

JULIANA ARÔXA PEREIRA BARBOSA



**A AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA NO ESTADIAMENTO
DO CÂNCER DE MAMA**

RECIFE-PE

2013

JULIANA ARÔXA PEREIRA BARBOSA

**A AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA NO ESTADIAMENTO
DO CÂNCER DE MAMA**

2013

JULIANA ARÔXA PEREIRA BARBOSA

**A AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA NO ESTADIAMENTO
DO CÂNCER DE MAMA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Patologia, orientado pela Profa. Dra. Liriane Baratella Evêncio e co-orientado pela Profa. Dra. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima.
Linha de Pesquisa: Patologia e Epidemiologia das Doenças Neoplásicas e do Desenvolvimento.

Recife
2013

Ficha catalográfica elaborada por:
Mônica Uchôa, CRB4-1010

B238a Barbosa, Juliana Arôxa Pereira.
 A avaliação da medula óssea no estadiamento do câncer de mama /
 Juliana Arôxa Pereira Barbosa. – Recife: O autor, 2013.
 125 f.: il.; tab.; quad.; gráf.; 30 cm.

 Orientadora: Liriane Baratella Evêncio.
 Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
 CCS. Programa de Pós-Graduação em Patologia, 2013.
 Inclui referências, apêndices e anexos.

 1. Neoplasias. 2. Medula óssea. 3. Metástase. I. Evêncio, Liriane
 Baratella (Orientadora). II. Título.

616.07

CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2013-128)



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA

Centro de Ciências da Saúde - UFPE

Av. Prof. Moraes Rego 1235 - Cidade Universitária - CEP: 50670-901 - Recife – PE

Prédio da Pós-graduação do Centro de Ciências da Saúde (CCS) - térreo

Fone/Fax: (81) 2126.8529

<http://www.pospat.ufpe.br>

DISSERTAÇÃO DEFENDIDA PARA OBTENÇÃO DO TÍTULO DE MESTRE EM PATOLOGIA.

AUTOR: JULIANA ARÔXA PEREIRA BARBOSA

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA

NOME DA DISSERTAÇÃO: “A AVALIAÇÃO DA MEDULA ÓSSEA NO ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA”.

ORIENTADORA: PROF^a.. DR^a. LIRIANE BARATELLA EVÊNCIO

DATA DA DEFESA: 20 DE MAIO DE 2013.

BANCA EXAMINADORA:

Prof. Dr. Roberto José Vieira de Mello

Prof. Dr. Mario Ribeiro de Melo Júnior

Prof. Dr. Antônio Simão dos Santos Figueira Filho

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
REITOR

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

VICE-REITOR

Prof. Sílvio Romero de Barros Marques

PRÓ-REITOR PARA ASSUNTOS DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

Prof. Francisco de Souza Ramos

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA
CHEFE

Profa. Catarina de Oliveira Neves

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
COORDENADOR

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

VICE-COORDENADOR

Profa. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

CORPO DOCENTE

Profa. Eulália Camelo Pessoa de Azevedo Ximenes

Prof. Jacinto da Costa Silva Neto

Profa. Liriane Baratella Evêncio

Prof. Lucas André Cavalcante Brandão

Profa. Manuela Figueiroa Lyra de Freitas

Profa. Maria Bernadete Souza Maia

Profa. Maria do Carmo Carvalho de Abreu e Lima

Prof. Mário Ribeiro de Melo Júnior

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Profa. Paloma Lys de Medeiros

Profa. Rejane Pereira Neves

Prof. Roberto José Vieira de Mello

Profa. Willa Tatiana Ferreira e Silva

A Deus, que mantém o sopro celestial
em minha alma e fortalece a cada dia as minhas energias.

Aos meus queridos pais
que me ensinaram as grandes lições da vida:

**José Maria Barbosa e
Eliane Arôxa Pereira Barbosa**

Ao meu grande companheiro e esposo
que escolheu caminhar ao meu lado, nesta fantástica aventura do viver:

João Carlos de Melo Araújo

Aos meus queridos filhos

João Gabriel Arôxa Barbosa Guimarães

João Filipe Arôxa Barbosa de Melo

Maria Júlia Arôxa Barbosa de Melo

que desde muito cedo aprenderam a dividir a mamãe com a
Patologia e sempre me apoiaram com muito carinho nesta jornada
e são os grandes vencedores dessa luta.

Ao meu enteado

João Carlos de Melo Araújo Filho

que necessita despertar para o valor do conhecimento.

A minha querida irmã

Marcela Arôxa Pereira Barbosa

que representou um estímulo para a realização de meu mestrado e
sempre me recebeu com tanto carinho, assim como meu cunhado e minhas

sobrinhas **Maria Carolina Arôxa Barbosa de Siqueira**

que por muitas vezes nos cedeu seu lindo quarto, além

de **Maria Isabela Arôxa Barbosa de Siqueira**

que foi se formando dentro da barriguinha da mamãe durante este período.

A todos os meus alunos e ex-alunos

que irão abraçar uma causa e contribuir para a melhoria da humanidade.

Às minhas queridas Médicas Residentes de Patologia

que escolheram o exercício desta especialidade e exercerão

em plenitude a brilhante tarefa médica de fazer os diagnósticos

dos nossos pacientes.

À todas as pacientes portadoras de

Câncer de Mama, assim como seus familiares que tanto lutam contra esta patologia,

especialmente às pacientes deste estudo que contribuíram voluntariamente

para o progresso da luta contra o câncer.

Agradecimentos

Aqui segue meus sinceros agradecimentos à minha querida professora, orientadora Dra. Liriane Baratella Evêncio que permitiu a construção de um conhecimento e me fez acreditar e entender o real sentido da docência.

À minha querida Co-orientadora Dra. Maria do Carmo de Abreu e Lima, uma inspiração na Patologia Cirúrgica e um grande estímulo no exercício da Patologia e prática da perfeição.

A toda a equipe do mestrado que tanto me fortaleceu na busca deste título e especialmente aos colegas da turma 2010, sobreviventes e companheiros desta jornada.

Agradeço imensamente à equipe do Laboratório NPDC/Arapiraca especialmente a amiga/irmã, Ana Paula Fernandes Barbosa exemplo de Patologista, motivo de orgulho para os Alagoanos; exemplo de profissional e sobretudo de ser humano, pessoa querida de brilho muito próprio. Segue também um especial agradecimento a grande amiga Juliana Pedrosa de Holanda Marques.

À equipe de todo o Hospital Universitário, especialmente à Direção Geral, Direção de Ensino e Direção Técnica, que me permitiu realizar esta pesquisa.

Faltam palavras de agradecimentos ao setor de Hematologia do HUPAA, especialmente a minha querida Hematologista Thiana Tenório Marinho, profissional humana, dedicada e com muita avidez à pesquisa, assim como a Maria Leonalva de Holanda Santos.

Agradeço também aos Oncologistas e Cirurgiões do HUPAA que acreditaram, enviaram e acompanharam as nossas pacientes, assim como à equipe do laboratório clínico, especialmente à Sheilla Karynna Marcedo de Almeida.

Ao Setor de Patologia do HUPAA, que faz parte de minha vida, todo o meu respeito e gratidão. Aos nossos colaboradores especialmente a Luana Lima da Silva Mendes, Alane Patrícia e minhas queridas Residentes de Patologia: Rafaella Mendonça, Ana Mesquita, Maria Eduarda Baía; além dos nossos queridos mestres e patologistas Dr. Ricardo Houly e Romualdo Caldas.

Às minhas queridas mestras e sócias Dra. Carmen Pereira Ramos e Maria do Carmo Balwani que iniciaram toda a minha formação acadêmica e profissional na Patologia, assim como a toda equipe do CEPAMA (Centro de Patologia de Maceió).

Resumo

Neste trabalho avaliamos a frequência da detecção de células tumorais em medula óssea, através da biópsia com exame anatomopatológico e técnica de imuno-histoquímica utilizando CK-19, nas pacientes com diagnóstico de câncer de mama, assim como correlacionar os casos positivos com estudo morfológico da medula óssea, com critérios histopatológicos e perfil imuno-histoquímico dos tumores primários. Biópsias de medula óssea foram obtidas de 32 pacientes do sexo feminino com câncer de mama. As amostras foram processadas dentro da rotina para microscopia de luz, coradas pela técnica do H&E, Tricrômico de Gomory e Reticulina, assim como complementada com técnica de imuno-histoquímica utilizando a Citoqueratina 19 como imunomarcador, além de correlacionada com o perfil imuno-histoquímico e características morfológicas do tumor primário. Dentre os nossos resultados a 3% das 32 pacientes tiveram positividade na medula óssea para CK-19 indicando presença de metástases. Foi observada uma relação direta entre a positividade para CK19 e presença de fibrose na medula, podendo este último corresponder a um critério indireto morfológico indicador de infiltração medular. Nenhuma associação foi encontrada entre a positividade da medula e tamanho do tumor primário, receptor de estrógeno e progesterona, expressão de HER2/neu, p53, Ki67, CD 34, além da idade da paciente, etnia, tipo de procedimento cirúrgico, mama acometida e local do tumor. Em nossa série concluímos 3% de positividade para micrometástases, não havendo associação estatística com os critérios de agressividade tumoral como: tamanho do tumor, grau histológico, grau nuclear, receptores hormonais (RE/RP), expressão do HER2/neu, reafirmando os dados da literatura, enfatizando a necessidade de avaliar a medula óssea das pacientes com câncer de mama como procedimento de rotina. A presença de fibrose na medula teve significância estatística, podendo a mesma ser utilizada como critério indireto de avaliação de infiltração medular, sugerindo que os resultados das biópsias foram legítimos, podendo esta técnica ser utilizada na prática clínica para pesquisas de micrometástases na MO.

Palavras-chaves: Neoplasias de mama. Medula óssea. Metástases.

