normal da mama e em carcinomas mamários (KHAN et al., 1998).

Durante a transformação maligna, as células do epitélio mamário podem manter o nível basal de ER, expressar altos níveis ou perder a expressão deste receptor. A maioria dos cânceres de mama expressam ER; cânceres ER negativos compreendem 30% de todos os cânceres de mama (CHANG et al., 2000). É desconhecida a origem de cânceres de mama ER negativos, é possível que possam surgir de uma célula epitelial ER negativa durante o fenótipo normal ou de uma célula ER positiva onde o ER foi transcricionalmente desregulado (YANG; GUZMAN; NANDI, 2001).

A expressão do ER é gradualmente perdida durante a progressão do tumor, levando a um estado mais indiferenciado (ROBERTSON, 1996). A maioria dos tumores ER positivos são diploides, bem diferenciados, mais comuns em mulheres na pós-menopausa e menos agressivos do que os tumores ER negativos (LEMIEUX; FUQUA, 1996; SHEIKH et al., 1994).

Mulheres pertencentes a grupos de baixo risco de desenvolvimento de câncer de mama apresentam baixo nível de expressão de $ER\alpha$ (LAWSON et al., 2002). Estes resultados sugerem que um aumento na expressão de $ER\alpha$, é um fator de risco para o desenvolvimento do câncer de mama (KHAN et al., 2002) podendo ser um dos fatores relacionados à iniciação e progressão do tumor (HARVEY et al., 1999; FUQUA, 2001; LAWSON et al., 2001; KHAN et al., 2002)

Entretanto Hayashi et al. (2003) relataram que carcinomas de mama com ausência de expressão do gene $ER\alpha$, podem desenvolver fenótipos mais agressivos. Além disso, a expressão do $ER\alpha$ em tecidos tumorais é considerada um preditor favorável para tratamento endócrino.

1.5.2 Receptor de progesterona (PGR)

A progesterona faz parte do grupo das progestinas, um dos hormônios sexuais ovarianos. As progestinas atuam na preparação final do útero para gravidez e das mamas para a lactação (PINHO, 1997).

O gene do receptor de progesterona (PGR) está mapeado em 11q22, apresenta duas formas, a $PgR-A$ e a $PgR-B$ (MATTEI et al., 1987; 1988)², com funções distintas. O gene $PgR-B$ tem função de promoção e ativação da transcrição. O gene $PgR-A$ é transcricionalmente inativo e atua como um repressor transdominante ligante-dependente da atividade

² Tais referenciais referem-se a dois trabalhos distintos, com colaboradores também distintos.

transcricional do receptor hormonal esteroide (GIANGRANDE; POLLIO; MCDONNELL, 1997).

Lamy et al. (2002) relataram que o nível de *PgR* e ER positivo em mulheres na pós-menopausa é um forte marcador prognóstico. Pacientes cujo tumor é ER e PGR positivo têm uma taxa de resposta ao tratamento de 65%, enquanto em pacientes negativos é de 10% (GRITZAPIS et al., 2003). Por outro lado, ausência de expressão dos genes ER e PGR sugere recorrência precoce e menor sobrevida dos pacientes com câncer de mama; a presença destes receptores nos tumores está relacionada à sensibilidade à terapia endócrina (BOZCUK et al., 2001). Especificamente, os tumores ER positivos constituem dois subconjuntos; tumores *PgR* positivos são provavelmente mais hormônio dependentes que tumores *PgR* negativos (JACOBSEN et al., 2003). Adicionalmente, ER e *PgR* independentes são marcadores prognósticos cuja presença indica agressividade reduzida e um perfil favorável de sobrevivência livre de doença. A expressão aumentada do *PgR* serve como um ensaio funcional, porque ela indica que a via do ER está intacta, mesmo se o tumor é relatado como ER negativo (ESTEVA; HORTOBAGYI, 2004).

1.5.3 Gene *HER2*

Outro marcador preditivo e ou prognóstico no câncer de mama utilizado na prática clínica oncológica é o receptor do fator de crescimento epidermal (*EGFR*), produto do oncogene *HER2*, localizado em 17q11.2-12, responsável pela codificação de uma glicoproteína transmembrana. Esta glicoproteína atua como receptor do fator de crescimento, apresentando atividade tirosina-quinase (HUDZIAK et al., 1987; SLAMON et al., 1989).

A expressão aumentada deste gene, demonstrada em 20 a 30% dos cânceres de mama invasivos (JARVINEN et al., 2000; LEHMANN et al., 2000; TANNER; JARVINEN; ISOLA, 2001), indica pior resposta à quimioterapia (ciclofosfamida, metotrexato, 5-fluorouracil) (NAGY et al., 1999), e hormonioterapia (tamoxifeno) (BERNS et al., 1995; SAVAS et al., 1999). O aumento de sua expressão está associado a alto risco de recidiva e morte (SLAMON et al., 2001; ALBANELL; BASELGA, 2001; HORTON, 2002). *HER2* está associado a tumores com receptores de estrogênio e progesterona negativos, a alto grau histológico, alta taxa proliferativa e a aumento no número de metástases nos linfonodos (ORVIETO; DEI TOS, 2001). A presença de *HER2* é marcadora preditiva de resposta ao *trastuzumabe* (*Herceptin*),

um anticorpo monoclonal humanizado que bloqueia a ação deste receptor (SLAMON et al., 2001; VOGEL et al., 2001; 2002)³.

Abd El-Rehim et al. (2004) relataram que pacientes com tumores de mama expressando o homodímero HER2 apresentaram menor sobrevida livre da doença comparado com outros casos.

Avaliou-se a expressão gênica do gene HER2 em 162 casos de câncer de mama pela PCR Em tempo real. Os resultados mostraram alta expressão deste gene nos tecidos de câncer de mama comparando com o normal. Os autores encontraram uma correlação significativa entre alta expressão do HER2 com expressão negativa dos receptores hormonais *ERα* e *PGR* ($p = 0,029$ e $p = 0,019$, respectivamente) (SAGARA et al., 2004).

Embora sejam necessários muitos marcadores prognósticos confiáveis para se estimar o risco de recorrência e progressão tumoral e elaborar decisões a respeito da terapia adjuvante, as decisões no tratamento pós-operatório são realizadas rotineiramente por meio de fatores de risco convencionais tais como tratamento e estágio do tumor, idade do paciente, envolvimento de linfonodos, grau histológico e status dos receptores hormonais (ONDA et al., 2004). O envolvimento dos linfonodos axilares é considerado o fator prognóstico mais informativo. As taxas de sobrevida após 10 anos dos pacientes com comprometimento de linfonodos axilares são de 25 a 48%, comparadas aquelas sem comprometimento, que é de 65 a 80%. O pior prognóstico é observado com o aumento de linfonodos envolvidos. Na prática, pacientes com quatro ou mais linfonodos positivos são considerados como um subgrupo de prognóstico desfavorável (FANEYTE et al., 2004). No ano 2000, Perou et al., publicaram trabalho que se tornou referência para classificar os cânceres de mama em subtipos moleculares, conforme o padrão de expressão gênica. Luminal A, Luminal B, superexpressor de Her-2, Basaloide e Normal Like.

Segundo Barros e Leite (2015), esses subgrupos tumorais apresentam padrões de comportamento variáveis no que se refere à expressão dos genes, no ritmo do crescimento tumoral, bem como no prognóstico e sensibilidade ao tratamento. De acordo com os referidos autores o subtipo Luminal A corresponde a 30-40% dos casos; Luminal B de 20 a 30% dos casos; Her-2 e Basaloide de 15 a 20% da amostra.

³ Os referenciais VOGEL et al., 2001 e 2002 referem-se a dois trabalhos distintos, com colaboradores também distintos.

1.5.4 E-caderina

O gene *CDH1* (16q22.1) codifica a glicoproteína transmembrana E-caderina que é importante na manutenção da adesão celular homofílica nos tecidos de origem epitelial (OVERDUIM et al., 1995). As caderinas pertencem a uma família de moléculas de adesão dependentes de Ca^{2+} que atuam no reconhecimento celular, morfogênese tecidual e supressão tumoral. Alterações na expressão da proteína E-caderina foram relatadas em vários tipos de cânceres e foram associadas com características histopatológicas tais como pobre diferenciação tumoral, crescimento infiltrante, metástases em linfonodos axilares e a um decréscimo na sobrevida das pacientes (HIROHASHI, 1998; DEBIES; WELCH, 2001).

Evidências experimentais indicam que o gene *CDH1* é um supressor tumoral. Mutações na linhagem germinativa neste gene predispõem ao desenvolvimento de câncer gástrico do tipo difuso e, em menor extensão, ao câncer de mama de início precoce (GUILFORD et al., 1999). A ausência completa da expressão da E-caderina, devido à presença de mutações inativadoras e deleções, é uma característica dos carcinomas lobulares (ACS et al., 2001).

1.6 Justificativa

Dada a importância do carcinoma de mama, seu alto grau de incidência e a instalação de metástases ósseas que comprometem a qualidade de vida dos pacientes, a presente pesquisa buscou investigar indicadores de implantes dessas metástases ósseas que possam alertar precocemente ortopedistas e mastologistas em quais grupos de pacientes este risco é maior, possibilitando mais vigilância, a fim de se evitar fraturas patológicas decorrentes destas metástases ósseas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Detectar a instalação dos diferentes sítios metastáticos para ossos longos ou chatos (curtos), no câncer de mama conforme os subtipos moleculares e sua possível correlação.

2.2 Objetivos Específicos

- a) Identificar por meio de imunistoquímica os subtipos moleculares dos tumores mamários;
- b) Avaliar o período da instalação dos implantes ósseos conforme os subtipos moleculares, medidos em meses, após a cirurgia (intervalo livre);
- c) Investigar a expressão da E-caderina e o tempo de ocorrência de metástases ósseas, conforme seu nível de expressão.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Amostra

3.1.1 Seleção de Casos

Este estudo é uma coorte histórica no qual foram selecionados 58 casos de carcinoma invasivo de mama, de pacientes atendidos pelo Departamento de Mastologia do Hospital Amaral Carvalho de Jaú, de forma retrospectiva, entre os anos jan/2000 e jan/2012. Foram identificados os casos acometidos exclusivamente de metástases ósseas por carcinoma de mama. O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Amaral Carvalho e da Plataforma Brasil processo 1.546.684 de 16 de maio de 2016.

3.1.2 Critérios de Inclusão e exclusão dos casos

Pacientes portadoras de câncer de mama apresentando: a) exclusivamente metástases ósseas provenientes do carcinoma mamário; b) terem realizado exames de imunoistoquímica; c) realizaram tratamento adjuvante com quimioterapia conforme protocolo do departamento de Oncologia Clínica do Hospital Amaral Carvalho Jau; d) tratamento radioterápico adjuvante se indicado; e) hormonioterapia com tamoxifeno ou inibidor de aromatase se necessária conforme o *status* dos receptores hormonais (positivos).

Excluídas pacientes portadoras de metástases a distância atingindo ossos, vísceras (pulmão e fígado), sistema nervoso central e pele (metástases sincrônicas para diferentes sítios).

3.1.3 Identificação dos sítios metastáticos

Os sítios metastáticos foram identificados por meio diagnóstico através de imagem de Cintilografia Óssea, Radiografia, Tomografia Computadorizada e Ressonância Nuclear Magnética, quando indicada.

Com relação aos sítios metastáticos nos ossos, estes foram subdivididos em três grupos: ossos longos, ossos curtos (chatos) e ambos.

Dentre os ossos longos, considerou-se: fêmur, tíbia, fíbula, úmero, rádio, ulna e clavícula.

Dentre os ossos curtos ou chatos: ossos do crânio, coluna vertebral, esterno, costelas, bacia.

3.2 Estudo Imunoistoquímico para identificação dos subtipos moleculares

3.2.1 Conservação das Amostras

Para o objeto desse estudo foram utilizadas amostras de tecidos tumorais provenientes de carcinoma de mama em blocos de parafina.

3.2.2 Análise Imunoistoquímica – (I.Q.)

A análise imunoistoquímica de rotina foi feita com a colaboração do Dr. Francisco Carlos Quevedo e Dr. Francisco Alves Moraes Neto, Departamento de Patologia do Hospital Amaral Carvalho, Jaú/SP.

Para tanto, utilizou-se tecidos tumorais obtidos em cirurgias de mamas, fixados em formalina e embebidos em parafina. Os cortes histológicos foram colhidos em lâminas sinalizadas e estas foram levadas a estufa a 60 graus por três horas. Após esse tempo foram hidratadas em álcool etílico nas concentrações decrescentes (100, 80 e 50%) e lavadas em água destilada. Para recuperação antigênica foi utilizada a câmara *Pascal Dako* com o objetivo de “desmascarar” os antígenos. As lâminas foram imersas em tampão citrato pH 6.0 durante 25 minutos. A seguir foram resfriadas em temperatura ambiente por 20 minutos e lavadas em água corrente e destilada.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com banho de água oxigenada a 10 volumes durante 10 minutos, seguidos de lavagem em água destilada. Após esta etapa, os cortes histológicos foram incubados com anticorpos primários específicos (*RE-clone SP1, Spring; RP-clone SP42, Spring; HER2 – clone SP3, Spring e Ki-67 – clone MIB-1, DAKO*), nas diluições específicas preconizadas nos laboratórios do Hospital Amaral Carvalho de Jaú em temperatura ambiente durante 30 minutos.