Abstract

In this study evaluated the frequency of detection of tumor cells in bone marrow by biopsy and immunohistochemical techniques using CK-19, in patients with breast cancer, as well as the positive cases correlate with morphological study of bone marrow, with histological pathological criteria and immunohistochemical rendered a profile of primary tumors. Bone marrow biopsies were obtained from 32 female patients with breast cancer. The samples were processed in the routine light microscopy, stained by H & E, trichrome Gomory and Reticulin, as complemented with a immunohistochemical techniques using cytokeratin 19 as a imuno marker, and correlated with immunohistochemical es profile and morphological characteristics of the primary tumor. 3% of the 32 patients had positive bone marrow CK-19 indicating the presence of metastases. We observed a direct relationship between positivity for CK19 and fibrosis in the marrow, which may correspond to a morphological criterion, an indirect indicator of marrow infiltration. Additionally observed were, correlations between positive marrow and primary tumor size, estrogen receptor and progesterone expression of HER2/neu, p53, Ki67, CD 34, and the patient's age, ethnicity, type of surgical procedure, breast involved and tumor site, these observation revealed no association found. In our study we conclude 3% positive for micro-metastases, there was no statistical association with tumor aggressiveness criteria such as tumor size, histological grade, nuclear grade, hormone receptor (ER / PR), HER2/neu expression, reaffirming the literature, emphasizing the need to evaluate the bone marrow of patients with breast cancer as a routine procedure. The presence of marrow fibrosis was statistically significant, since it can be used as an indirect assessment criteria for marrow infiltration suggesting, that the biopsy results were legitimate, this technique can be used in clinical research for micro-metastases in MO.

Keywords: Breast Neoplasms. Bone Marrow. Metastases.

Lista de Ilustrações

REVISÃO DA LITERATURA.....	16
Figura 1: Histologia da mama normal, exibindo lóbulos e ductos.....	17
Figura 2: Histologia da mama normal, ductos revestidos por dupla camada celular.....	17
Figura 3: Histologia da mama normal, exibindo estrutura lobular.....	17
Figura 4: Histopatologia do carcinoma ductal <i>in situ</i>	25
Figura 5: Histopatologia do carcinoma ductal <i>in situ</i>	25
Figura 6: Histopatologia do carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações.....	25
Figura 7: Histopatologia do carcinoma ductal infiltrante sem outras especificações	25
Figura 8: Histopatologia do carcinoma ductal infiltrante (SOE).....	25
Figura 9: Histopatologia do carcinoma ductal infiltrante (SOE).....	25
Figura 10: Imagem submacroscópica de carcinoma lobular <i>in situ</i>	26
Figura 11: Histopatologia do carcinoma lobular <i>in situ</i>	26
Figura 12: Histopatologia do carcinoma lobular infiltrante.....	26
Figura 13: Histopatologia do carcinoma lobular infiltrante.....	26
Figura 14: Histopatologia de carcinoma mucinoso.....	26
Figura 15: Histopatologia do carcinoma adenóide-cístico.....	26
Figura 16: Histopatologia da metástase em MO.....	32
Figura 17: Histopatologia da metástase pulmonar/pleural.....	32
Figura 18: Histopatologia da metástase linfonodal.....	33
Figura 19: Macroscopia do carcinoma inflamatório.....	34
Figura 20: Microscopia do carcinoma inflamatório.....	34
Figura 21 A: Microscopia da formação tubular. Grande formação tubular.....	36
Figura 21 B: Microscopia da formação tubular. Pouca formação tubular.....	36
Figura 22 A: Microscopia com pleomorfismo celular leve.....	37
Figura 22 B: Microscopia com pleomorfismo celular moderado.....	37
Figura 22 C: Microscopia com pleomorfismo celular acentuado.....	37
Figura 23: Microscopia de carcinoma de baixo grau.....	37
Figura 24: Microscopia de carcinoma de grau moderado.....	37
Figura 25: Microscopia de carcinoma de grau acentuado.....	37
Figura 26 A: Imuno-histoquímica - receptores de estrógeno fortemente marcados.....	39

Figura 26 B: Imuno-histoquímica - receptores de estrógeno moderadamente marcados.....	39
Figura 26 C: Imuno-histoquímica - receptores de estrógeno pouco marcado.....	39
Figura 27 A: Imuno-histoquímica – receptores de progesterona fortemente marcados.....	39
Figura 27 B: Imuno-histoquímica - receptores de progesterona pouco marcados.....	39
Figura 28: Imuno-histoquímica – Forte Expressão HER2/neu.....	40
Figura 29: Imuno-histoquímica – Moderada Expressão HER2/neu.....	41
Figura 30: Imuno-histoquímica – Fraca expressão do HER2/neu.....	41
Figura 31: Microscopia da invasão vascular.	42
Figura 32: Histologia da medula óssea normal.....	50
Figura 33: Estruturação da medula óssea (osteoblasto/osteoclasto).....	52
 Primeiro Artigo	 71
Figura 1: Microscopia da micrometástase na MO.....	76
Figura 2: Imuno-histoquímica da expressão de CK19.....	76
 Segundo Artigo	 89
Figura 1: Microscopia da micrometástase na MO.....	95
Figura 2: Imuno-histoquímica da expressão de CK19.....	95
 Terceiro Artigo	 105
Figura 1: Microscopia da micrometástase na MO.....	111
Figura 2: Imuno-histoquímica da expressão de CK19.....	111
Figura 3: Histologia da MO corada pelo Masson.....	112
Figura 4: Histologia da MO corada pela Reticulina.....	112
Figura 5: MO evidenciando fibrose no H&E.....	113
Figura 6: MO com fibrose H&E.....	113
Figura 7: MO corada Masson com fibrose e micrometástase.....	113
Figura 8: MO corada Reticulina com fibrose.....	113
Figura 9: MO corada Reticulina com fibrose.....	113
Figura 10: MO corada Masson com fibrose de micrometástase.....	113

Lista de Quadros e Tabelas

REVISÃO DE LITERATURA.....	16
Quadro 1: Classificação dos tumores epiteliais da mama (OMS).....	27
Quadro 2: Classificação dos carcinomas invasivos da mama (OMS).....	28
Quadro 3: Classificação dos tumores da mama (OMS).....	28
Quadro 4: Classificação dos tumores não epiteliais da mama (OMS).....	29
Quadro 5: Fatores prognósticos em câncer de mama.....	30
Quadro 6: Fatores prognósticos definidos por AJCC.....	31
Quadro 7: Sistema de graduação histológica de <i>Nottingham</i> modificada Elston e Ellis.....	36
Quadro 8 A: Estadiamento do câncer de mama segundo TNM.....	46
Quadro 8 B: Estadiamento do câncer de mama segundo TNM.....	47
Quadro 9: Estadiamento clínico do câncer de mama, TNM.....	48
Quadro 10: Graduação da Fibrose na medula óssea.....	53
Primeiro Artigo	71
Gráfico 1: Frequência de marcadores CK19.....	77
Gráfico 2: Frequência de tamanho tumoral.....	77
Gráfico 3: Frequência dos tipos histológicos.....	77
Gráfico 4: Frequência dos graus histológicos.....	78
Gráfico 5: Frequência do comprometimento linfonodal.....	78
Gráfico 6: Frequência dos receptores de estrógeno.....	78
Gráfico 7: Frequência dos receptores de progesterona.....	79
Gráfico 8: Frequência da expressão do HER2/neu.....	79
Tabela 1: Associação micrometástase x tamanho tumoral.....	79
Tabela 2: Associação micrometástases x comprometimento de linfonodos.....	80
Tabela 3: Associação micrometástases x tipo histológico.....	80
Tabela 4: Associação micrometástases x grau histológico.....	80
Tabela 5: Associação micrometástases x receptores de estrógeno.....	80
Tabela 6: Associação micrometástases x receptores de progesterona.....	81
Tabela 7: Associação micrometástases x HER2/neu.....	81

Tabela 8: Expressão do p-valor Teste Fisher/Teste X ²	81
 Segundo Artigo	89
Gráfico 1: Frequência de micrometástases na medula CK 19 positiva.....	96
Gráfico 2: Frequência da expressão de p53.....	96
Gráfico 3: Frequência da expressão de ki 67.....	96
Gráfico 4: Frequência da expressão de CD34.....	97
Tabela 1: Comparação do p valor teste de Fisher x Teste do X ²	97
Gráfico 5: Micrometástases x marcador p53.....	97
Gráfico 6: Micrometástases x marcador ki67.....	98
Gráfico 7: Micrometástases x marcador CD34.....	98
 Terceiro Artigo	105
Tabela 1: Graduação da fibrose na medula óssea.....	110
Gráfico 1: Frequência de micrometástases na medula óssea por CK19.....	111
Gráfico 2: Frequência de fibrose medular.....	112
Gráfico 3: Frequência de fibrose medular.....	112

Lista de Abreviaturas e Siglas

BI-RADS	<i>Breast Imaging Reporting and Data System</i>
BRCA1	Gene humano com função de gene supressor tumoral, denominado de <i>Breast Cancer 1</i>
BRCA2	Gene humano com função de gene supressor tumoral, denominado de <i>Breast Cancer typ 2</i>
CD-34	Grupamento de diferenciação 34 – glicoproteína que atua como fator de adesão celular e se expressa em células endoteliais.
CKS	Citoqueratinas
DRS	Doença residual mínima
CTC	Células tumorais circulantes
DTC	Detecção de células tumorais circulantes
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
FISH	<i>Fluorescence in situ hybridization</i>
HE	Hematoxilina eosina
HER2/neu	Receptor epidérmico humano
ICC	Imunocitoquímica
IHQ	Imuno-histoquímica
MO	Medula Óssea
Ki-67	Antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA ou KI-67)
QSL	Quadrante superior lateral
QIL	Quadrante inferior lateral
QSM	Quadrante superior medial
QIM	Quadrante inferior medial
RH	Receptor hormonal
RE	Receptor de estrógeno
RP	Receptor de progesterona
P.A.S	Ácido periódico-Schiff (coloração utilizada em histologia)
P53	Gen supressor tumoral
SP	Sangue Periférico

TNM	Tumor, Linfonodos, Metástases
UQS	União dos quadrantes superiores
UQI	União dos quadrantes inferiores

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	13
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1 HISTOLOGIA DA MAMA.....	16
2.2 CÂNCER DE MAMA.....	18
2.3 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	18
2.4 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	19
2.5 HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER DE MAMA.....	20
2.6 HISTOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA.....	23
2.7 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE MAMA.....	30
2.8 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS COMPLEMENTARES.....	43
2.9 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA.....	45
2.10 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA.....	49
2.11 TÉCNICAS DE ESTUDO DA MEDULA ÓSSEA.....	55
2.12 MEDULA ÓSSEA COMO SEDE DE METÁSTASES	57
2.13 CÂNCER DE MAMA E MEDULA ÓSSEA.....	59
3. OBJETIVOS.....	62
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	63
4.2 LOCAL DO ESTUDO.....	64
4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	64
4.4 PERÍODO DE REALIZAÇÃO.....	64
4.5 DESENHO DO ESTUDO.....	64
4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO.....	65
4.7 MÉTODOS DE COLETA.....	65

4.8 MÉTODOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	68
5. RESULTADOS	70
5.1 PRIMEIRO ARTIGO.....	71
5.2 SEGUNDO ARTIGO.....	89
5.3 TERCEIRO ARTIGO.....	105
6. CONCLUSÃO	118
REFERÊNCIAS	131
ANEXOS.....	144
ANEXO I - Aprovação no Comitê de Ética.....	144
ANEXO II – Autorização do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes.....	145
ANEXO III – Modelo do Termo de Consentimento Livre e esclarecido.....	146
ANEXO IV – Normatização Adotada.....	148