Após a incubação, as lâminas foram lavadas duas vezes em solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 a 7,6 (PBS). Como sistema de detecção as lâminas foram incubadas com

Histofine Polímero Universal (*Nichirei Bioscience INC*) em temperatura ambiente durante 30 minutos e a seguir submetidas a dois banhos de PBS. Após a incubação, a revelação foi feita com substrato cromogênico DAB (3'_ diaminobenzidine, *DAKO, K3468*) em temperatura ambiente por 1 minuto.

Finalmente as lâminas foram lavadas em água corrente e contracoradas com hematoxilina de Harris durante 30 a 60 segundos. Os cortes foram desidratados em banhos de álcool etílico em concentrações crescentes e diafanizadas em três banhos de xilol e a seguir, foram montadas em lamínulas e resina (*Entellan*).

Controles internos e externos positivos e negativos foram utilizados para validar as reações de IQ. Os resultados positivos para ER e PGR foram determinados baseados no percentual estimado visualmente de maior ou igual a 10% de células neoplásicas com coloração nuclear positiva: coloração fraca (1+), moderada (2+) ou forte (3+) e negativa ausência de coloração (0).

Subentende-se HER2 (+) como 3 + (fortemente positivo) ou *FISH* positivo nos casos que foram indicados.

Os subtipos moleculares foram classificados na Tabela 2.

TABELA 2. Perfil imunofenotípico para aproximação da classificação molecular em carcinoma de mama. Fonte: Hammond et al. (2010); Cheang et al. (2006); Wolff et al. (2006); Wludarski e Bacchi (2008); Cheang et al. (2009); Bhargava et al. (2010).

Subtipo Molecular	Perfil dos Biomarcadores
Luminal A	RE+ e/ou RP+; HER2 -; Ki67 < 14%
Luminal B	RE + e/ou RP+; HER2 -; Ki67 ≥ 14%
Luminal híbrido	RE+ e/ou RP+; HER2 +
HER-2 +	RE -; RP -; HER2 +
Triplo negativo	RE -; RP -; HER2 -
<i>Basal Like</i>	RE -; RP -; HER2 -; CK 5/6 + e/ou EGFG+

Para facilidade de análise deste trabalho e tendo em vista o comportamento biológico tumoral, agruparemos os subtipos moleculares em quatro grupos na Tabela 3.

TABELA 3. Grupos de subtipos moleculares. Fonte: Elaboração própria.

Agrupamento	Subtipos
Subtipo 1	Luminais A e B
Subtipo 2	Grupo HER2 +
Subtipo 3	Grupo Luminal Híbrido
Subtipo 4	Grupo Triplo Negativo e <i>Basal Like</i>

3.2.3 Análise de E-caderina

Para realização da técnica de imunistoquímica para pesquisa das proteínas E-caderina, nos blocos previamente confeccionados, foram realizados cortes histológicos, com 5 μ de espessura em todas as amostras colhidas. Os cortes foram dispostos em lâminas de vidro com extremidades foscas previamente sinalizadas e identificadas. Após esses procedimentos, as lâminas foram submersas em solução de *Trilogy* em uma diluição de 1:100 (*Trilogy*, Marca *Cell Marque*). A exposição das lâminas ao *Trilogy* tem como objetivo promover a desparafinização, hidratação e recuperação antigênica. Essa exposição foi realizada em uma temperatura de 95°C em banho-maria por 45 minutos. Em seguida, as lâminas foram transferidas para uma segunda cuba também contendo a solução de *Trilogy*, previamente aquecida à mesma temperatura, para permanecer em incubação por 10 minutos. Posteriormente, foi retirada a cuba com a solução de *Trilogy* com as lâminas do banho-maria, mantendo-se a solução em temperatura ambiente por 30 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas com dois banhos de água destilada por dois minutos cada e submetidos posteriormente em dois banhos solução com tampão de PBS, com duração de dois minutos cada.

O bloqueio das peroxidases endógenas foi realizado através da incubação das lâminas em uma solução de água oxigenada 10 volumes (V) à 3% por dez minutos em temperatura ambiente. Terminada esta fase, as lâminas foram novamente lavadas com dois banhos de água destilada por dois minutos e dois banhos com tampão PBS, também por dois minutos cada. Para pesquisa da proteína E-caderina, foi utilizado o anticorpo primário Anti-E-caderina, (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil; Clone: NCH-38) na diluição de 1:100. Foi realizada pela adição de 100 μ L do anticorpo primário sobre os cortes em uma câmara úmida, onde ficaram expostos por uma hora em temperatura ambiente. Após a exposição ao anticorpo primário, as lâminas foram lavadas com água destilada, dois banhos – com duração de dois minutos cada

banho – e dois banhos com solução tampão de PBS, também com duração de dois minutos cada.

Posteriormente, foi realizada a incubação com sistema de avidina-biotina (anticorpos secundários) do *Kit LSAB+System-HRP* (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil) com um tempo de exposição das lâminas por um período de 35 minutos em cada reagente. Terminado este tempo, os cortes foram lavados com dois banhos em solução de tampão de PBS, e revelados por meio da utilização do *Kit Líquid DAB + Substrate* (Dako do Brasil, São Paulo, Brasil) na diluição de 1 gota de cromógeno em 1 mL de solução tampão, sendo adicionado 100 µL do cromógeno sobre os cortes, por um período de incubação entre três a cinco minutos a temperatura ambiente. Após a revelação, os cortes foram lavados em água corrente e foi realizada a contra coloração com hematoxilina de Harris por 30 segundos. Depois, as lâminas foram lavadas novamente com água corrente até a remoção total do excesso de hematoxilina. Por fim, foram desidratadas em três banhos de álcool absoluto, um banho de Xilol/álcool e dois banhos de xilol, para serem montadas com lamínulas e resina.

3.3 Análise estatística

Para análise estatística usamos a planilha eletrônica *MS-Excel*, em sua versão do *MS-Office 2013*, para a organização dos dados, e o pacote estatístico *IBM SPSS (Statistical Package for Social Sciences)*, em sua versão 23.0, para a obtenção dos resultados. Considerou-se (p) menor do que 5% (0,050) para diferença estatisticamente significativa.

Foi também aplicado o teste de Verossimilhança comparando os subtipos moleculares com o tempo e idade de instalação das metástases (intervalo livre). Para verificar diferenças entre idade (≤ 50 ou > 50 anos) e intervalo livre utilizou-se o teste de Mann-Whitney.

4 RESULTADOS

Os resultados estão descritos sob a forma de tabelas e gráficos. Os resultados estatísticos estão indicados com (p) correspondente; os testes estão nomeados quando necessário.

A classificação histológica dos tumores avaliados neste estudo está organizada na Tabela 4.

TABELA 4. Tipos histológicos e respectiva classificação do grau histológico. Fonte: elaborada pelo autor.

Tipos Histológicos	Número de casos
Carcinoma ductal infiltrante G3	15
Carcinoma ductal infiltrante G2	35
Carcinoma ductal infiltrante G1	1
Carcinoma mucinoso	1
Carcinoma lobular infiltrante	4
Carcinoma apócrino	1
Sem classificação graduação histológica	1
Total de casos	58

4.1 Quanto à classificação de subtipos moleculares e o tempo de intervalo livre de detecção de implantes ósseos

Para facilidade de análise e tendo em vista o comportamento biológico tumoral, agrupamos estes subtipos moleculares em quatro grupos. Na amostra de 58 casos estão presentes esses subtipos, assim distribuídos:

a) Grupo Luminal A e B: 35 casos (Figura 1 e 2);

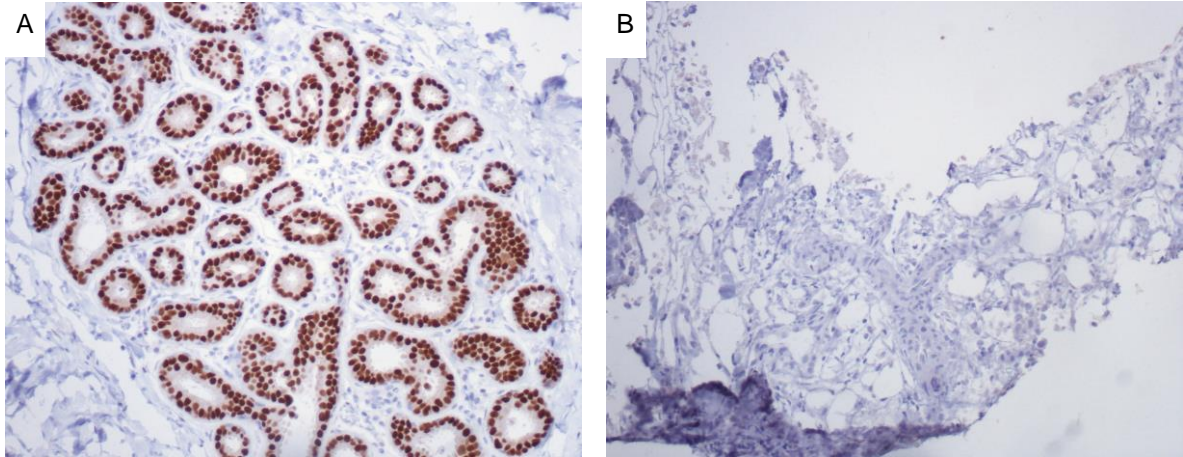


FIGURA 1. Corte histológico de mama onde se observa positividade ou negatividade do Receptor de Estrogênio α (200x). (A) Estrogênio α positivo; (B) Estrogênio α negativo. Fonte: Elaboração própria.

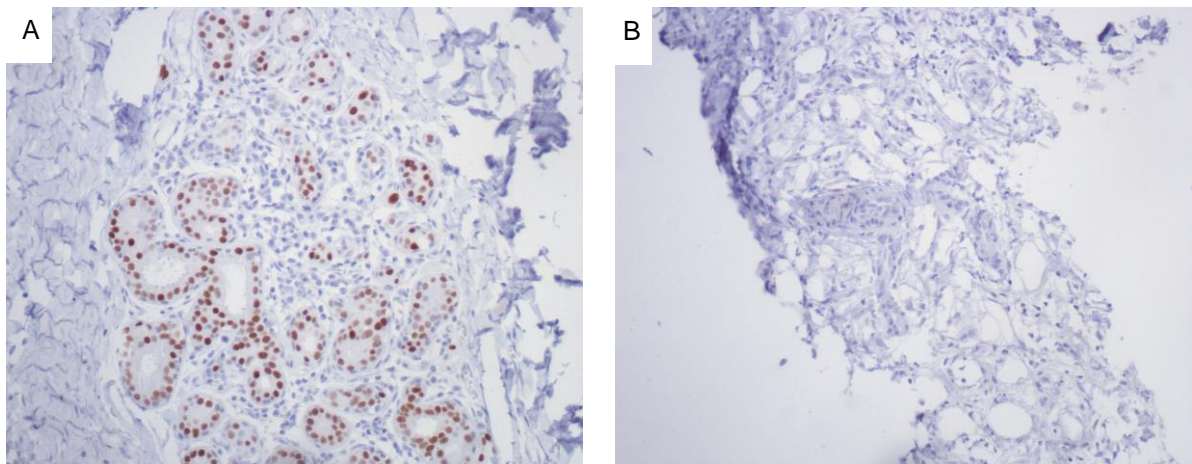


FIGURA 2. Corte histológico de mama onde observa-se positividade ou negatividade do Receptor de Progesterona (PGR) (200x). (A) Progesterona (PGR) positivo; (B) Progesterona (PGR) negativo. Fonte: Elaboração própria.

b) Grupo HER2 +: 6 casos (Figura 3);

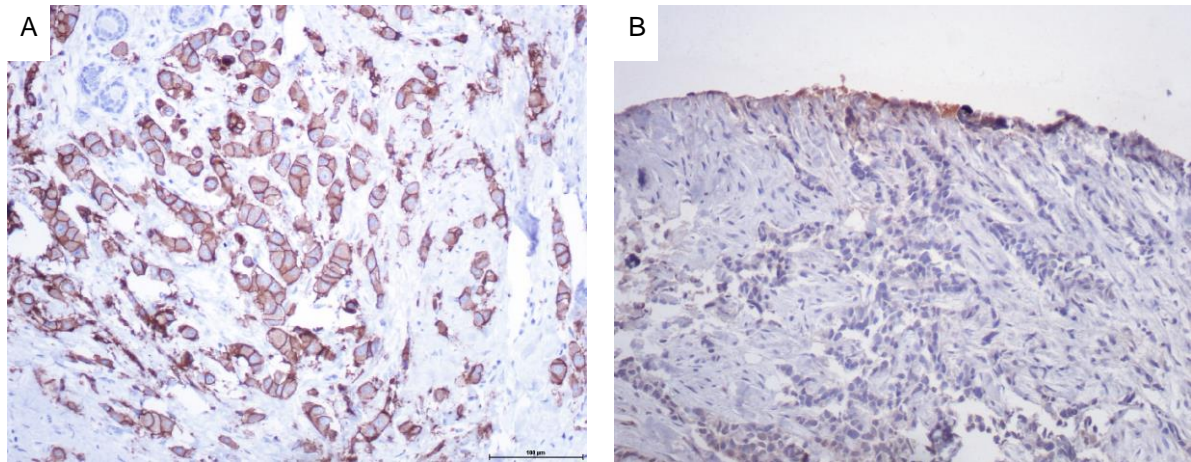


FIGURA 3. Corte histológico de mama onde observa-se positividade ou negatividade do gene HER2 (200x). (A) HER2 positivo; (B) gene HER2 negativo. Fonte: Elaboração própria.