INTRODUÇÃO

~~~~~

## 1. INTRODUÇÃO

Câncer é uma neoplasia maligna que corresponde a mais de 100 tipos de doenças, que cursam com a multiplicação desordenada de células, comprometendo inicialmente alguns tecidos e órgãos, podendo ter capacidade de disseminação por todo o corpo do indivíduo (INCA, 2013).

Câncer de mama é uma doença em que ocorre proliferação celular da mama, predominantemente feminina, e que compromete a autoimagem da mulher e consequentemente sua autoestima.

É a segunda neoplasia maligna mais frequente na população feminina mundial e corresponde a principal causa de morte por doença neoplásica em mulheres em nosso país (INCA, 2013).

De acordo com a *International Agency for Research on Cancer/WHO* (AJCC), em 2008 foram registrados 40.481 óbitos por câncer de mama nos Estados Unidos e 12.573, no Brasil, apresentando assim, uma alta taxa de morbimortalidade (AJCC, 2011).

Torna-se muito evidente, que se trata de uma doença com grande frequência mundial e com altos índices de mortalidade, devendo ser tratada como doença de grande importância para a saúde pública.

Cerca de 50% das pacientes tratadas cirurgicamente, e com aparente cura após a cirurgia, apresentam recidiva tumoral dentro de um período de cinco anos. Esta recidiva pode surgir sob a forma de metástase, sendo este, o principal elemento responsável pela mortalidade destas mulheres (BISCHOFF *et al*, 2003; WEIGELT *et al*, 2005; BRAUN *et al*, 2000).

É considerada uma doença sistêmica, heterogênea, com alta probabilidade de disseminação, estando à sobrevivência das pacientes diretamente relacionadas com o diagnóstico precoce e o mais “localizado” possível, sendo importante a busca de prováveis sítios comprometidos no início da investigação (LESTER, 2006).

Mesmo em momentos iniciais de crescimento, as células tumorais podem começar a migrar pelo tecido conjuntivo perineoplásico, fazendo modificações estruturais no estroma e com isso, atingir as correntes linfáticas e sanguíneas mais próximas (KUMAR, V; ABBAS, AK; FAUSTO, N 2006), gerando uma probabilidade de metástases, mesmo quando diagnosticado em estágio precoce (LALLE *et al*, 2000; GAFORIO *et al*, 2003).

As principais vias de metástases do câncer de mama é a via linfática e hematogênica, sendo atualmente a avaliação de linfonodos axilares, aceita como o melhor indicador de doença sistêmica. A via linfática é a mais intensamente estudada, embora aproximadamente 30% das pacientes que não têm comprometimento de linfonodos axilares, apresentam posteriormente recidiva tumoral ou mesmo metástases à distância (DIEL *et al*, 1996).

Alguns estudos têm demonstrado a presença de células tumorais em medula óssea de pacientes com câncer de mama, assim como ficou demonstrado que a evidência de células malignas neste tecido, está associada à diminuição de sobrevida (GUILIANO, 2011), o que consequentemente representa um fator que tem relevância clínica.

É necessário também ressaltar que não há correlação entre o “status” da medula óssea com o linfonodal, podendo a medula está comprometida enquanto os linfonodos estão negativos, favorecendo a hipótese que os mecanismos de disseminação linfática e hematogênica são diferentes e independentes (SUKAMAL, 2009), o que possivelmente justifica a detecção de células malignas à distância, mesmo em pacientes com linfonodos axilares negativos.

Assim, uma possibilidade de avaliação é a detecção de células tumorais na medula óssea, células essas que tiveram disseminação por via sanguínea, e que poderão corresponder a um indicador de comprometimento não só em linfonodos axilares, como também, de metástases à distância (ABREU E, KOIFMAN S, 2002).

A medula óssea é um órgão gelatinoso distribuído ao longo das cavidades ósseas de todo o organismo, tem função hematopoiética e renova continuamente as células sanguíneas senescentes. Este processo de renovação envolve o aprisionamento de células circulantes envelhecidas ou mesmo células de origem não hematopoiética, para que sofram o processo de apoptose e possam ser fagocitadas (WICKRAMASINGHE, 1997).

As células malignas são destituídas do mecanismo apoptótico, não permitem autodestruição e continuam retidas na medula, criando um meio necessário a sua sobrevivência e transformando este tecido em um sítio metastático (IOACHIM, 2000).

A maioria dos órgãos é sensível à detecção dos tumores secundários por métodos de imagens, como por exemplo, cintilografias, ressonância magnética e outros, onde são obtidos dados complementares macroscópicos para fazer o estadiamento tumoral. O mesmo não ocorre com a medula óssea, que necessita de métodos microscópicos para ser avaliada.

O exame da medula óssea possibilita a detecção de células neoplásicas disseminadas antes mesmo do aparecimento das metástases clínicas. Representa um tecido de acesso relativamente fácil, permite um procedimento com risco mínimo de complicações, e ainda poderá corresponder a um indicador de metástases.

A presença confirmada de células malignas na medula óssea no momento inicial do diagnóstico pode ter grande significado no seguimento das pacientes e antecipar medidas terapêuticas na tentativa de combater a verdadeira responsável pelos óbitos: a metástase do câncer de mama.

Assim sendo, este trabalho visa ressaltar a avaliação da medula óssea como mais um método complementar no estadiamento do câncer de mama.



# REVISÃO DA LITERATURA



## 2. REVISÃO DA LITERATURA

Neste estudo realizamos revisão de literatura de todo o contexto do câncer de mama com metástases em medula óssea.

### 2.1 HISTOLOGIA DA MAMA

A mama humana é uma glândula sudorípara modificada, com função de prover nutrientes a uma prole, garantindo assim a preservação da espécie (TAVASSOLLI, 1992).

Está representada histologicamente por aproximadamente vinte seguimentos ou lobos, onde cada lobo é drenado por um ducto coletor, os quais convergem para um ducto terminal maior, localizado no mamilo (Figura 1A). Cada lobo é circundado por tecido conjuntivo e subdividido em vários lóbulos (Figura 3A) (Figura 3B) (McCARTY, K; NATH, M; 1997).

O lóbulo constitui a unidade estrutural básica da mama e é delimitada por um tecido conjuntivo denso relativamente espesso. Ele se subdivide em dez a cem alvéolos, os quais se encontram circundados por uma membrana basal verdadeira que se estende até os ductos coletores (McCARTY, K; NATH, M; 1997).

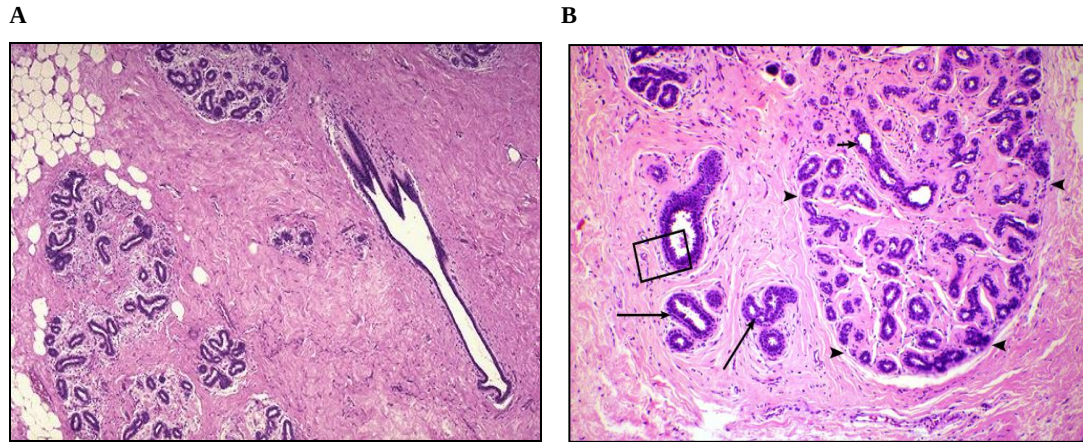
O sistema ductal constitui o sistema funcional da mama, que se apresenta permeado por estroma fibroadiposo (Figura 2B). Com exceção de um seguimento do ducto coletor do mamilo que é delineado por epitélio escamoso, todo o sistema ductal é revestido por uma camada dupla celular (Figura 1B): uma camada interna epitelial secretora (que irá efetivar a produção láctea) e uma camada externa que são células mioepiteliais responsáveis pela contração ductal e ejeção do leite (Figura 2A) (TAVASSOLI, 1992).

A atividade proliferativa da porção terminal é considerada uma característica fisiológica da glândula mamária, para que haja um desenvolvimento normal durante a gestação e lactação. As células dessa unidade, predominantemente as que revestem a luz do ducto, ou seja, as células epiteliais da camada interna, são as que mais frequentemente se dividem, se multiplicam, e se diferenciam para compor o seu propósito fisiológico. Consequentemente, são as células mais sensíveis a erros de divisão celular, podendo gerar as neoplasias (ROSEN, 1997).

Assim o processo neoplásico mamário tem origem mais frequentemente nas células luminais, da camada interna ductal, do que das células da camada externa, também chamadas células basais e que podem também gerar malignidades (ROSEN, 1997).

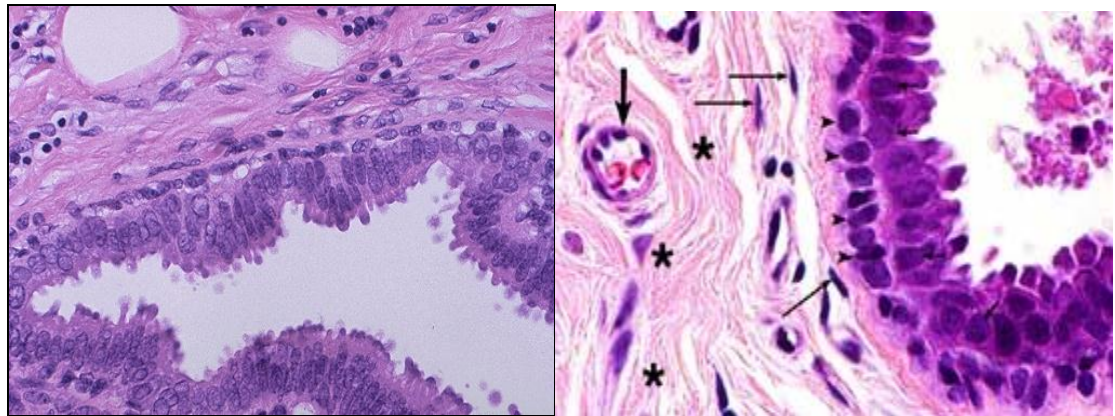


**Figura 1:** A- Histologia da mama normal exibindo lóbulos, ácinos e ducto terminal maior (aumento x 10);  
 B- Histologia da mama normal, exibindo camada dupla celular em ductos, setas identificando células mioepiteliais e ductais (aumento x 10).



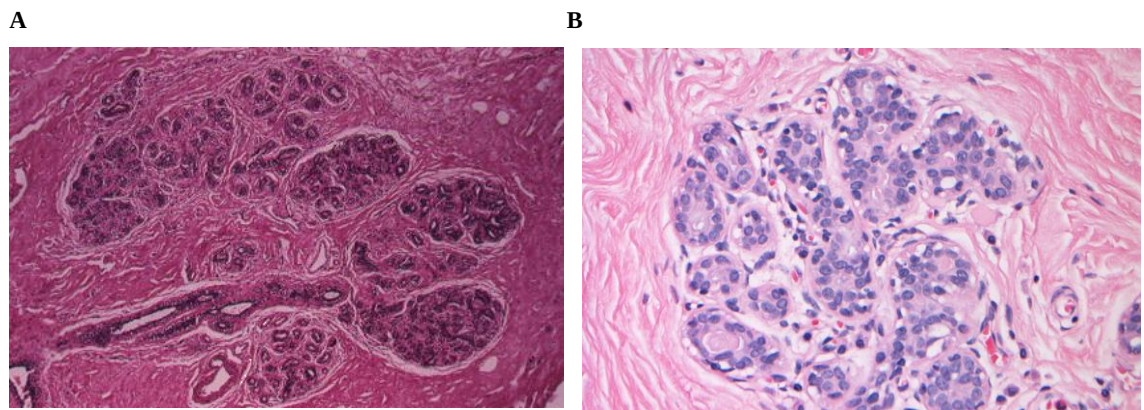
<http://mammary.nih.gov/reviews/tumorigenesis/Fischer001/slides/fglg-1.htm>

**Figura 2:** A- Histologia da mama normal, exibindo ductos revestidos por dupla camada (aumento x 20)  
 B- Ducto com camada dupla, seta fina indicando fibroblastos, seta larga, célula endotelial e \* indicando tecido fibroso (aumento x 20).



<http://mammary.nih.gov/reviews/tumorigenesis/Fischer001/slides/fglg-2.htm>

**Figura 3: A e B** -Histologia da estruturação dos lóbulos e ácinos (aumento x 20)



<http://www.breastdiseases.com/slides/ben1.htm>

<http://www.hsc.stonybrook.edu/breast-atlas/XXV-22.htm>

## 2.2. CÂNCER DE MAMA

Corresponde a um processo patológico inserido nos distúrbios do crescimento celular que afeta principalmente mulheres e apresentam altas taxas de mortalidade (OMS, 2013).

## 2.3 EPIDEMIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente em mulheres tanto em países desenvolvidos quanto em países em desenvolvimento. A sua incidência tem aumentado em todo o mundo, provavelmente pela maior expectativa de vida, assim como pelo aumento da urbanização e pela adoção dos modos de vida ocidental (OMS, 2013).

A frequência e a sua distribuição apresentam uma grande variabilidade geográfica, sendo as maiores taxas de incidência observadas na América do Norte, Europa Ocidental e países desenvolvidos e economicamente mais ricos, enquanto são dez vezes mais baixas as taxas na África, Ásia e países em desenvolvimento (PARKIN *et al*, 2005).

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer, o número de casos esperados no Brasil para 2012, ou seja, a estimativa da doença era de 52.680 novos casos, com risco estimado de 52 casos para cada 100.000 mulheres. Sendo mais incidente na Região Sudeste com um risco estimado de 69 casos novos por 100 mil. Na Região Sul corresponde a 65/100.000, em Região Centro-oeste 48/100.000, Nordeste 32/100.000 e Norte 19/100.000 (INCA, 2012).

Apesar de ser considerado um câncer de relativamente bom prognóstico, se diagnosticado e tratado oportunamente, as taxas de mortalidade continuam elevadas no Brasil, muito provavelmente porque a doença ainda é diagnosticada em estádios avançados (INCA, 2013). Isso demonstra uma falha no programa de rastreamento que inclui a realização de exame clínico das mamas, mamografia anual e a identificação de grupos populacionais com risco elevado para o desenvolvimento da doença (GONÇALVES *et al*, 2007).

A incidência e a taxa bruta de mortalidade têm apresentado um aumento significativo nas últimas décadas, passando de 5,7 para 10,1 mortes por 100.000 mulheres, representando um crescimento de 76% entre os anos de 1979 e 2004. No Brasil, a estimativa de mortalidade correspondeu a 12.852 óbitos para 2010 (INCA, 2013).

A sobrevida média da população mundial após cinco anos de doença é de 61%, sendo maior nos países desenvolvidos (73%), e menor nos países em desenvolvimento (57%) (INCA, 2013).

Considerando que nos Estados Unidos a doença é geralmente diagnosticada em fase inicial, ainda foram registrados em 2008, 40.481 óbitos por câncer de mama o que comprova a grande problemática envolvida nesta patologia e que câncer de mama é um problema de saúde pública mundial (AJCC, 2008).

## 2.4 ETIOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é provavelmente o resultado da interação de fatores genéticos, estilo de vida, hábitos reprodutivos e do meio ambiente (JOHNSON-THOMPSON E GUTHRIE, 2000).

Os principais fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são os fatores hormonais e genéticos. Os fatores hormonais estão relacionados à exposição predominantemente estrogênica, enquanto que os fatores genéticos correspondem às mutações transmitidas de uma geração para outra (LESTER, 2006).

Assim, os carcinomas da mama podem ser classificados quanto à origem da mutação celular em carcinomas hereditários e quanto à exposição hormonal e ambiental, em carcinomas esporádicos (BILIMORIA E MORROW, 1995).

Os esporádicos correspondem à maioria das neoplasias malignas da mama, perfazendo um total de 90% a 95% dos cânceres de mama, os quais estão relacionados à exposição ao estrógeno. A maior parte destes tumores ocorre em mulheres em pós-menopausa e apresentam super-expressão dos receptores de estrógenos (BILIMORIA E MORROW, 1995).

O estrógeno apresenta papel principal no desenvolvimento do câncer de mama: os seus metabólitos podem causar mutações ou gerar radicais livres que danificam o DNA, ou mesmo as suas ações hormonais direcionam a proliferação das lesões pré-malignas e do câncer. Porém, outros mecanismos desempenham papel importante embora ainda não estejam totalmente elucidados. Sabemos que existe um grupo significativo de carcinomas mamários que é receptor de estrógeno negativo ou ocorrem em mulheres que não apresentaram aumentada exposição estrogênica (MILLER, 2003).

Os carcinomas mamários hereditários são também chamados de carcinomas familiares e podem ser atribuídos a dois genes autossômicos dominantes altamente penetrantes: BRCA 1 e BRCA 2. O BRCA 1 mutante também aumenta o risco de desenvolvimento de câncer de ovário, e o BRCA 2 confere maior frequência ao câncer de mama masculino (VENKITARAMAN, 2002).

O BRCA 1 e BRCA 2 atuam como supressores tumorais, e é a perda de sua função que confere o risco de malignidade. Ambos apresentam função de proteção ao genoma do dano pela interrupção do ciclo celular e a promoção da reparação do DNA danificado, num processo complexo ainda não totalmente elucidado (VENKITARAMAN, 2002).

## 2.5 HISTÓRIA NATURAL DO CÂNCER DE MAMA

A mama normal apresenta um conjunto complexo de interações entre as células luminais, mioepiteliais, membrana basal e células estromais. Este complexo é dinâmico e exibem modificações fisiológicas próprias da mama, como por exemplo, a formação normal de novos pontos da ramificação ductal e lobular durante a puberdade, gravidez e algumas fases do ciclo menstrual (ROSAI, 1996).

A anulação da membrana basal, proliferação aumentada, perda da inibição do crescimento, angiogênese e invasão do estroma, podem ocorrer durante a carcinogênese, por células epiteliais anormais, células estromais ou ambas (ROSAI, 1996).

A progressão da neoplasia, assim como a possibilidade de evolução para metástases corresponde à história natural do câncer de mama. Inicialmente ocorre uma proliferação celular gerando lesões hiperplásicas que evoluem para carcinomas in situ e destes, para infiltrativos (ROSAI, 1996).

Alguns carcinomas invasores evoluíram de lesões benignas pré-existentes, passando a ser consideradas como lesões precursoras “pré-malignas”, posteriormente avançaram para carcinomas in situ, microinvasor e francamente invasivo. Outros tiveram início, diretamente em carcinoma in situ ou invasores, com potencial ou não para metastatização (VAN DE VIJVER *et al*, 2002).

As alterações biológicas que ocorrem em células malignas bem sucedidas estão didaticamente divididas em: alterações ductais iniciais não proliferativas que evoluem para uma lesão proliferativa, seguindo-se um processo de hiperplasia atípica, posteriormente para

carcinoma in situ e carcinoma invasor. Estas alterações não necessitam ocorrer nesta ordem especificamente, porém elas se acumulam até que as células adquiram potencial maligno (TLIST, 2001).

A associação das alterações a lesões mamárias pré-malignas sugere que os eventos mais iniciais estejam relacionados à evasão de sinais inibidores do crescimento e da apoptose e auto suficiência dos sinais de crescimento (TLIST, 2001).

O potencial replicativo ilimitado é sugerido pela habilidade das populações clonais das células do carcinoma in situ em ocluir completamente o sistema ductal da mama. A angiogênese aumentada é evidente em torno da membrana basal de ductos comprometidos por carcinoma in situ e isso pode ser explicado por estimulação direta das células malignas, aos efeitos estimuladores secundários nas células estromais ou à perda da inibição da angiogênese por células estromais (TLIST, 2001).

Os aspectos morfológicos e biológicos dos carcinomas são geralmente estabelecidos nos estágios in situ, ou seja, os carcinomas não sofrem processo de desdiferenciação ou não se tornam mais pobremente diferenciados com o tempo (TLIST, 2001).

O estágio final da carcinogênese mamária, ou seja, a transição do carcinoma limitado pela membrana basal ao carcinoma invasor é o menos compreendido. É possível que essa transição ocorra inicialmente pela perda da membrana basal e ou perda da integridade tecidual, causadas pelas funções das células mioepiteliais e estromais, especialmente pela capacidade das células malignas de invadir o estroma (TLIST, 2001).

A capacidade de invasão dos tecidos adjacentes é essencial na agressividade desses tumores. Invadir é consequência da mobilidade das células malignas no espaço intersticial, alcançando vasos sanguíneos e linfáticos, o que viabiliza o deslocamento das células neoplásicas para outros sítios (FRANCO *et al*, 2010).

O crescimento tumoral é influenciado por muitos fatores, dentre eles as características morfogenéticas da neoplasia que envolve o tipo histológico, o grau de diferenciação tumoral e a neovascularização sanguínea (FRANCO *et al*, 2010).

Os carcinomas mamários têm estruturas complexas, pois além das células epiteliais alteradas, há no estroma grande variedade de células sensíveis aos estímulos mitogênicos presentes no ambiente tumoral. Existem evidências de que há uma complexa regulação para a transformação epitélio/mesenquimal, que modula o fenótipo das células malignas permitindo

que se movam entre o estroma e escapem pelos canais vasculares podendo originar metástases linfáticas e ou hematogênicas (FRANCO *et al*, 2010).

O processo metastático compreende várias etapas: inicialmente ocorre a quebra ou lise da membrana basal periductal, embolização intravascular das células malignas, sobrevivência às células de defesa tanto teciduais como sanguíneas, manutenção de sua integridade diante da turbulência do fluxo sanguíneo, extravasamento capilar com possíveis destruições das membranas basais vasculares, retenção em determinado órgão e sobrevivência às defesas desse novo órgão, infiltração e reprodução em sítio secundário (FRANCO *et al*, 2010).

As células malignas da mama, começam a migrar para a circulação sanguínea em estágios ainda precoces (GAFORIO *et al*, 2003), entretanto a sua habilidade para estabelecer metástase e futura recidiva ainda não está bem esclarecida (RACILA *et al*, 1998).

Tem sido reportado à presença de células tumorais em sangue periférico e em medulas ósseas de pacientes com câncer de mama operável e ainda em estágio bem precoce. A presença dessas células na corrente sanguínea demonstra neoplasia em progressão, porém ainda terão muitos obstáculos antes de apresentar a metástases efetiva (FRANCO *et al*, 2010).

Algumas observações indicam que células neoplásicas circulantes podem dirigir-se para a medula óssea e outros órgãos que possibilitem sobrevivência, sendo a medula, um órgão rico em nutrientes, formador de células e que promove diferenciação celular, além de apresentar células totipotentes, fazendo deste órgão um tecido fértil e definitivo para o processo metastático. Talvez, corresponda ao primeiro tecido a ser infiltrado e colonizado por células malignas à distância, visto que a partir de então, as células deixam de ser circulantes e passam a se fixar em estrutura tecidual (FRANCO *et al*, 2010).

Admite-se que células migradas precocemente do tumor, sem ainda terem sofrido todos os eventos da transformação maligna, permaneçam nestes nichos teciduais (medula óssea), onde continuam a sofrer alterações genéticas e epigenéticas necessárias para adquirir o fenótipo e capacidade de colonizar diferentes órgãos, e neles formarem metástases (FRANCO *et al*, 2010).