c) Grupo Luminal Híbrido: 6 casos (Figura 4);

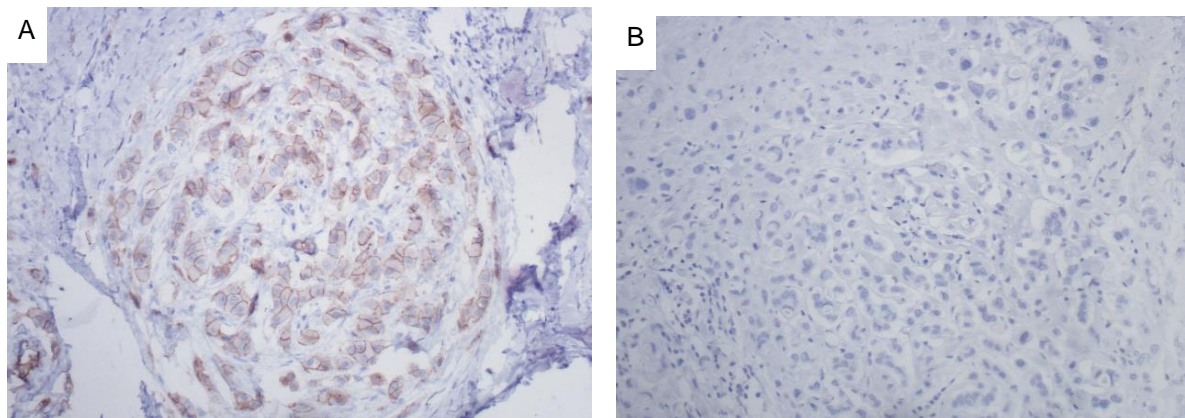


FIGURA 4. Corte histológico de mama onde observa-se positividade ou negatividade do E-caderina (200x). (A) E-caderina positivo; (B) E-caderina negativo. Fonte: Elaboração própria.

d) Grupo Triplo Negativo e Basal Like: 11 casos ⁴.

⁴ O grupo Triplo Negativo e Basal Like corresponde ao corte histológico B das figuras 1, 2 e 3, conjuntamente. Todas as laminas foram coradas com Hematoxilina de Harris.

Os gráficos de 1 a 4 ilustram os subtipos moleculares e o intervalo livre de doença, ou seja, o período da data da cirurgia até o implante das metástases ósseas.

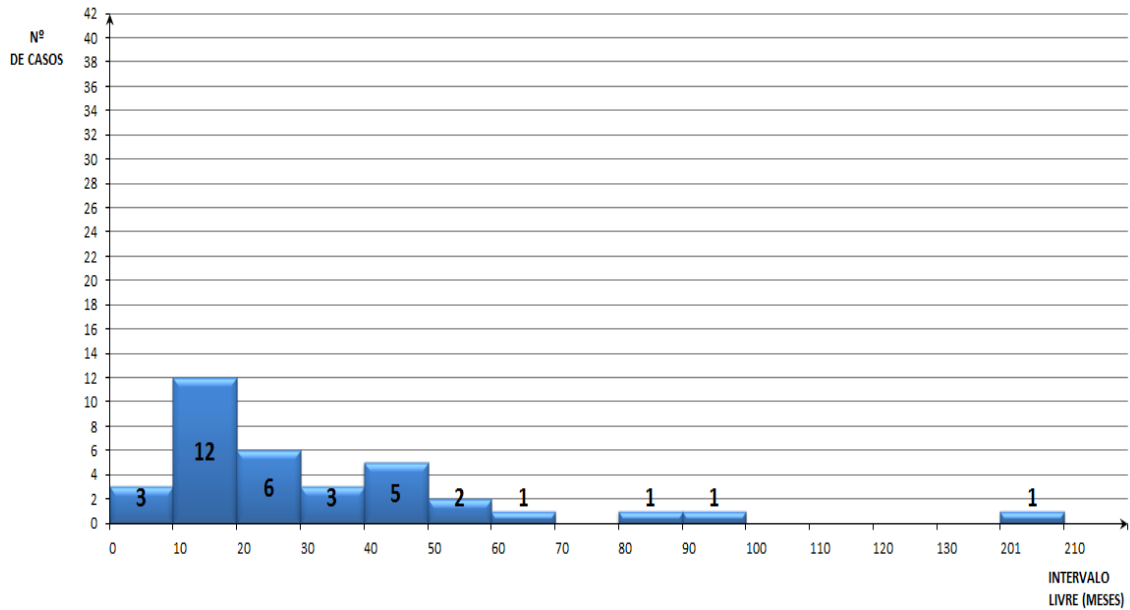


GRÁFICO 1. Análise dos subtipos Luminais A e B da amostra e os respectivos intervalos livres. $p = 0,792$. Fonte: Elaboração própria.

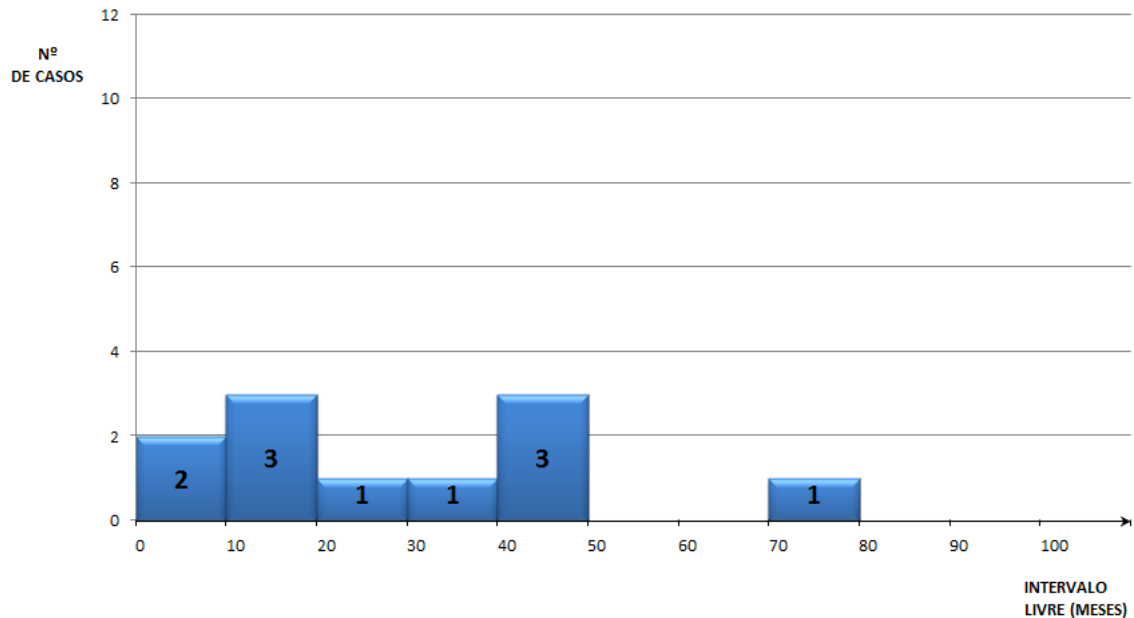


GRÁFICO 2. Análise do subtipo Triplo negativo da amostra e os respectivos intervalos livres. $p = 0,189$. Fonte: Elaboração própria.

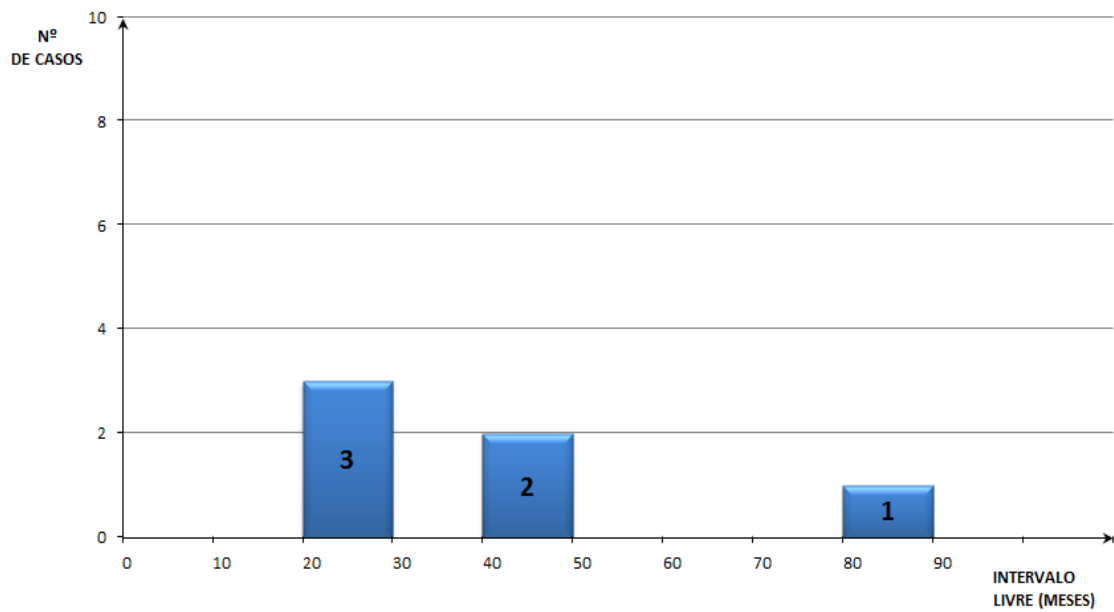


GRÁFICO 3. Análise do subtipo Híbrido da amostra e os respectivos intervalos livres. $p = 0,311$. Fonte: Elaboração própria.

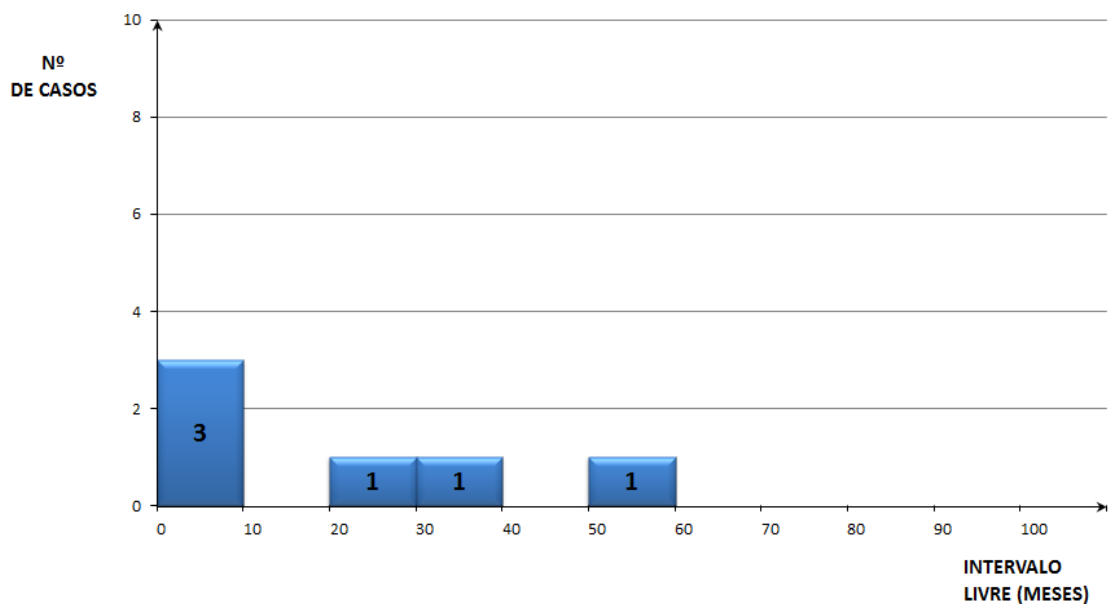


GRÁFICO 4. Análise do subtipo HER2 da amostra e os respectivos intervalos livres. $p = 0,491$. Fonte: Elaboração própria.

Essa distribuição entre subtipos moleculares e o intervalo livre de implantes ósseos nos permite observar possíveis diferenças entre os grupos. Dois testes foram aplicados para identificar diferença entre os grupos.

4.1.1 *Aplicação do Teste da Razão de Verossimilhança, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre ambas as categorias das variáveis de interesse, para as categorias de intervalo livre*

QUADRO 1. Análise comparativa entre os subtipos moleculares, suas respectivas frequências em relação ao intervalo livre de doença. Fonte: Elaboração própria.

Variável	Categoria	INTERVALO LIVRE (CAT)				Sig. (p)
		≤ 30		> 30		
		Freq.	Perc.	Freq.	Perc.	
SUBTIPO	Luminal A e B	21	60,00%	14	40,00%	0,792
	Outros	13	56,50%	10	43,50%	
LUMINAL A	Presente	12	57,10%	9	42,90%	0,863
	Ausente	22	59,50%	15	40,50%	
LUMINAL B	Presente	9	64,30%	5	35,70%	0,621
	Ausente	25	56,80%	19	43,20%	
HIBRIDO	Presente	6	75,00%	2	25,00%	0,311
	Ausente	28	56,00%	22	44,00%	
TRIPLO NEG.	Presente	4	40,00%	6	60,00%	0,189
	Ausente	30	62,50%	18	37,50%	
HER2	Presente	3	75,00%	1	25,00%	0,491
	Ausente	31	57,40%	23	42,60%	

Verificou-se que as diferenças entre as categorias de cada variável de interesse são ditas estatisticamente não significantes, ou seja, as categorias dessas variáveis são estatisticamente semelhantes, para a distribuição dos intervalos livres.

4.1.2 *Aplicação do Teste de Mann-Whitney, com o intuito de verificarmos possíveis diferenças entre as duas categorias da variável 'idade', para a variável 'intervalo livre (meses)*

QUADRO 2. Análise comparativa entre intervalo livre de doença e idade. Fonte: Elaboração própria.

Variável	Idade (CAT)	n	Média	Desvio-padrão	Mínimo	Máximo	Percentil 25	Percentil 50 (Mediana)	Percentil 75	Sig. (p)
INTERVALO LIVRE (MESES)	≤ 50	23	31,09	17,18	8,00	80,00	17,00	28,00	42,00	0,535
	> 50	35	35,69	38,10	3,00	204,00	12,00	22,00	47,00	
	Total	58	33,86	31,39	3,00	204,00	14,50	25,00	44,00	

No Quadro 2 foi analisada a possível instalação de metástase óssea de forma mais precoce entre pacientes na pré-menopausa (≤ 50 anos) e pós-menopausa (> 50 anos).

Verificou-se que a diferença entre as duas categorias de idade é dita estatisticamente não significativa, ou seja, ambas as categorias de idade são estatisticamente semelhantes, para os valores de intervalos livres.

4.2 Quanto aos subtipos moleculares e a detecção dos implantes em ossos longos, chatos (curtos) ou ambos

TABELA 5. Distribuição das metástases ósseas conforme os subtipos moleculares. Fonte: Elaboração própria.

Ossos/subtipos moleculares	Longos	Chatos (curtos)	Ambos	Total
LUMINAL A	1	16	3	20
LUMINAL B	2	8	5	15
HIBRIDO	1	5	-	6
TRIPLO NEG.	1	5	5	11
HER2	-	4	2	6

Conforme apresentado na Tabela 5 do total de 58 casos, evidenciamos uma tendência para implante em ossos *chatos* nos subtipos moleculares luminais, totalizando 24 casos. Em ossos *longos* obtiveram-se três casos e, em ambos os tipos (longos e chatos) oito casos, totalizando 35 casos.

4.3 Quanto aos subtipos moleculares e a detecção dos implantes em ossos em relação a idade das pacientes (pré e pós menopausadas – idade de corte de 50 anos)

TABELA 6. Distribuição dos subtipos moleculares e idade de implante ósseos. Fonte: Elaboração própria.

Idade pac./sub-tipos moleculares	< 50 anos	≥ 50 anos	Total (58)
Luminal a	6	15	21
Luminal b	6	8	14
Híbrido	3	3	6
Triplo negativo	6	5	11
HER2	2	4	6

Observa-se que 60–70% de tumores de mama são luminais identificados por meio de 35 casos de metástase óssea no total de 58 casos.

Pode-se afirmar que existe prevalência de 60,34% de metástases ósseas nos casos luminais, considerada alta, em comparação com outros subtipos moleculares. Ressalte-se 24 casos de luminais foram metastáticos somente para ossos chatos. Esses dados estão apresentados nas Tabelas 6 e 7.

Aplicou-se *Teste da Razão de Verossimilhança*, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre ambos os grupos etários estudados, para as categorias originais dos subtipos moleculares.

TABELA 7. Análise comparativa entre os subtipos moleculares em relação à frequência e idade de implantes ósseos. Fonte: Elaboração própria.

SUB-TIPOS MOLECULARES	IDADE PAC.					
	< 50 ANOS		≥ 50 ANOS		TOTAL	
	Freq.	Perc.	Freq.	Perc.	Freq.	Perc.
LUMINAL A	6	26,09%	15	42,86%	21	36,21%
LUMINAL B	6	26,09%	8	22,86%	14	24,14%
HIBRIDO	3	13,04%	3	8,57%	6	10,34%
TRIPLO NEGATIVO	6	26,09%	5	14,29%	11	18,97%
HER2	2	8,70%	4	11,43%	6	10,34%
Total	23	100,00%	35	100,00%	58	100,00%

p = 0,640

Aplicação do *Teste da Razão de Verossimilhança*, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre ambos os grupos etários estudados, para as categorias agrupadas dos subtipos moleculares (Tabela 8).

Em ambas as abordagens, a diferença entre os dois grupos etários é dita estatisticamente não significativa, ou seja, ambos os grupos etários são estatisticamente semelhantes, para a distribuição dos subtipos moleculares.

TABELA 8. Análise comparativa entre os subtipos moleculares (agrupados) em relação à frequência e idade de implantes ósseos. Fonte: Elaboração própria.

SUB-TIPOS MOLECULARES (AGRUPADOS)	IDADE PAC.					
	< 50 ANOS		≥ 50 ANOS		TOTAL	
	Freq.	Perc.	Freq.	Perc.	Freq.	Perc.
Luminal A e B	12	52,17%	23	65,71%	35	60,34%
Outros	11	47,83%	12	34,29%	23	39,66%
Total	23	100,00%	35	100,00%	58	100,00%

p = 0,302

4.4 Quanto à expressão da E-caderina e possível precocidade de instalação de metástases ósseas

Realizou-se análise de expressão de E-caderina em 39 amostras de tecido tumoral embocado em parafina, provenientes dos 58 casos estudados e com a respectiva identificação em relação a cada caso.

Para melhor compreensão dessa análise, distribui-se os níveis de expressão da E-caderina em tabela a fim de correlacionar esse nível com o período de intervalo livre de doença, do surgimento da lesão metastática em ossos longos, chatos ou ambos (Tabela 9).

TABELA 9. Relação da expressão da E-caderina com intervalo livre de doença. Fonte: Elaboração própria.

Expressão da E-caderina	Intervalo livre em meses									
	0-10	11-20	21-30	31-40	41-50	51-60	61-70	71-80	81-90	91-100
3+	1	4	2	1	2	2	-	-	-	-
2+	1	2	4	2	5	1	-	-	-	1
1+	2	3	1	1	1	-	-	-	1	-
Neg.	-	-	-	-	1	-	1	-	-	-

A expressão da E-caderina concentrou-se no grupo de 11 a 50 meses de intervalo livre de doença, sendo a expressão 3+ ocorridas em nove casos; 2+ em 13 casos e 1+ em cinco casos. Um caso de E-caderina negativa apresentou implante ósseo entre 41-50 meses e outro entre 61-70 meses de intervalo livre.

Correlacionou-se também a expressão da E-caderina com os subtipos moleculares a fim de possível evidência dessa predominância com alguns dos subtipos moleculares, conforme apresentado na Tabela 10.

TABELA 10. Relação entre o nível de expressão da E-caderina com os subtipos moleculares.
 Fonte: Elaboração própria.

Subtipos moleculares	Expressão E-caderina 3+	Expressão E-caderina 2+	Expressão E-caderina 1+	Neg.
Luminal A e B	6	8	8	2
Luminal Híbrido	3	3	-	-
Triplo negativo/basal Like	2	5	-	-
HER2	1	-	1	-
Total (39 casos)	12	16	9	2

No total de 39 casos estudados com E-caderina, observamos 22 casos distribuídos equalitativamente entre 3+, 2+ e 1+ nos subtipos Luminais; a mesma forma de distribuição nos Luminais híbridos entre 3+ e 2+, totalizando seis casos e no Triplo Negativo dos sete casos, cinco representavam expressão 2+.

5 DISCUSSÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea, envolvendo múltiplas formas de apresentação histopatológica, levando a diferentes respostas terapêuticas e evolução clínica podendo apresentar implantes metastáticos em diferentes sítios, de forma precoce ou tardia, ou ainda, permanecendo por longo tempo sem evidência de doença em atividade.

Os sítios de implantes metastáticos são preferencialmente nesta ordem: implantes ósseos, pulmonares, fígado e cérebro.

A pesquisa de metástases exclusivamente ósseas torna-se difícil, pois normalmente as metástases são de implantes simultâneos, em múltiplos sítios (GERRATANA et al., 2015).

Essa introdução valoriza uma amostra de 58 casos exclusivos de metástases ósseas identificadas em serviço de referência de tratamento de câncer de mama, em que foi necessário realizar busca em prontuários médicos registrados no SAME (Serviço de Arquivo Médico e Estatístico) no intervalo de 12 anos (janeiro de 2000 a janeiro de 2012).

As amostras retiradas de tumor de mama dessas 58 pacientes foram classificadas segundo seu tipo e grau histológico.

Desse total, encontramos 51 casos classificados como carcinomas ductais, variando seu grau histológico de 1 a 3, sendo “1” como bem diferenciado e “3” indiferenciado, A maioria encontrada foi de grau histológico 2, ou seja, moderadamente diferenciado. As outras formas encontradas foram de carcinoma mucinoso (um caso), lobular infiltrante (quatro casos), carcinoma apócrino (um caso) e um caso sem classificação histológica.

Esses números estão em acordo com os dados de literatura, pois os carcinomas ductais representam 80% dos tumores de mama e os lobulares aproximadamente 10%. As demais formas representam 1% dos cânceres de mama, em suas respectivas classificações. (ARPINO et al., 2004).

Nesta amostragem de 58 casos, a análise imunoistoquímica revelou 35 casos classificados como subtipos moleculares Luminais A e B; seis casos do subtipo HER2+; seis casos do subtipo Luminal Híbrido e 11 casos de Triplo negativo/Basal Like. Números esses corroborados por Barros e Leite (2015) em recente artigo de revisão.

Para melhor compreensão dos dados de imunoistoquímica e a possível correlação entre os diferentes subtipos moleculares e o intervalo livre de doença (tempo em meses entre a data da cirurgia e a data do implante ósseo, diagnosticado através de exames de imagem), quatro gráficos comparativos foram elaborados.

O Gráfico 1 traz a correlação entre os subtipos moleculares Luminais A e B e o intervalo livre de doença em meses. Observa-se que a maioria dos implantes metastáticos ocorreu entre 0 e 30 meses de intervalo livre, totalizando 21 casos dos 35 luminais, portanto,

60% dos casos. Os outros casos foram sendo distribuídos ao longo do tempo. Essa implantação relativamente precoce dos Luminais, ou seja, em até 30 meses, dos Luminais é um achado que chama a atenção, pois sendo a maioria dos casos de carcinoma mamário pertencentes a este subgrupo, o Receptor de Estrogênio positivo indica-nos linha de investigação associando sua positividade com a precocidade de implantes ósseos secundários. Wei et al. (2008) corroboram essa afirmação indicando que a metástase óssea está fortemente associada com Receptor Estrogênico positivo/Receptor de Progesterona negativo nos tumores, característica presente nos subtipos Luminais.

No Gráfico 2, correlacionaram-se o subtipo Triplo Negativo/Basal Like e o intervalo livre em meses. Observa-se que os implantes ósseos ocorreram ao longo de 50 meses de intervalo livre. Dados da literatura revelam que há precocidade de implantes metastáticos no subtipo Triplo Negativo/Basal Like em vísceras, em relação aos outros subtipos moleculares (BARROS; LEITE, 2015). Dessa forma os dados levam a inferir que na ausência de metástases viscerais a instalação óssea ocorreu tardiamente, ainda que possa ser entendido como prognóstico favorável em relação as metástases ósseas, não isenta de acometimento de metástases viscerais, tais como hepáticas, pulmonares entre outras, indicando pior prognóstico. Na amostragem em estudo, verificou-se que são portadoras de metástases ósseas exclusivas após 50 meses da cirurgia. O não surgimento de metástases viscerais nesse intervalo pode estar associado com tratamento adjuvante específico para esse subtipo molecular (Triplo Negativo/Basal Like). Ou seja, a metástase óssea tardia exclusiva nesse subtipo molecular, se torna de prognóstico mais favorável.

Em relação ao Gráfico 3, correlacionou-se o subtipo molecular Luminal Híbrido com o intervalo livre. Do total de seis casos, cinco apresentaram metástases ósseas nos primeiros 50 meses de evolução, correspondendo à aproximadamente 90 a 95% entre os Luminais Híbridos. Este achado corrobora os dados já discutidos anteriormente nos casos dos subtipos Luminais (Gráfico 1).