Em modelos experimentais verificaram-se que o tumor primitivo induz em órgãos à distância alterações que os preparam para receber a metástase antes mesmo da chegada das células tumorais. Alguns trabalhos mostraram a importância de células progenitoras hematopoéticas derivadas da medula óssea iniciando mudanças teciduais precoces,

preparando o tecido conhecido como nicho pré-metastático, assim estas células migram para o tecido distante e iniciam o processo de preparação (KAPLAN, 2006).

É de vital importância o conhecimento da relação entre os componentes: células metastáticas, medula óssea (estroma, osso), células hematopoéticas derivadas da medula óssea que migram ao nicho pré-metastático e células do tecido secundário desenvolvendo papéis na carcinogênese e metástases. O entendimento desse dinamismo pode explicar o tropismo “tecido-específico” que as células metastáticas apresentam com seu sítio secundário (KAPLAN, 2006).

Uma vez disseminadas e implantadas formam metástases à distância em vários órgãos sendo o sistema esquelético (ossos) o local de maior frequência de acometimento com aproximadamente 65% dos casos, seguidos dos pulmões e pleura, fígado, ovário, suprarrenal e sistema nervoso central, incluindo leptomeninges e olhos (CIFUENTES, 2001).

A disseminação do carcinoma invasor para sítios distantes é responsável pela recorrência tumoral e morte das pacientes com esta patologia (WEIGELT *et al*, 2005).

## 2.6 HISTOPATOLOGIA DO CÂNCER DE MAMA

O câncer de mama é uma doença heterogênea que cursa com proliferação anormal e descontrolada das células predominantemente originadas da unidade ducto lobular terminal, as quais se proliferam inicialmente obstruindo o ducto, e posteriormente ultrapassam a membrana basal e infiltram o estroma mamário, podendo atingir a corrente linfática e sanguínea precocemente (TAVASSOLI, 2003).

De acordo com suas características de crescimento e padrões morfológicos, foram feitas classificações histopatológicas, na tentativa de categorizar e agrupar as diversas entidades clínicas que representam o câncer de mama (TAVASSOLI, 2003).

A neoplasia que se origina da unidade ducto lobular terminal e que mantém arquitetura sólida, ocluindo todo o ducto, e ainda apresenta uma população celular constituída por células pequenas e uniformes, é chamada de carcinoma lobular in situ (Figura 10, 11). Nestes casos, a membrana basal que reveste os ácinos encontra-se intacta. Em casos de progressão deste mesmo padrão neoplásico, em que haverá rompimento da membrana basal, esta neoplasia é chamada de carcinoma lobular invasor (Figura 12, 13) (TAVASSOLI, 2003).

De outro modo, as neoplasias que se originam da unidade ducto lobular terminal, mas que de uma maneira geral, apresentam células relativamente maiores e não formam camadas oclusivas dos ductos, ou mesmo, formam pontes epiteliais e ou lúmens ductulares secundários, são chamadas de carcinoma ductal in situ (Figura 4,5), caso mantenham a integridade da membrana basal; do contrário, será chamada de carcinoma ductal invasor (Figura 6,7,8 e 9) (TAVASSOLI, 2003).

A membrana basal, portanto, constitui o elo limítrofe da invasão tumoral. Porém ao utilizar colorações especiais, como a reticulina e ou P.A.S. para visualização ou mesmo um exame mais detalhado da membrana basal, é possível observar soluções de continuidade da mesma, o que pode gerar erro de interpretação e gerar um diagnóstico de tumor iminentemente invasor, o que requer cuidados especiais neste tipo de avaliação (McCARTY, *et al*, 1997).

É importante ressaltar que a estrutura histológica mamária é dinâmica e variável de acordo com o ciclo menstrual e ou outras situações fisiológicas, promovendo muitas vezes proliferações ductais, em que eventualmente a membrana basal acompanha parcialmente a proliferação, promovendo “*gaps*” ou falhas em seu revestimento ductal, o que pode explicar a saída de células neoplásicas precocemente para o estroma mamário (McCARTY *et al*, 1997).

As proliferações ductais infiltrativas na verdade, são variedades de adenocarcinomas, que podem apresentar características de crescimento diverso assim como, vários tipos morfológicos e arquiteturais.

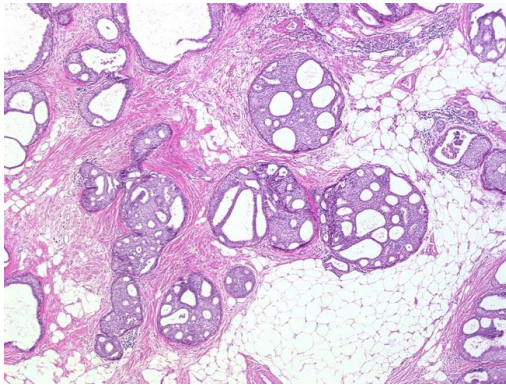
A variedade morfológica, representada por vários padrões microscópicos, tem sido estudada e classificada, com o objetivo de padronizar as descrições destas neoplasias, e correlacionar com prognóstico das pacientes (TAVASSOLI, 2003).

As neoplasias mamárias apresentam um amplo espectro de padrões que foram classificadas, atualizadas e reafirmadas em 2011, na cidade de Lyon- França (LAKHANI *et al*, 2012).

A classificação do câncer de mama quanto as suas características histopatológicas (LAKHANI *et al*, 2012) , distingue de forma clara a divisão mais utilizada em carcinomas ductais e lobulares que correspondem a mais de 75% dos carcinomas infiltrantes diagnosticados nos Estados Unidos. Existem muitas variantes dos carcinomas ductais, sendo considerados como subtipos especiais (Figura 14,15), assim como também existem variantes dos lobulares e outros tipos (LAKHANI *et al*, 2012).

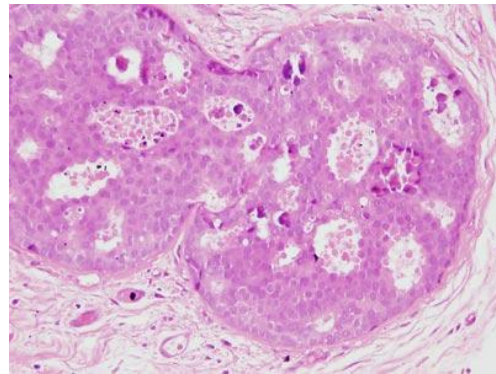


**Figura 4:** Carcinoma Ductal *in situ* (aumento x 4)



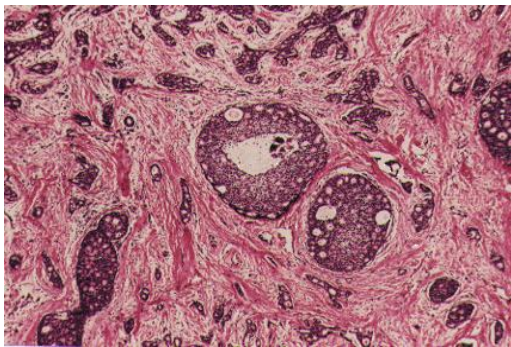
<http://webpathology.com/image.asp?case=289&n=4>

**Figura 5:** Carcinoma Ductal *in situ* (aumento x 10)



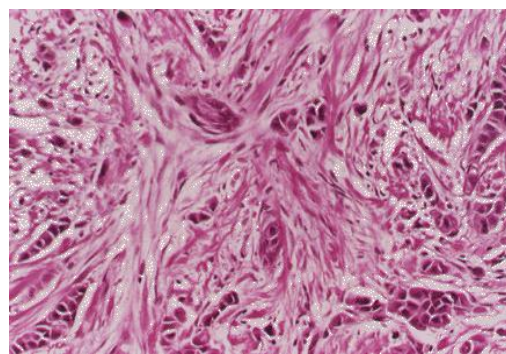
<http://www.breastpathology.info/Sloane/Images/dcis/crib1-400.jpg>

**Figura 6:** Carcinoma ductal infiltrante SOE



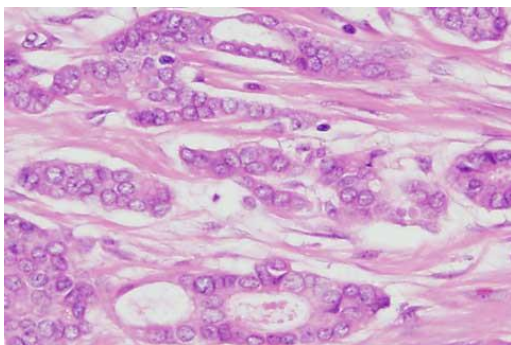
<http://www.breastdiseases.com/slides/invsl17.htm>

**Figura 7:** Carcinoma ductal infiltrante SOE

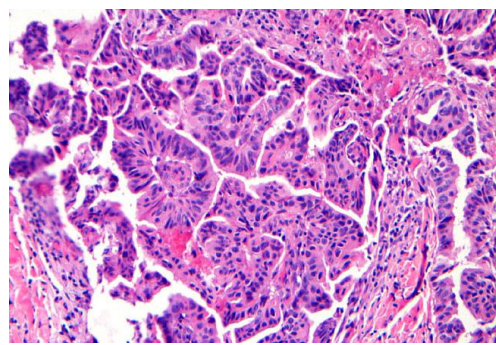


<http://www.breastdiseases.com/slides/invsl13.htm>

**Figura 8:** Carcinoma ductal infiltrante (aumento x 40)



**Figura 9:** Carcinoma ductal infiltrante (aumento x 10)

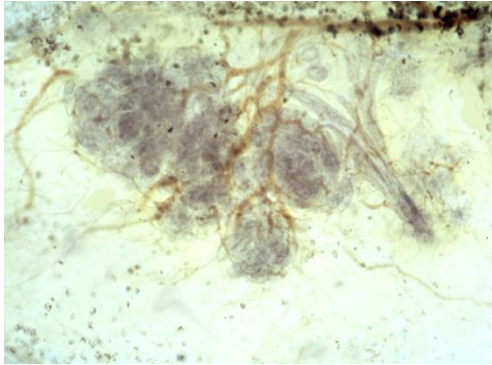


8: <http://www.breastpathology.info/Images/Common%20cancers/Inv%20NST/Gr-1CROP.jpg>

9: <http://www.hsc.stonybrook.edu/breast-atlas/XXV-18.htm>

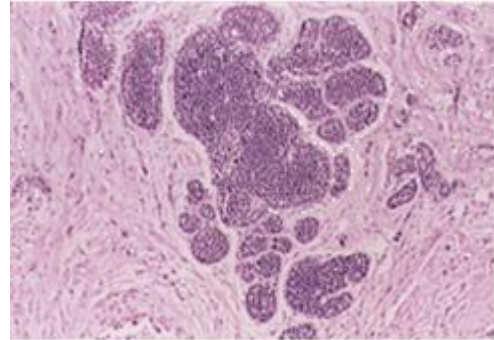


**Figura 10:** Imagem submacroscópica de carcinoma lobular *in situ*



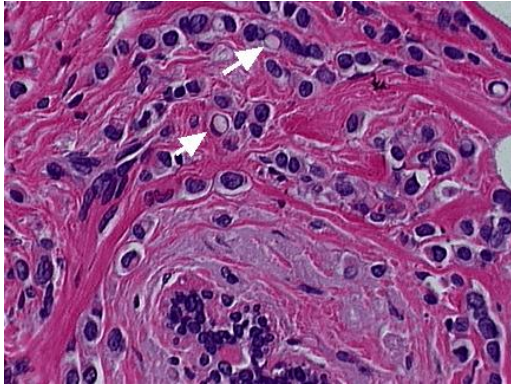
<http://mammary.nih.gov/atlas/histology/Wellings001/SRW2/40SRhm.jpg>

**Figura 11:** Carcinoma Lobular *in situ* (aumento x10)



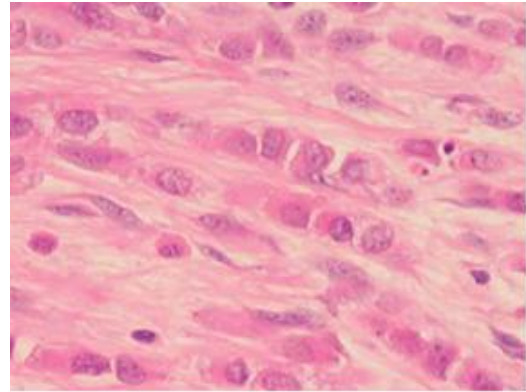
<http://www.breastdiseases.com/slides/invsl33.htm>

**Figura 12:** Carcinoma lobular infiltrante (aumento x40)  
Setas evidenciando inclusão citoplasmática.



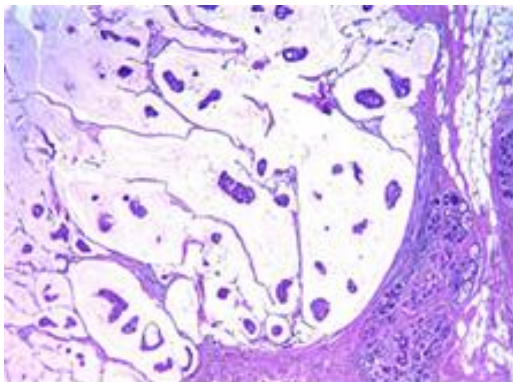
<http://radiology.uchc.edu/eAtlas/Breast/1682.htm>  
[CROP.JPG](#)

**Figura 13:** Carcinoma lobular infiltrante (aumento x 40)



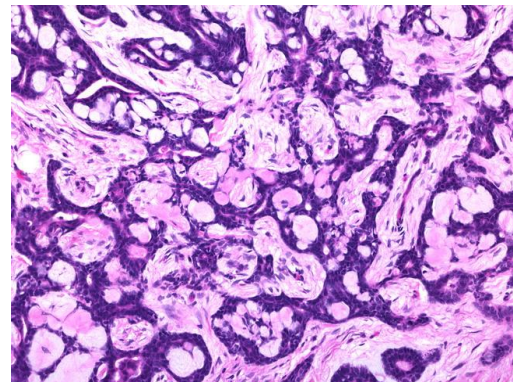
[http://breastpathology.info/Images/Common%20cancers/Classical%20ilc/ILC-](http://breastpathology.info/Images/Common%20cancers/Classical%20ilc/ILC-CROP.JPG)  
[CROP.JPG](#)

**Figura 14:** Carcinoma de tipos especiais – mucinoso.



<http://www.pathologyoutlines.com/caseofweek/case200511image1.jpg>

**Figura 15:** Carcinoma tipo especial: adenoide-cístico



<http://webpathology.com/image.asp?n=2&Case=324>

Os vários tipos histológicos dos tumores da mama estão bem estabelecidos, sendo a sua classificação descrita no quadro abaixo:

**Quadro 1** – Classificação dos Tumores Epiteliais da Mama

| <b>Classificação dos Tumores Epiteliais da Mama (OMS, 2012)</b>                                                  |
|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TUMORES EPITELIAIS</b>                                                                                        |
| Carcinoma microinvasivo                                                                                          |
| <b>CARCINOMAS INVASIVOS</b>                                                                                      |
| <b>Carcinoma invasivo de tipo não especial (TNE)/ Carcinoma ductal invasivo sem outras especificações (SOE).</b> |
| <b>Variantes Morfológicas dos Carcinomas invasivos de tipo não especial:</b>                                     |
| *Carcinoma Pleomórfico                                                                                           |
| *Carcinoma com células gigantes estromais tipo osteoclásticas                                                    |
| *Carcinoma com características coriocarcinomatosas                                                               |
| *Carcinoma com características melanocíticas                                                                     |
| <b>Carcinoma invasivos mistos (de tipo não especial + tipo especial)</b>                                         |
| <b>Carcinoma lobular invasivo tipo clássico</b>                                                                  |
| <b>Variantes Morfológicas dos Carcinomas lobulares invasivos:</b>                                                |
| *Carcinoma lobular sólido                                                                                        |
| *Carcinoma lobular alveolar                                                                                      |
| *Carcinoma lobular pleomórfico                                                                                   |
| *Carcinoma túbulo-lobular                                                                                        |
| <b>Carcinoma lobular misto (clássico + variante)</b>                                                             |
| <b>Carcinoma Tubular</b>                                                                                         |
| <b>Carcinoma Cribriforme</b>                                                                                     |
| <b>Carcinoma Mucinoso</b>                                                                                        |
| <b>Carcinoma com características medulares</b>                                                                   |
| *Carcinomas medular                                                                                              |