Observa-se no Gráfico 4, a correlação entre o subtipo molecular HER2+ e o intervalo livre, evidenciou-se que dos seis casos envolvidos no estudo, três apresentaram implantes ósseos nos primeiros 10 meses, ou seja, 50% dos casos com implantes precoces. Classicamente está associado este subtipo molecular a um prognóstico ruim. De acordo com Barros e Leite (2015), este panorama foi alterado para melhor devido à terapia alvo anti HER2 pelo *trastuzumabe*, conferido também nos prontuários das pacientes.

Após a tabulação dos dados e a elaboração dos respectivos gráficos envolvendo os subtipos moleculares em comparação ao intervalo livre analisou-se estatisticamente os resultados com aplicação de Teste de Razão de Verossimilhança, com o intuito de verificar possíveis diferenças entre as categorias das variáveis de interesse. Para as categorias de

intervalo livre verificou-se que são estatisticamente não significantes, ou seja, as categorias dessas variáveis são estatisticamente semelhantes, para a distribuição dos intervalos livres.

Para análise das possíveis diferenças entre as duas categorias da variável *idade* para a variável *intervalo livre em meses*, verificou-se por meio do Teste de Mann-Whitney que a diferença entre as duas categorias de idade é dita estatisticamente não significativa, ou seja, ambas as categorias de idade (≤ 50 ou > 50 anos) são estatisticamente semelhantes para os valores de intervalo livre.

Análise da correlação entre os subtipos moleculares de carcinomas mamários, Luminais A e B, Luminal Híbrido, Triplo Negativo/Basal Like, HER2+, com os implantes para ossos chatos, longos ou ambos (Tabela 5), obteve-se dos 58 casos metastáticos, 24 casos para ossos chatos nos subtipos moleculares Luminais; três casos em ossos longos e oito casos em ossos longos e chatos, totalizando 35 casos.

Sabe-se que de 60 a 70% dos tumores mamários são do subtipo moleculares Luminais A e B (BARROS; LEITE, 2015). Na amostragem, identificou-se 35 casos de implantes ósseos, classificados como Luminais, no total de 58 casos. Pode-se afirmar que existe prevalência de 60,34% de implantes ósseos nos casos Luminais, considerada alta em comparação com outros subtipos moleculares. Estes dados são corroborados pelo achado na literatura, segundo Wei et al. (2008).

Ressalte-se que 24 casos do total de 35 luminais metastáticos, foram somente para ossos chatos, ou seja, aproximadamente 70%.

Verificou-se também se haveria alguma diferença entre os subtipos moleculares do carcinoma de mama em relação à detecção dos implantes ósseos nas faixas etárias abaixo dos 50 anos e igual ou acima dos 50 anos (pré e pós menopausadas, com idade de corte aos 50 anos). Após a aplicação do Teste da Razão da Verossimilhança, chegou-se à conclusão que a diferença entre os dois grupos etários é dita estatisticamente não significativa, pois ambos os grupos etários são estatisticamente semelhantes, para a distribuição dos subgrupos moleculares, tanto na forma agrupada dos subgrupos quanto na forma subdividida dos mesmos. Esta não significância talvez possa estar associada ao uso de Citrato de Tamoxifeno durante o tratamento adjuvante nos casos de Receptores Hormonais positivos (RE e RPG), o que compete com o Estrógeno endógeno, nos dois grupos analisados.

Em conjunto com essa amostra de 58 casos de metástase exclusivamente óssea de carcinoma de mama, 39 amostras de tecido tumoral emblocados em parafina desta coorte de pacientes foram obtidas e realizou-se a análise da expressão da E-caderina, a fim de estabelecer possível relação entre os níveis de expressão dessa proteína (1+, 2+, 3+) com o período de intervalo livre de doença, do surgimento do implante ósseo metastático.

Conforme o observado na Tabela 9, a expressão que mais chamou a atenção concentrou-se no grupo de 11 a 50 meses de intervalo livre, sendo que a expressão 3+ ocorreu em 9 casos; 2+ em 13 casos e 1+ em 5 casos. Sabe-se que a E-caderina é responsável pela adesão celular, portanto quanto maior a adesão, menor a capacidade de possível “metastatização”. O maior número de casos metastáticos ocorreu nas expressões de E-caderina 3+ com nove casos e 2+ com 13 casos, totalizando 22 casos (56% da amostra). Em contrapartida, caso de E-caderina negativa apresentou implante ósseo entre 41-50 meses e outro entre 61-70 meses de intervalo livre, indicando a necessidade de aprofundamento de pesquisas que correlacione a positividade da expressão da E-caderina com metástases ósseas.

A expressão da E-caderina também foi correlacionada com os subtipos moleculares buscando evidenciar possível predominância com alguns dos subtipos moleculares (Tabela 10). No total de 39 casos estudados, foram encontradas expressões de E-caderina variando de 1+ a 3+ em 22 casos. Sabe-se que 60% dos tumores mamários são do subtipo Luminal (BARROS; LEITE, 2015). A expectativa de 60% de 39 está em 23,40 casos de luminais, o que está de acordo com o achado de 22 casos encontrados da expressão da E-caderina nos subtipos luminais. O mesmo raciocínio também é válido para o subtipo molecular Triplo Negativo/Basal Like, que representam aproximadamente 20% dos cânceres de mama. Do total de 39 casos 20% esperados correspondem a 7,8 casos e na Tabela 10 encontram-se sete casos. Quanto aos que expressam o oncogene HER2, tanto em seu subtipo molecular puro, como no Luminal Híbrido, encontraram-se oito casos. Esta forma que também expressam HER2 corresponde a aproximadamente 20% dos casos. Observa-se, portanto, que não houve nítida preferência de expressão da E-caderina para algum subtipo molecular nesta amostragem.

Segundo van't Veer et al. (2002) e van de Vijver et al. (2002), estudos de perfis de expressão gênica, demonstraram que a maioria das células cancerosas em um tumor primário tem um “fenótipo metastático”, indicando que a capacidade metastática já está presente no início da tumorigênese. Segundo Yokota (2000), no acúmulo de alterações genéticas, novos clones celulares se originam os quais possuem maior capacidade invasiva e de disseminação. Tal fenômeno está restrito a uma fração de células do tumor primário, que é fenotipicamente e biologicamente heterogêneo, resultando assim em maior potencialidade metastática, o que indica a necessidade de mais pesquisas que associem a identificação dos subtipos moleculares e os possíveis sítios metastáticos que venham a ocorrer (marcadores tumorais).

Esses achados de forma geral, apesar de não mostrarem significância estatística, podem trazer contribuições na prática clínica para profissionais oncologistas, em especial atenção aos Mastologistas, ao se atentarem que nos subtipos Luminais apresentam

preferência para implantes ósseos, correspondendo a 60% destes implantes, sendo para ossos chatos. Além disso, o maior número de implantes ocorre nos primeiros 30 meses de intervalo livre.

Dessa forma, alerta-se a prática clínica para os cuidados nos primeiros 36 meses de seguimento após a cirurgia, principalmente nos casos dos subtipos Luminais, para a solicitação de Cintilografia Óssea na busca de possíveis metástases ósseas.

Novos estudos e principalmente com o esforço de obter uma amostra maior se faz necessário para afirmar ou não alguma relação do que foi aqui estudado.

6 CONCLUSÕES

Devido à heterogeneidade de suas formas de apresentação clínica e histopatológica e a dificuldade de selecionar casos de câncer de mama metastático exclusivamente para ossos, a presente pesquisa atendeu aos objetivos propostos e pode-se concluir que:

- 1- Detectou-se a instalação de metástases ósseas em ossos longos, chatos ou ambos tipos, conforme os subtipos moleculares do Carcinoma de Mama e suas possíveis correlações. Dos 58 casos analisados que foram encontrados, 38 casos foram de implantes em ossos chatos, assim distribuídos: 24 nos subtipos Luminais, 5 nos Híbridos, 5 nos Triplos Negativos e 4 no subtipo HER2. Quanto ao implante em ossos longos, foram identificados 5 casos, assim distribuídos: 3 nos subtipos Luminais, 1 no subtipo Híbrido e 1 no subtipo Triplo Negativo/Basal Like. Em relação a ocorrência em ambos tipos de ossos, foram encontrados 15 implantes metastáticos, assim distribuídos: 8 nos subtipos Luminais, 5 nos subtipos Triplo Negativos/Basal Like e 2 no subtipo grupo HER2.
- 2- Identificou-se por meio de reação de imunoistoquímica os subtipos moleculares dos tumores mamários. Foram subdivididos em 4 grandes grupos, isto é, Luminais (A e B), Triplo Negativo/Basal Like, grupo HER2 e Luminal Híbrido. Observou-se também que os subtipos moleculares Luminais formam a maioria das metástases ósseas, mais evidentes entre 0 e 30 meses de intervalo livre de doença;
- 3- Avaliou-se o período de instalação das metástases ósseas conforme os subtipos moleculares. Nos subtipos Triplo Negativo/Basal Like, as metástases ocorreram ao longo de 50 meses, assim como nos Luminais Híbridos; no subtipo HER2, 50% dos implantes ósseos ocorreram precocemente (primeiros 10 meses); Não foram encontradas diferenças significativas entre intervalo livre (implantes metastáticos) e subtipos moleculares; não foram encontradas diferenças significativas entre idade menor ou igual ou maior ou igual a 50 anos; encontrada prevalência de 60% de implantes ósseos para os subtipos Luminais (35 de 58 casos) e 70% (24 de 35 casos) para ossos chatos;
- 4- Quanto à expressão da E-caderina e intervalo livre, o resultado mostrou-se inconclusivo, necessitando de novas pesquisas; não foi encontrada nítida preferência da expressão da E-caderina para algum subtipo molecular nesta amostragem.

Por fim, estes dados indicam também a necessidade de pesquisas em nível molecular que utilizem estes subtipos moleculares mais comuns de Câncer de Mama, na busca de possíveis marcadores tumorais para metástases ósseas.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-REHIM, D. M.; PINDER, S. E.; PAISH, C. E.; BELL, J. A.; RAMPAL, R. S.; BLAMEY, R. W.; ROBERTSON, J. F.; NICHOLSON, R. I.; ELLIS, I. O. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 8, p. 1532-1542, 2004.

ACS, G.; LAWTON, T. J.; REBBECK, T. R.; LIVOLSI, V. A.; ZHANG, P. J. Differential expression of E-cadherin in lobular and ductal neoplasms of the breast and its biologic and diagnostic implications. **American Journal of Clinical Pathology**, v. 115, n. 1, p. 85-98, 2001.

AHN, S. G.; LEE, H. M.; CHO, S. H.; LEE, S. A.; HWANG, S. H.; JEONG, J.; LEE, H. D. Prognostic factors for patients with bone-only metastasis in breast cancer. **Yonsei Medical Journal**, v. 54, n. 5, p. 1168-1177, 2013.

ALBANELL, J.; BASELGA, J. Unraveling resistance to trastuzumab (Herceptin): insulin-like growth factor-I receptor, a new suspect. **Journal of the National Cancer**, v. 93, p. 1830-1832, 2001.

ARPINO, G.; BARDOU, V. V.; CLARK, G. M.; ELLEDGE, R. M. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: tumor characteristics and clinical outcome. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 149-156, 2004.

BARROS, A. C. S. D. de; LEITE, K. R. M. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. **Revista Brasileira de Mastologia**, v. 25, n. 4, p. 146-155, 2015.

BAST, R. C. J.; RAVDIN, P.; HAYES, D. F.; BATES, S.; FRITSCH, H. J.; JESSUP, J. M.; KEMENY, N.; LOCKER, G. Y.; MENNEL, R. G.; SOMERFIELD, M. R. 2000 update of recommendations for the use of tumor markers in breast and colorectal cancer: clinical practice guidelines of the American Society of Clinical Oncology. **Journal of Clinical Oncology**, v. 19, n. 6, p. 1865-1878, 2001.

BERNARDS, R.; WEINBERG, R. A. Metastasis genes: a progression puzzle. **Nature**, v. 418, n. 6900, p. 823-823, 2002.

BERNS, E. M.; FOEKENS, J. A.; VAN STAVAREN, I. L.; VAN PUTTEN, W. L.; DE KONING, H. Y.; PORTINGEN, H.; KLIJN, J. G. Oncogene amplification and prognosis in breast cancer: relationship with systemic treatment. **Gene**, v. 159, n. 1, p. 11-18, 1995.

BHARGAVA, R. B.; BERIWAL, S.; DABBS, D. J.; OZBEK, U.; SORAN, A.; JOHNSON, R. R.; BRUFISKY, A. M.; LEMBERSKY, B. C.; AHRENDT, G. M. Immunohistochemical surrogate markers of breast cancer molecular classes predicts response to neoadjuvant chemotherapy. **Cancer**, v. 116, n. 6, p. 1431-1439, 2010.

BOZCUK, H.; USLU, G.; PESTERELI, E. P.; SAMUR, M., OZDOGAN, M.; KARAVELI, S.; SARGYN, F.; SAVAS, B. Predictors of distant metastasis at presentation in breast cancer: a study also evaluating associations among common biological indicators. **Breast cancer research and treatment**, v. 68, n. 3, p. 239-248, 2001.

BRAUN, S.; PANTEL, K.; MULLER, P.; JANNI, W.; HEPP, F.; KENTENICH; C. R., GASTROPH, S.; WISCHNIK, A.; DIMPFL, T.; KINDERMANN, G.; RIETHMULLER, G.; SCHLIMOK, G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II, or III breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 342, n. 8, p. 525-533, 2000.

BUERGER, H.; MOMMERS, E. C.; LITTMANN, R.; SIMON, R.; DIALLO, R.; POREMBA, C.; DOCKHORN-DWORNICZAK, B.; VAN DIEST, P. J.; BOECKER, W. Ductal invasive G2 and G3 carcinomas of the breast are the end stages of at least two different lines of genetic evolution. **The Journal of Pathology**, v. 194, n. 2, p. 165-170, 2001.

CHANG, J.; POWLES, T. J.; ALLRED, S. E.; ASHLEY, S. E.; MAKRIS, A.; GREGORY, R. K.; OSBORNE, C. K.; DOWSETT, M. Prediction of clinical outcome from primary tamoxifen by expression of biologic markers in breast cancer patients. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 2, p. 616-621, 2000.

CHEANG, M. C. U.; CHIA, S. K.; VODUC, D.; GAO, D.; LEUNG, S.; SNIDER, J.; WATSON, M.; DAVIES, S.; BERNARD, P. S.; PARKER, J. S.; PEROU, C. M.; ELLIS, M. J. NIELSEN, T. O. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 101, n. 10, p. 736-750, 2009.

CHEANG, M. C.; TREABA, D. O.; SPEERS, C. H.; OLIVOTTO, I. A.; BAJDIK, C. D.; CHIA, S. K.; GOLDSTEIN, L. C.; GELMON, K. A.; HUNTSMAN, D.; GILKS, C. B.; NIELSEN, T. O.; GOWN, A. M. Immunohistochemical detection using the new rabbit monoclonal antibody SP1 of estrogen receptor in breast cancer is superior to mouse monoclonal antibody 1D5 in predicting survival. **Journal of Clinical Oncology**, v. 24, n. 36, p. 5637-5644, 2006.

CLEMONS, M.; GOSS PAUL, M. D. Estrogen and risk of breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 4, p. 276-285, 2001.

DEBIES, M. T.; WELCH, D. R. Genetic basis of human breast cancer metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, n. 4, p. 441-451, 2001.

DIAZ, L. K.; SNEIGE, N. Estrogen receptor analysis for breast cancer: current issues and keys to. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 12, n. 1, p. 10-19, 2005.

ESTEVA, F. J., HORTOBAGYI, G. N. Prognostic molecular markers in early breast cancer. **Breast Cancer Research**, v. 6, n. 3, p. 109, 2004.

FANEYTE, I. F.; PETERSE, J. L.; VAN TINTEREN, H.; PRONK, C.; DE VRIES, E. G.; RODENHUIS, S.; VAN DE VIJVER, M. J. Predicting early failure after adjuvant chemotherapy in high-risk breast cancer patients with extensive lymph node involvement. **Clinical cancer research**, v. 10, n. 13, p. 4457-4463, 2004.

FARABEGOLI, F.; CHAMPENE, M. H.; BRIECH, I.; SANTINI, D.; CECCARELLI, C., DERENZINE, M.; LIDERAN, R. Genetic pathways in the evolution of breast ductal carcinoma "in situ". **The Journal of Pathology**, v. 196, n. 3, p. 280-286, 2002.

FUQUA, S. A. W. The role estrogen receptor in breast cancer metastasis. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 6, n. 4, p. 407-417, 2001.

FUQUA, S. A. W.; SCHIFF, R.; PARRA, I.; MOORE, J. T., MOSHIN, S. K.; OSBORNE, C. K.; CLARK, G. M.; ALFRED, D. C. Estrogen receptor beta protein in human breast cancer: correlation with clinical tumors parameters. **Cancer Research**, v. 63, n. 10, p. 2434-2439, 2003.

GERRATANA, L.; FANOTTO, V.; BONOTTO, M.; BOLZONELLO, S.; MINISINI, M.; FASOLA, G.; PUGLISI, F. Pattern of metastasis and outcome in patients with breast cancer. **Clinical & Experimental Metastasis**, v. 32, n. 2, p. 125-133, 2015.

GIANGRANDE, P. H.; POLLIO, G.; MCDONNELL, D. P. Mapping and characterization of the functional domains responsible for the differential activity of the A and B isoforms of the human progesterone receptor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 52, p. 32889-32900, 1997.

GRITZAPIS, A. D.; BAXEVANIS, C. N.; MISSITZIS, I.; KATSANOU, E. S.; ALEXIS, M. N.; YOTIS, J.; PAPAMICHAIL, M. Quantitative fluorescence cytometric measurement of estrogen and progesterone receptors: correlation with the hormone binding assay. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 80, n. 1, p. 1-13, 2003.

GUILFORD, P. J.; HOPKINS, J. B.; GRADY, W. M.; MARKOWITZ, S. D.; WILLIS, J.; LYNCH, H.; RAJPUT, A.; WIESNER, G. L.; LINDOR, N. M.; BURGART, L. J.; TORO, T. T.; LEE, D.; LIMACHER, J. M.; SHAW, D. W.; FINDLAY, M. P.; REEVE, A. E. E-cadherin germline mutations define an inherited cancer syndrome dominated by diffuse gastric cancer. **Human Mutation**, v. 14, n. 3, p. 249-255, 1999.

HAMMOND, M. E.; HAYES, D. F.; DOWSETT, M.; ALLRED, D. C.; HAGERTY, K. L.; BADVE, S.; FITZGIBBONS, P. L.; FRANCIS, G.; GOLDSTEIN, N. S.; HAYES, M.; HICKS, D. G.; LESTER, S.; LOVE, R.; MANGU, P. B.; MCSHANE, L.; OSBORNE, C. K.; PAIK, S.; PERLMUTTER, J.; RHODES, A.; SASANO, H.; SCWARTZ, J. N.; SWEEP, F. C. G.; TAUBE, S.; TORLAKOVIC, E. E.; VALENSTEIN, P.; VIALE, G.; VISSCHER, D.; WHEELER, T.; WILLIAMS, R. B.; WITTLIFF, J. L.; WOLFF, A. C. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 134, n. 6, p. 907-922, 2010.

HARVEY, J. M.; CLARK, G. M.; OSBORNE, C. K.; ALLRED, D. C. Estrogen receptor status by immunohistochemistry is superior to the ligand-binding assay for predicting response to adjuvant endocrine therapy in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 17, n. 5, p. 1474-1474, 1999.

HAYASHI, S.; SAKAMOTO, T.; INOUE, A.; YOSHIDA, N.; OMOTO, Y.; YAMAGUCHI, Y. Estrogen and growth factor signaling pathway: basic approaches for clinical application. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 86, n. 3, p. 433-442, 2003.

HIROHASHI, S. Inactivation of the E-cadherin-mediated cell adhesion system in human cancers. **The American Journal of Pathology**, v. 153, n. 2, p. 333-339, 1998.

HORTON, J. Trastuzumab use in breast cancer: clinical issues. **Cancer Control**, v. 9, n. 6, p. 499-499, 2002.

HUDZIAK, R. M.; SCHLESSINGER, J.; ULRICH, A. Increased expression of the putative growth-factor receptor p185HER2 causes transformation and tumorigenesis of NIH 3T3 cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 84, n. 20, p. 7159-7163, 1987.

INCA – Instituto Nacional de Câncer. **Estimativa 2016 incidência de câncer no Brasil: Síntese de resultados e comentários.** Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/sintese-de-resultados-comentarios.asp>>. Acesso em: 10/06/2016.

JACOBSEN, B. M.; RICHER, J. K.; SARTORIUS, C. A.; HORWITZ, K. B. Expression profiling of human breast cancers and gene regulation by progesterone receptors. **Journal of Mammary Gland Biology and Neoplasia**, v. 8, n. 3, p. 257-268, 2003.

JARVINEN, T. A. H.; PELTO-HUIKKO, M.; HOLLI, K.; ISOLA, J. Estrogen receptor β is coexpressed with ER α and PR and associated with nodal status, grade and proliferation rate in breast cancer. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 1, p. 29-35, 2000.

KHAN, S. A.; ROGERS, M. A. M.; KHURANA, K. K.; MEGUID, M. M.; NUMANN, P. J. Estrogen receptor expression in benign breast epithelium and breast cancer risk. **Journal of the National Cancer Institute**, v. 90, n. 1, p. 37-42, 1998.

KHAN, S. A.; YEE, K. A.; KAPLAN, C.; SIDDIQUI, J. F. Estrogen receptor alpha expression in normal human breast epithelium is consistent over time. **International Journal of Cancer**, v. 102, n. 4, p. 334-337, 2002.

KING, R. J.; WILLIAM, L. Estrogen and progestin effects in human breast carcinogenesis. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 27, n. 1, p. 3-15, 1993.

KLEIN, C. A.; BLANKENSTEIN, T. J.; SCHMIDT-KITTLER, O.; PETRONIO, M.; POLZER, B.; STOECKLEIN, N. H.; RIETHMULLER, G. Genetic heterogeneity of single disseminated tumour cells in minimal residual cancer. **The Lancet**, v. 360, n. 9334, p. 683-689, 2002.

LAMY, P. J.; PUJOL, P.; THEZENAS, S.; KRAMAR, A.; ROUANET, P.; GUILLEUX, F.; GRENIER, J. Progesterone receptor quantification as a strong prognostic determinant in postmenopausal breast cancer women under tamoxifen therapy. **Breast Cancer Research and Treatment**, v. 76, n. 1, p. 65-71, 2002.

LAWSON, J. S.; FIELD, A. S.; TRAN, D. D.; HOUSSAMI, N. Hormone replacement therapy use dramatically increases breast oestrogen receptor expression in obese postmenopausal women. **Breast Cancer Research**, v. 3, n. 5, p. 342-345, 2001.

LAWSON, J. S.; FIELD, A. S.; TRAN, D. D.; KILLEEN, J.; MASKARENIC, G.; ISHIKURA, H.; TRICHOPOULOS, D. Breast cancer incidence and estrogen receptor alpha in normal mammary tissue--an epidemiologic study among Japanese women in Japan and Hawaii. **International Journal of Cancer**, v. 97, n. 5, p. 685-687, 2002.

LEHMANN, U.; GLOCKNER, S.; KLEEBERGER, W.; VON WASIELEWSKI, H. F.; KREIPE, H. Detection of gene amplification in archival breast cancer specimens by laser-assisted microdissection and quantitative real-time polymerase chain reaction. **The American Journal of Pathology**, v. 156, n. 6, p. 1855-1864, 2000.

LEMIEUX, P.; FUQUA, S. The role of the estrogen receptor in tumor progression. **The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology**, v. 56, n. 1, p. 87-91, 1996.

MATTEI, M. G.; KRUST, A.; STROPP, U.; CHAMBON, P.; MATTEI, J. F. Assignment of the human progesterone receptor to the q22 band of chromosome 11. **Human Genetics**, v. 78, n. 1, p. 96-97, 1988.

MATTEI, M. G.; KRUST, A.; STROPP, U.; PASSAGE, E.; CHAMBON, P.; MATTEI, J. F. Assignment of the human progesterone receptor to the q22 band of chromosome 11 using in situ hybridization. **Cytogenetics and Cell Genetics**. Switzerland: Karger, 1987. p. 658-658.

NAGY, P.; JENEI, A.; DAMJANOVICH, S.; JOVIN, T. M., SZOLOSÍ, J. Complexity of signal transduction mediated by *ErbB2*: clues to the potential of receptor-targeted cancer therapy. **Pathology and Oncology Research**, v. 5, n. 4, p. 255-271, 1999.

NIH - NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH CONSENSUS DEVELOPMENT PANEL. National Institutes of Health Consensus Development Conference statement: diagnosis and management of dental caries throughout life, March 26-28, 2001. **The Journal of the American Dental Association**, v. 132, n. 8, p. 1153-1161, 2001.

ONDA, M.; EMI, M.; NAGAI, H.; NAGAHATA, T.; TSUMAGARI, K.; FUJIMOTO, T.; AKIYAMA, F.; SAKAMOTO, G.; MAKITA, M.; KASUMI, F.; MIKI, Y.; TANAKA, T.; TSUMODA, T.; NAKAMURA, Y. Gene expression patterns as marker for 5-year postoperative prognosis of primary breast cancers. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 130, n. 9, p. 537-545, 2004.

ORVIETO, E., DEI TOS, A. P. Measurement of HER-2/neu in breast cancer: which methodologic approach? **Pathologica**, v. 93, n. 3, p. 183-188, 2001.

OVERDUIM, M.; HARVEY, T. S.; BAGBY, S.; TONG, K. I.; YAU, P.; TAKEICHI, M.; IKURA, M. Solution structure of the epithelial cadherin domain responsible for selective cell adhesion. **Science**, v. 267, n. 5196, p. 386-389, 1995.