| *Carcinoma medular atípico                                                                                       |
| *Carcinoma invasivo de tipo não especial com características medulares                                           |
| <b>Carcinoma com diferenciação apócrina</b>                                                                      |
| <b>Carcinoma com diferenciação para células em anel de sinete</b>                                                |
| <b>Carcinoma micropapilar invasivo</b>                                                                           |
| <b>Carcinoma metaplásico de tipo não especial</b>                                                                |
| *Carcinoma adenoescamoso de baixo grau                                                                           |
| *Carcinoma metaplásico fibromatose-símile                                                                        |
| *Carcinoma escamocelular                                                                                         |
| *Carcinoma de células fusiformes                                                                                 |
| *Carcinoma metaplásico com diferenciação mesenquimale: condróide, diferenciação óssea e outros.                  |
| *Carcinoma metaplásico misto                                                                                     |
| *Carcinoma mioepitelial                                                                                          |

**Quadro 2** – Classificação dos carcinomas invasivos da mama.

| <b>Classificação dos Tumores Epiteliais da Mama (OMS, 2012)</b>                                                   |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>CARCINOMAS INVASIVOS</b>                                                                                       |
| <b>Tipos raros</b>                                                                                                |
| <b>Carcinomas com características neuroendócrinas</b>                                                             |
| *Tumor neuroendócrino bem diferenciado                                                                            |
| *Carcinoma neuroendócrino mal diferenciado ou carcinoma de pequenas células                                       |
| *Carcinoma com diferenciação neuroendócrina                                                                       |
| <b>Carcinoma secretor</b>                                                                                         |
| <b>Carcinoma papilar invasor</b>                                                                                  |
| <b>Carcinoma de células acinares</b>                                                                              |
| <b>Carcinoma mucoepidermóide</b>                                                                                  |
| <b>Carcinoma polimorfo</b>                                                                                        |
| <b>Carcinoma oncocítico</b>                                                                                       |
| <b>Carcinoma rico em lipídios</b>                                                                                 |
| <b>Carcinoma de células claras rico em glicogênio</b>                                                             |
| <b>Carcinoma sebáceo</b>                                                                                          |
| <b>Tumores do tipo de glândula salivar/glândulas anexas da pele (cilindroma e hidradenoma de células claras).</b> |

Organização Mundial de Saúde – 2012

**Quadro 3** – Classificação dos tumores da mama.

| <b>Classificação dos Tumores Epiteliais da Mama (OMS, 2012)</b>                          |
|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>TUMORES EPITELIAIS-MIOEPITELIAIS</b>                                                  |
| <b>Adenoma Pleomórfico</b>                                                               |
| <b>Adenomioepitelioma e adenomioepitelioma com carcinoma</b>                             |
| <b>Carcinoma adenóide-cístico</b>                                                        |
| <b>LESÕES PRECURSORAS</b>                                                                |
| <b>Carcinoma ductal in situ (CDIS)</b>                                                   |
| <b>Neoplasia lobular in situ</b>                                                         |
| *Carcinoma lobular in situ clássico                                                      |
| *Carcinoma lobular in situ pleomórfico                                                   |
| *Hiperplasia lobular atípica                                                             |
| <b>Lesões proliferativas intraductais</b>                                                |
| *Hiperplasia ductal usual (H DU)                                                         |
| *Lesões de células colunares incluindo atipia epitelial plana                            |
| *Hiperplasia ductal atípica (HDA)                                                        |
| <b>LESÕES PAPILARES</b>                                                                  |
| <b>Papiloma intraductal</b>                                                              |
| *Papiloma intraductal com hiperplasia atípica                                            |
| *Papiloma intraductal com carcinoma ductal in situ                                       |
| *Papiloma intraductal com carcinoma lobular in situ                                      |
| <b>Carcinoma papilar intraductal</b>                                                     |
| <b>Carcinoma papilar encapsulado</b>                                                     |
| *Carcinoma papilar encapsulado com invasão/carcinoma papilar sólido (in situ e invasivo) |
| <b>PROLIFERAÇÕES EPITELIAIS BENIGNAS</b>                                                 |
| <b>Adenose esclerosante</b>                                                              |
| <b>Adenose apócrina</b>                                                                  |
| <b>Adenose microglandular</b>                                                            |
| <b>Cicatriz radial/lesão esclerosante complexa</b>                                       |
| <b>Adenomas (tubular, lactante, apócrino, ductal)</b>                                    |

Organização Mundial de Saúde – 2012

**Quadro 4** – Classificação dos tumores da mama.

| <b>Classificação dos Tumores da Mama (OMS, 2012)</b>                                     |
|------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>Tumores da Mama (OMS, 2012)</b>                                                       |
| <b>TUMORES MESENQUIMAIS</b>                                                              |
| Fasciite nodular                                                                         |
| Miofibroblastoma                                                                         |
| Fibromatose de tipo desmóide                                                             |
| Tumor miofibroblástico inflamatório                                                      |
| Lesões vasculares benignas (hemangioma, angiomatose; lesões vasculares atípicas).        |
| Hiperplasia estromal pseudoangiomatosa                                                   |
| Tumor de células granulares                                                              |
| Tumor benigno da bainha neural periférica (Neurofibroma e Schwannoma)                    |
| Lipoma/angioliipoma                                                                      |
| Lipossarcoma                                                                             |
| Angiossarcoma                                                                            |
| Rabdomiossarcoma                                                                         |
| Leiomioma                                                                                |
| Leiomiiossarcoma                                                                         |
| <b>TUMORES FIBROEPITELIAIS</b>                                                           |
| Fibroadenoma                                                                             |
| Tumor phyllodes (benigno, borderline, maligno; tumor estromal peri-ductal de baixo grau) |
| Hamartoma                                                                                |
| <b>TUMORES DO MAMILO</b>                                                                 |
| Adenoma do mamilo                                                                        |
| Tumor seringomatoso                                                                      |
| Doença de Paget do mamilo                                                                |
| <b>LINFOMA MALIGNO</b>                                                                   |
| Linfoma de grandes células B difuso                                                      |
| Linfoma de Burkitt                                                                       |
| Linfoma de células T                                                                     |
| *Linfoma de grandes células anaplásico, ALK negativo                                     |
| Linfoma de células B extra-nodal da zona marginal de tipo MALT                           |
| Linfoma folicular                                                                        |
| <b>TUMORES METASTÁTICOS</b>                                                              |
| <b>TUMOR DA MAMA MASCULINA</b>                                                           |
| Ginecomastia                                                                             |
| Carcinoma (invasivo/in situ)                                                             |