PANTEL, K.; BRAKENHOFF, R. H. Dissecting the metastatic cascade. **Nature Reviews Cancer**, v. 4, n. 6, p. 448-456, 2004.

PIATO, S.; PIATO, J. R. M. **Doenças da mama**, 1. ed., Rio de Janeiro: Revinter, 2006, 312 p.

Perou C.M; Sorlie T; Eisen MB; vande Rijn M; Jeffrey S.S; Renshaw C.A; Molecular portraits of human breast tumor. *Nature* 2000,406.747-52.

PIKE, M. C.; SPICER, D. V.; DAHMOUSH, L.; PRESS, M. F. Estrogens, progestogens, normal breast cell proliferation, and breast cancer risk. **Epidemiologic Reviews**, v. 15, n. 1, p. 17-35, 1993.

PINHO, P. L. V. Fisiologia Feminina antes da gravidez e os hormônios femininos. In: GUYTON, A. C.; HALL, J. E. (Orgs.) **Tratado de fisiologia médica**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan. 1997. p. 930-933.

PONGLIKITMONGKOL, M.; GREEN, S.; CHAMBON, P. Genomic organization of the human oestrogen receptor gene. **The EMBO journal**, v. 7, n. 11, p. 3385-3388, 1988.

PURUSHOTHAM, A.; SHAMIL, E.; CARIATI, M.; AGBAJE, O.; MUHIDIN, A.; GILLET, C.; MERA, A.; SIVANADIYAN, K.; HARRIES, M.; SULLIVAN, R.; PINDER, S. E.; GARMO, H.; HOLMBERG, L. Age at diagnosis and distant metastasis in breast cancer – A surprising inverse relationship. **European Journal of Cancer**, v. 50, n. 10, p. 1697-1705, 2014.

ROBERTSON, J. F. Oestrogen receptor: a stable phenotype in breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 73, n. 1, p. 5, 1996.

ROBISON, J. E., PERREARD, L., BERNARD, P. S. State of the science: molecular classifications of breast cancer for clinical diagnostics. **Clinical Biochemistry**, v. 37, n. 7, p. 572-578, 2004.

ROGER, P., SAHLA, M. E., MAKELA, S., GUSTAFSSON, J. A., BALDET, P., ROCHEFORT, H. Decreased expression of estrogen receptor β protein in proliferative preinvasive mammary tumors. **Cancer Research**, v. 61, n. 6, p. 2537-2541, 2001.

SAGARA, Y., MIMORI, K., YOSHINAGA, K., TANAKA, F., NISHIDA, K., OHNO, S., INOUE, H., MORI, M. Clinical significance of Caveolin-1, Caveolin-2 and HER2/neu mRNA expression in human breast cancer. **British Journal of Cancer**, v. 91, n. 5, p. 959-965, 2004.

SAVAS, B., KARAVELI, S., USLU, G., BASARAN, L. Significance of P53 and c-erbB-2 for predicting response to CMF treatment in breast carcinoma. **ASCO Proceedings**, v. 18, n. 18, p. 378-383, 1999.

SCHMIDT-KITTLER, O.; RAGG, T.; DASKALAKIS, A.; GRANZOW, M.; AHR, A., BLANKENSTEIN, T. J.; KAUFMANN, M.; DIEBOLD, J.; ARNHOLDT, H.; MULLER, P.; BISCHOFF, J.; HARICH D.; SCHLIMOK, G.; RIETHMULLER, G.; EILS, R.; KLEIN, C.A. From latent disseminated cells to overt metastasis: genetic analysis of systemic breast cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 100, n. 13, p. 7737-7742, 2003.

SHAABAN, A. M.; O'NEILL, P. A.; DAVIES, M. P.; SIBSON, R.; WEST, C. R.; SMITH, P. H.; FOSTER, C. S. Declining estrogen receptor-beta expression defines malignant progression of human breast neoplasia. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 27, n. 12, p. 1502-1512, 2003.

SHACHNEY, S. E.; SILVERMAN, J. F. Molecular evolutionary patterns in breast cancer. **Advances in Anatomic Pathology**, v. 10, n. 5, p. 278-290, 2003.

SHEIKH, M. S., GARCIA, M., PUJOL, P., FONTANA, J. A., ROCHEFORT, H. Why are estrogen receptor-negative breast cancer more aggressive than the estrogen receptor-positive breast cancer? **Invasion Metastasis**, v. 14, n. 6, p. 329-336, 1994.

SIDRANSKY, D. Emerging molecular markers of cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 2, n. 3, p. 210-219, 2002.

SKLIRIS, G. P.; MUNOT, K.; BELL, S. M.; CARDER, P. J.; LANE, S.; HORGAN, K.; LANSDOWN, M. R.; PARKES, A. T.; HANBY, A. M.; MARKHAM, A. F.; SPEIRS, V. Reduced expression of oestrogen receptor beta in invasive breast cancer and its re-expression using DNA methyl transferase inhibitors in a cell line model. **The Journal of Pathology**, v. 201, n. 2, p. 213-220, 2003.

SLAMON, D. J.; GODOLPHIN, W.; JONES, L. A.; HOLT, J. A.; WONG, S. G.; KEITH, D. E.; LEVIN, W. J.; STUART, S. G.; UDOVE, J.; ULDLRICH, A. Studies of the HER-2/neu protooncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v. 244, n. 4905, p. 707-713, 1989.

SLAMON, D. J.; LEYLAND-JONES, B.; SHAK, S.; FUCHS, H.; PATON, V.; BAJAMONDE, A.; FLEMING, T.; EIERMANN, W.; WOLTER, J.; PEGRAM, M.; BASELGA, J.; NORTON, L. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against *HER2* for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. **New England Journal of Medicine**, v. 344, n. 11, p. 783-792, 2001.

SOMMER, S., FUQUA, S. A. Estrogen receptor and breast cancer. **Seminars in Cancer Biology**, v. 11, n. 5, p. 339-352, 2001.

SORLIE, T. Molecular portraits of breast cancer: tumour subtypes as distinct disease entities. **European Journal of Cancer**, v. 40, n. 18, p. 2667-2675, 2004.

SUNPAWERAVONG, S.; SUNPAWERAVONG, P. Recent developments in critical genes in the molecular biology of breast cancer. **Asian Journal of Surgery**, v. 28, n. 1, p. 71-75, 2005.

TANNER, M.; JARVINEN, P.; ISOLA, J. Amplification of HER-2/neu and topoisomerase IIalpha in primary and metastatic breast cancer. **Cancer Research**, v. 61, n. 14, p. 5345-5348, 2001.

VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; VAN'T VEER, L. J.; DAI, H.; HART, A. A.; VOSKUIL, D. W.; SCHREIBER, G. J.; PETERSE, H. L.; ROBERTS, C.; MARTON, M. J.; PARRISH, M.; ATSMA, D.; WITTEVEEN, A. T.; GLAS, A.; DELAHAYE, L.; VAN DER VELDE, BARTELINK, H.; RODENHUIS, S.; RUTGERS, E.T.; FRIEND, S.H.; BERNARDS, R. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 347, n. 25, p. 1999-2009, 2002.

VAN'T VEER, L. J.; DAI, H.; VAN DE VIJVER, M. J.; HE, Y. D.; HART, A. A.; MAO, M.; PETERSE, H. L.; VAN DER, K. K.; MARTON, M. J.; WITTEVEEN, A. T.; SCHREIBER, G. J.; KERKHOVEN, R. M.; ROBERTS, C.; LINSLEY, P. S.; BERNARDS, R.; FRIEND, S. H. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. **Nature**, v. 415, n. 6871, p. 530-536, 2002.

VERGOTE, I.; NEVEN, P.; VAN DAM, P.; SERREYN, R.; DE PRINS, F.; DE SUTTER, P.; ALBERTYN, G. The estrogen receptor and its selective modulators in gynaecological and breast cancer. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 4, p. 1-9, 2000.

VOGEL, C. L.; COBLEIGH, M. A.; TRIPATHY, D.; GUTHEIL, J. C.; HARRIS, L. N.; FEHRENBACHER, L.; SLAMON, D. J.; MURPHY, M.; NOVOTNY, W. F.; BURCHMORE, M.; SHAK, S.; STEWART, S. J. First-line Herceptin monotherapy in metastatic breast cancer. **Oncology**, v. 61, n. 2, p. 37-42, 2001.

VOGEL, C. L.; COBLEIGH, M. A.; TRIPATHY, D.; GUTHEIL, J. C.; HARRIS, L. N.; FEHRENBACHER, L.; SLAMON, D. J.; MURPHY, M.; NOVOTNY, W. F.; BURCHMORE, M.; SHAK, S.; STEWART, S. J.; PRESS, M. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 20, n. 3, p. 719-726, 2002.

VOGELSTEIN, B., FEARON, E. R.; HAMILTON, S. R.; KERN, S. E.; PREISINGER, A. C.; LEPPERT, M.; NAKAMURA Y.; WHITE, R.; SMITS, A. M.; BOS, J. L. Genetic alterations during colorectal-tumor development. **New England Journal of Medicine**, v. 319, n. 9, p. 525-532, 1988.

WEI, B.; WANG, J.; BOURNE, P.; YANG, Q.; HICKS, D.; BU, H., TANG, P. Bone metastasis is strongly associated with estrogen receptor-positive/progesterone receptor-negative breast carcinomas. **Human Pathology**, v. 39, n. 12, p. 1809-1815, 2008.

WILLET, K. E.; MCMENAMIN, P.; PINKERTON, K. E.; IKEGAMI, M.; JOBE, A. H.; GURRIN, L.; SLY, P. D. Lung morphometry and collagen and elastin content: changes during normal development and after prenatal hormone exposure in sheep. **Pediatric Research**, v. 45, p. 615-625, 1999.

WLUDARSKI, S. C. L.; BACCHI, C. E. High concordance of SP3 rabbit monoclonal antibody with FISH to evaluate HER2 in breast carcinoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 16, n. 5, p. 466-470, 2008.

WOELFLE, U.; CLOOS, J.; SAUTER, G.; RIETHDORF, L.; JANICKE, F.; VAN DIEST, P.; BRAKENHOFF, R.; PANTEL, K. Molecular signature associated with bone marrow micrometastasis in human breast cancer. **Cancer Research**, v. 63, n. 18, p. 5679-5684, 2003.



WOLFF, A. C.; HAMMOND, M. E. H.; SCHWARTZ, J. N.; HAGERTY, K. L.; ALLRED, D. C.; COTE, R. J.; DOWSETT, M.; FITZGIBBONS, P. L.; HANNA, W. M.; LANGER, M.; MCSHANE, L. M.; PAIK, S.; PEGRAM, M. D.; PEREZ, E. A.; PRESS, M. F.; RHODES, A.; STURGEON, C.; TAUBE, S. E.; TUBBS, R.; VANCE, G. H.; VAN DE VIJVER, M.; WHEELER, T. M.; HAYES, D. F. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **Journal of Clinical Oncology**, v. 25, n. 1, p. 118-145, 2006.

YANG, J.; GUZMAN, R.; NANDI, S. Reconstituted normal human breast in nude mice: estrogen and progesterone receptors regulation. **In vivo**, v. 15, n. 3, p. 239-244, 2001.

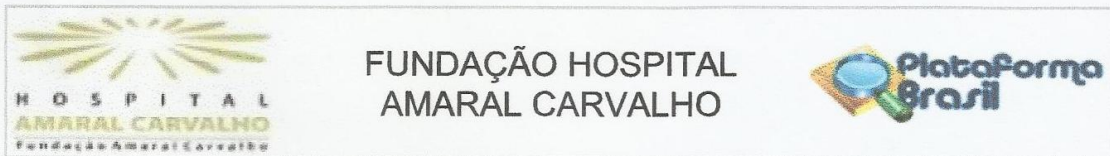
YOKOTA, J. Tumor progression and metastasis. **Carcinogenesis**, v. 21, n. 3, p. 497-503, 2000.

ANEXOS E APÊNDICES

ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética

 <p>HOSPITAL AMARAL CARVALHO Fundação Amaral Carvalho</p>	<p>FUNDAÇÃO HOSPITAL AMARAL CARVALHO</p>	 <p>Plataforma Brasil</p>
<p>PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP</p>		
<p>DADOS DO PROJETO DE PESQUISA</p>		
<p>Título da Pesquisa: Avaliação da possível manifestação preferencial das metástases ósseas do carcinoma de mama para ossos longos ou chatos conforme os subtipos moleculares</p>		
<p>Pesquisador: Paulo Roberto de Andrade Figaro Caldeira</p>		
<p>Área Temática:</p>		
<p>Versão: 2</p>		
<p>CAAE: 54810216.0.0000.5434</p>		
<p>Instituição Proponente: FUNDACAO DOUTOR AMARAL CARVALHO</p>		
<p>Patrocinador Principal: Financiamento Próprio</p>		
<p>DADOS DO PARECER</p>		
<p>Número do Parecer: 1.546.684</p>		
<p>Apresentação do Projeto:</p>		
<p>Título da Pesquisa: Avaliação da possível manifestação preferencial das metástases ósseas do carcinoma de mama para ossos longos ou chatos conforme os subtipos moleculares</p>		
<p>Paulo Roberto de Andrade Figaro Caldeira.</p>		
<p>Trata-se de atendimento para sanar a pendência do Parecer:</p>		
<p>Número 1.507.043 de 19/04/2016 - CEP HAC</p>		
<p>SITUAÇÃO: PENDENTE</p>		
<p>Objetivo da Pesquisa:</p>		
<p>Objetivo Primário:</p>		
<p>Detectar a instalação dos diferentes sítios metastáticos para ossos longos ou chatos (curtos), conforme os subtipos moleculares e possível correlação.</p>		
<p>Objetivo Secundário:</p>		
<p>Avaliar se há precocidade na instalação dos implantes ósseos conforme os subtipos moleculares, medidos em meses, após a cirurgia (intervalo livre);</p>		
<p>Endereço: Rua das Palmeiras, 89 Bairro: VILA ASSIS CEP: 17.210-120 UF: SP Município: JAU Telefone: (14)3602-1194 Fax: (14)3602-1207 E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br</p>		

ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética (continuação)



Continuação do Parecer: 1.546.684

Detectar se há correlação entre idade da paciente ao diagnóstico (< 50 a ou 50 a) e precocidade dos implantes secundários.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Nihil

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Nihil

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O parecer 1.507.043 de 19/04/2016 - CEP HAC indicou que a Falta dos seguintes documentos:

- folha de rosto (a que está inserida na plataforma pertence a outro pesquisador e a outro projeto);
- faltam currículos dos pesquisadores.

Recomendações:

Recomendação: Providenciar a folha de rosto; e os currículos do pesquisador e do orientador

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Tendo em vista que as pendências foram extintas, as recomendações foram atendidas, sou favorável a aprovação do presente projeto.

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado acompanha o parecer do relator.

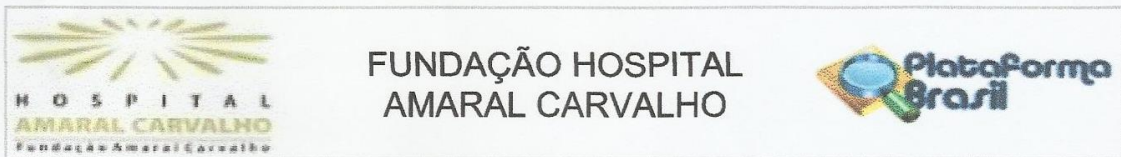
Informamos que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou da votação.

Aproveito para recordar-lhe do compromisso de enviar relatórios semestrais referentes à evolução do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_676813.pdf	10/05/2016 08:18:27		Aceito

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
 Bairro: VILA ASSIS CEP: 17.210-120
 UF: SP Município: JAU
 Telefone: (14)3602-1194 Fax: (14)3602-1207 E-mail: cep.aurea@amaralcarvalho.org.br

ANEXO I. Aprovação do Comitê de Ética (conclusão)

Continuação do Parecer: 1.546.684

Declaração de Pesquisadores	Curriculum.pdf	10/05/2016 08:16:47	Paulo Roberto de Andrade Fígaro Caldeira	Aceito
Folha de Rosto	FolhaDeRosto1.pdf	09/05/2016 12:21:11	Jeferson Rodrigo Ramos do Couto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	BrochuraInvestigador.pdf	30/03/2016 11:23:10	Jeferson Rodrigo Ramos do Couto	Aceito
Outros	Autorizacao007.pdf	24/03/2016 12:07:05	Jeferson Rodrigo Ramos do Couto	Aceito
Outros	Encaminhamento.pdf	10/03/2016 09:08:36	Paulo Roberto de Andrade Fígaro Caldeira	Aceito
Outros	Outros.pdf	10/03/2016 09:06:42	Paulo Roberto de Andrade Fígaro Caldeira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	10/03/2016 09:02:37	Paulo Roberto de Andrade Fígaro Caldeira	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura.pdf	10/03/2016 09:02:23	Paulo Roberto de Andrade Fígaro Caldeira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

JAU, 16 de Maio de 2016

Assinado por:
Osvaldo Contador Junior
(Coordenador)

Endereço: Rua das Palmeiras, 89
Bairro: VILA ASSIS **CEP:** 17.210-120
UF: SP **Município:** JAU
Telefone: (14)3602-1194 **Fax:** (14)3602-1207 **E-mail:** cep.aurea@amaralcarvalho.org.br

APÊNDICE II. Tabulação dos dados coletados

	INICIAIS	CLIAM	IDADE AO DIAG. (ANOS)	TIPO HISTOLÓGICO	LUMINAL A	LUMINAL B	HIBRIDO	TRIPLO NEG.	HER-2	SÍTIO MEST. (OSSOS)	INTERVALO LIVRE (MESES)	E-CADERINA
1	CNR	-	62	CDI	X					ESTERNO E ESP. ILÍACA D	21	POSITIVO (2+) EM 20%
2	WMC	-	58	CDI G3 (Paget)			X			ESTERNO E ARCOS COSTAIS	84	
3		-	38	CDI G3	X					VÉRTEBRA LOMBAR	32	
4	MSSS	UNIMED	53	CDI G2	X					FÊMUR	204	
5	ETP	UNIMED	63	CDI G3	X					CRÂNIO	15	
6		UNIMED	43	CDI G2			X			ESTERNO	25	
7	RMSP	UNIMED	45	CDI G2					X	VÉRTEBRA LOMBAR	21	
8	DR5	-	46	CDI G2				X		CRÂNIO, COSTELAS E VÉRTEBRAS	17	POSITIVO (2+)
9	CLMS	-	59	CDI G3					X	COLUNA T/L E FÊMUR E	10	
10	MIC	-	36	CDI G2			X			FÊMUR D	42	
11	ACTN		74	Carcinoma mucinoso	X					BACIA	34	POSITIVO (2+)
12		-	39	CLI	X					BACIA (ILÍACA) D	28	
13	IGA	-	63	CDI G2		X				CLAVÍCULA D (LONGA)	97	POSITIVO (2+)
14	MCB	-	75	CDI G3					X	COLUNA DORSAL E LOMBAR	3	POSITIVO (1+)
15	NCS	-	57	CDI G2		X				COLUNA LOMBAR, BACIA, COSTELA	86	POSITIVO (1+)
16	EF5	-	46	CDI G2	X					COLUNA SACRA	48	POSITIVO (1+)
17	HSR	-	69	CDI G2		X				ARCOS COSTAIS, COLUNA DORSAL, BACIA	42	NEGATIVO
18	MDT5	-	56	CDI G2	X					BACIA	12	POSITIVO (1+)
19	CO		67	CLI	X					COLUNA TORACO LOMBAR	10	
20	TS		80	CDI G2	X					COLUNA TORACICA	47	POSITIVO (2+)
21	SFOF		37	CDI G3				X		COLUNA TORACICA	35	POSITIVO (3+)
22	MLA		58	CDI G3			X			COLUNA TORACICA	43	POSITIVO (2+)
23	MFP		71	CDI G3	X					COLUNA TORACICA LOMBAR	15	POSITIVO (3+)

APÊNDICE II. Tabulação dos dados coletados (continuação)

INICIAIS	CLIAM	IDADE AO DIAG. (ANOS)	TIPO HISTOLÓGICO	LUMINAL A	LUMINAL B	HIBRIDO	TRIPLO NEG.	HER-2	SÍTIO MEST. (OSSOS)	INTERVALO LIVRE (MESES)	E-CADERINA
24	MTSO	47	CDI G1	X					COLUNA LOMBAR E COSTELA	15	
25	TD	56	CDI G3			X			ESTERNO	13	POSITIVO (2+)
26	VLCV	57	CDI G2		X				COLUNA LOMBAR E TORACICA	11	POSITIVO (3+)
27	VP	59	CARCINOMA APÓCRINO		X				COLUNA, FÊMUR, ÚMERO e BACIA	51	POSITIVO (3+)
28	HRA	57	CDI G2		X				COLUNA TORACICA LOMBAR, FÊMUR	27	POSITIVO (2+)
29	YGL	67	CDI G2				X		COLUNA DORSAL LOMBAR FÊMUR D E	6	POSITIVO (2+)
30	ECCM	35	CDI G2		X				CRÂNIO COLUNA DORSAL E LOMBAR	13	POSITIVO (3+)
31	JAA	74	CDI G2 MAMA DIREIRA CDI G2 MAMA ESQ.	X					FÊMUR ESQUERDO, CRÂNIO, COLUNA DORSAL E LOMBAR	22	
32	RLC	51	CDI (POS QT)			X			ESCÁPULO ESQUERDO, ÚMERO ESQUERDO	7	POSITIVO (3+)
33	TW	39	CDI G2			X			ARCOS COSTAIS, COLUNA DORSAL LOMBAR	22	POSITIVO (2+)
34	MCS	48	CDI G2		X				ARCOS COSTAIS, COLUNA DORSAL LOMBAR	16	
35	MJAR	81	CDI G2		X				COSTELAS, FÊMUR	25	POSITIVO (2+)
36	NSS	37	CDI G2		X				COSTELAS, BACIA, FÊMUR ESQUERDO	17	POSITIVO (1+)
37	INDO	57	CDI G2			X			CRÂNIO, COSTELAS, ESTERNO, BACIA	30	POSITIVO (3+)
38	BB	42	CDI G2	X					COLUNA TORÁCICA LOMBAR, COSTELAS CRÂNIO	49	POSITIVO (2+)
39	APNL	57	CDI G3					X	COLUNA, BACIA, CRÂNIO, COSTELAS	59	POSITIVO (3+)
40	SPC	33	CDI G2			X			COLUNA TORÁCICA, CLAVI, COSTELAS, COLUNA	24	POSITIVO (3+)
41	MMSVB	64	CDI G3				X		COLUNA LOMBAR, BACIA	17	
42	EAC	42	CDI G2	X					CRÂNIO, COLUNA DORSAL, LOMBAR	51	POSITIVO (2+)
43	SLF	60	CDI G3	X					COSTELAS, COLUNA, BACIA	47	POSITIVO (3+)
44	RIS	45	CDI G2		X				COLUNA, BACIA	39	POSITIVO (1+)
45	EAP	45	LOBULAR INFILTRANTE				X		COLUNA, FÊMUR	80	MATERIAL SE SOLTOU (ARTEFATO)

APÊNDICE II. Tabulação dos dados coletados (*conclusão*)

INICIAIS	CLIAM	IDADE AO DIAG. (ANOS)	TIPO HISTOLÓGICO	LUMINAL A	LUMINAL B	HIBRIDO	TRIPLO NEG.	HER-2	SÍTIO MEST. (OSSOS)	INTERVALO LIVRE (MESES)	E-CADERINA
46	NSG	55	LOBULAR INFILTRANTE	X					BACIA, FÊMUR	70	NEGATIVO
47	MFMM	76	CDI G2	X					COLUNA, BACIA	11	POSITIVO (1+) EM ÁREAS
48	DCD	41	CDI G2		X				BACIA	9	POSITIVO (1+)
49	TBS	49	CDI G3				X		ESTERNO, BACIA	47	POSITIVO (3+)
50	MAFT	65	CDI G2	X					COSTELAS, BACIA, COLUNA	12	POSITIVO (3+)
51	MFF	73	CDI G2	X					CRÂNIO, FÊMUR, BACIA	21	
52	CASB	71	CDI G2	X					COLUNA	28	POSITIVO (1+) MATERIAL EXÍGUO
53	GCB	69	CDI G3				X		ÚMERO, COLUNA, FÊMUR, BACIA	10	
54	MAMR	41	CDI G2				X		ESTERNO, COSTELAS, COLUNA, BACIA, FÊMUR	42	POSITIVO (2+)
55	ESS	41	CDI G2				X		FÊMUR	35	POSITIVO (2+)
56	SMMF	47	CDI G3		X				FÊMUR	8	MATERIAL SE SOLTOU (ARTEFATO)
57	CGCL	52	CDI G2		X				ÚMERO, COLUNA, COSTELAS	17	
58	MCC	59	CDI G2				X		BACIA, FÊMUR, COLUNA	42	POSITIVO (2+)

APÊNDICE III. Distribuição dos intervalos livres e idade

ABAIXO DE 50 ANOS		ACIMA DE 50 ANOS	
IDADE	INTERVALO LIVRE	IDADE	INTERVALO LIVRE
38	32	62	21
43	25	58	84
45	21	53	204
46	17	63	15
36	42	59	10
39	28	74	34
46	48	63	97
56	12	75	3
37	35	57	86
47	15	69	42
35	13	67	10
39	22	80	47
48	16	58	43
37	17	71	15
42	49	56	13
33	24	57	11
42	51	59	51
45	39	57	27
45	80	67	6
41	9	74	22
49	47	51	7
41	42	81	25
41	35	57	30
47	8	57	59
		64	17
		60	47

APÊNDICE III. Distribuição dos intervalos livres e idade (*conclusão*)

55	70
76	11
65	12
73	21
71	28
69	10
52	17
59	42

MÉDIA	30,29 MESES
-------	-------------

MÉDIA	36,38 MESES
-------	-------------