| <b>PADRÕES CLÍNICOS</b>                                                                  |
| Carcinoma inflamatório                                                                   |
| Carcinoma de mama bilateral                                                              |

Organização Mundial de Saúde – 2012

Os carcinomas ductais que não apresentam um padrão arquitetural especial (SOE) correspondem à maioria dos tumores mamários invasivos.

## 2.7 FATORES PROGNÓSTICOS DO CÂNCER DE MAMA

A maior taxa de sobrevida das pacientes está voltada para aquelas que tiveram o diagnóstico em fase inicial da doença e foram efetivamente tratadas. Fatores prognósticos são parâmetros utilizados para mensurar no momento do diagnóstico as possibilidades de sobrevida ou o tempo livre de doença (ABREU E, KOIFMAN S, 2002).

A história natural do câncer de mama indica que o curso clínico da doença varia de paciente para paciente. Esta variação é determinada por uma série complexa de fatores, tais como: a diferença na velocidade de duplicação tumoral, o potencial de metastatização do tumor e outros mecanismos ainda não completamente compreendidos, relacionados com a condição imunológica, hormonal e nutricional da paciente (ABREU E, KOIFMAN S, 2002).

Fatores prognósticos são os mais fortes preditores de morte por câncer de mama. O prognóstico desta doença pode ser mensurado por uma grande variedade de fatores clínicos e patológicos (CLARK, 1989).

Uma variedade de características tem sido avaliada como indicadores prognósticos do câncer de mama e existem muitos estudos propostos na literatura. Alguns fatores são padronizados por diversas sociedades, como os padronizados pelo Colégio Americano de Patologistas:

**Quadro 5** – Fatores Prognósticos em câncer de mama (Fitzgibbons *et al*, 2000).

| Fatores prognósticos em câncer de mama. (Fitzgibbons et al. 2000)                      |
|----------------------------------------------------------------------------------------|
| Fatores Prognósticos em câncer de mama – Consenso do Colégio Americano de Patologistas |
| <b>Categoria 1</b>                                                                     |
| Estadiamento TNM                                                                       |
| Tipo Histológico                                                                       |
| Grau Histológico                                                                       |
| Contagem de Mitose                                                                     |
| Estado de Receptores Hormonais                                                         |
| <b>Categoria 2</b>                                                                     |
| HER-2                                                                                  |
| MIB-1                                                                                  |
| Invasão vascular/linfática                                                             |
| p53                                                                                    |
| DNA fração S                                                                           |
| <b>Categoria 3</b>                                                                     |
| Ploidia de DNA                                                                         |
| Angiogenese tumoral                                                                    |
| Receptor para fator de crescimento epidérmico                                          |
| Fator de crescimento transformador $\alpha$                                            |
| BCL-2                                                                                  |
| pS2                                                                                    |
| Catepsina D                                                                            |

Porém, os fatores padronizados e incorporados ao sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC), são os mais utilizados na prática clínica atualmente (AJCC, 2010).

Os principais fatores prognósticos definidos pela AJCC estão subdivididos em fatores prognósticos maiores e menores (LESTER, 2006):

**Quadro 6** – Fatores Prognósticos de câncer de mama definidos pela AJCC:

| <b>Fatores Prognósticos Maiores</b>         | <b>Fatores Prognósticos Menores</b>       |
|---------------------------------------------|-------------------------------------------|
| * Carcinoma Ductal Invasor x Doença in situ | * Subtipos histológicos                   |
| * Metástase à distância                     | * Grau do Tumor                           |
| * Metástases em linfonodos                  | * Receptores de estrogênio e progesterona |
| * Tamanho do Tumor                          | * HER2/neu                                |
| * Doença localmente avançada                | * Invasão linfovascular                   |
| * Carcinoma Inflamatório                    | * Frequência proliferativa                |
|                                             | * Conteúdo de DNA                         |

#### ➤ **Fatores Prognósticos Maiores:**

- Carcinoma Invasivo x Doença In situ:

Por definição, a doença in situ está limitada à membrana basal e consequentemente ao sistema ductal, não havendo infiltração do estroma, estando impossibilitado às metástases (TAVASSOLI, 2003).

As pacientes que foram a óbito com esse diagnóstico de carcinoma in situ, deve-se ao desenvolvimento subsequente de lesão invasora, ou mesmo a áreas de invasão não detectadas no momento do diagnóstico (LESTER, 2006).

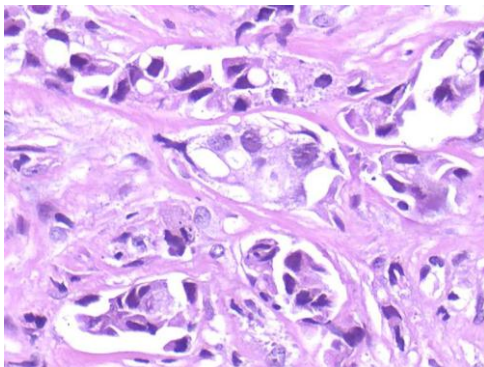
Nos carcinomas invasores, aproximadamente metade deles, terão metástases locais ou à distância no momento do diagnóstico (TAUBERT, 2004).



- Metástases à distância:

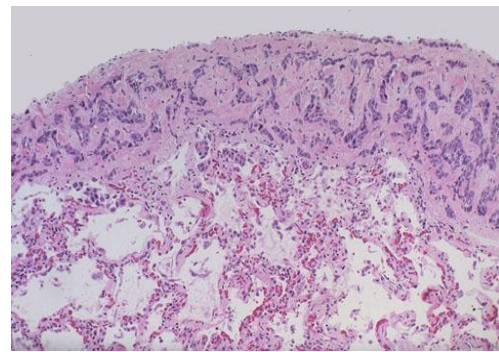
A cura e a remissão da doença tornam-se improváveis quando metástases estão presentes. As células metastáticas podem ser direcionadas a locais específicos pela expressão dos receptores das quimiocinas nas células cancerígenas, e as respectivas quimiocinas nos órgãos-alvos como as metástases ósseas (Figura 16) e metástases pulmonares (Figura 17) (MULLER, 2003).

**Figura 16:** Metástase Óssea (aumento x40)



Fonte: Juliana Arôxa (autora da dissertação)

**Figura 17:** Metástase pulmonar/pleural (aumento x10)



<http://library.med.utah.edu/WebPath/LUNGHTML/LUNG168.html>

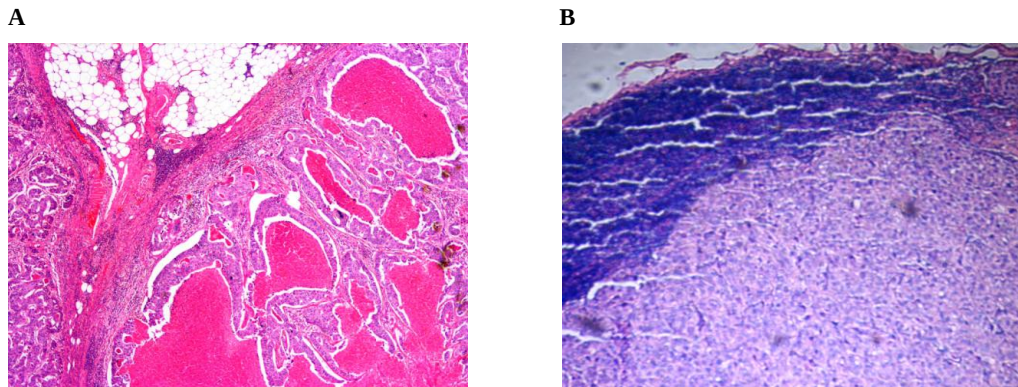
- Metástases em linfonodos:

O “*Status*” linfonodal representa o fator prognóstico mais importante e mais estudado do carcinoma invasor na ausência de metástase à distância (ROSAI, 1996). A sua avaliação clínica é muito imprecisa, sendo necessária a avaliação histológica do produto de dissecação axilar, a qual representa procedimento cirúrgico associado a frequentes complicações (DIEL *et al*, 1996).

Quando os linfonodos encontram-se livres de neoplasia, o índice de sobrevida livre de doença por 10 anos está próximo de 70% a 80%; de 35% a 40% com um a três linfonodos comprometidos e de 10% a 15% na presença de mais que 10 linfonodos positivos (Figura 18 A, B) (LESTER, 2006).



**Figura 18:** A - Metástase em Linfonodo (aumento x10)  
 B – Estrutura linfonodal comprometida (aumento x 10)



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2014768/figure/F2/> Fonte: Juliana Arôxa.

- Tamanho do Tumor:

O tamanho tumoral corresponde ao segundo fator prognóstico mais importante e é independente da condição do linfonodo. Todavia, o risco de metástases em linfonodos axilares, aumenta proporcionalmente ao tamanho do carcinoma (TAVASSOLI, 1992).

O índice de sobrevida de mulheres com tumor menor que 1 cm em 10 anos é de aproximadamente de 90%. De outro modo, mais da metade das mulheres com câncer maiores que 2 cm terão maior probabilidade de comprometimento linfonodal, e muitas irão a óbito (TAVASSOLI, 1992).

- Doença Localmente Avançada:

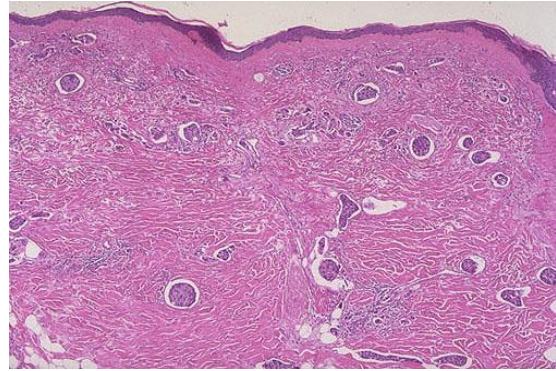
Ocorrem nos tumores que invadem a pele ou músculo esquelético e geralmente estão associadas a metástases à distância (LESTER, 2006).

- Carcinoma Inflamatório:

É uma entidade clínica, que apresenta carcinoma com infiltração maciça em vasos linfáticos da pele (Figura 20), gerando um espessamento cutâneo e aparência de pele em “casca de laranja” (Figura 19). Apresenta um prognóstico ruim, com índice de sobrevida em três anos de somente 3% a 10% (LESTER, 2006).

**Figura 19:** Macroscopia do Carcinoma Inflamatório

Fonte: Juliana Arôxa.

**Figura 20:** Microscopia carcinoma inflamatório (aumento x 10)

Fonte: Juliana Arôxa.

### ➤ Fatores Prognósticos Menores:

- Subtipos Histológicos:

Corresponde às características arquiteturais microscópicas das neoplasias, as quais foram traçadas a classificação histopatológica descrita anteriormente.

Ellis *et al.*(1992) e Pereira *et al* (1995) subdividiram os tipos histológicos mais comuns do carcinoma mamário invasor, com relação ao prognóstico em quatro grupos: (grupo 1) Tumores relacionados a excelente prognóstico, apresentando sobrevida de 10 anos acima de 80% - Carcinoma Tubular, Mucinoso, Cribriforme e Carcinoma Tubulo-lobular. (grupo 2) Tumores de bom prognóstico, apresentando sobrevida de 10 anos entre 60 e 80%- Carcinoma tubular misto, carcinoma lobular clássico e carcinoma ductal invasor associado a tipos especiais. (grupo 3) Tumores de prognóstico moderado, com sobrevida de 10 anos entre 50 e 60% - Carcinoma medular, Carcinoma Papilífero invasor. (grupo 4) Tumores de prognóstico ruim , com sobrevida de 10 anos menor do que 50% - Carcinoma ductal invasor, carcinoma misto ductal e lobular, carcinoma lobular sólido e carcinoma lobular misto (ALVARENGA, 2010).

É importante enfatizar que os subtipos histológicos tem importância prognóstica, porém, não influencia o estadiamento (ALVARENGA, 2010).

- Grau do Tumor (graduação histológica):

Grenhough em 1925 foi o primeiro a introduzir o conceito de graduação histológica, pois o mesmo verificou que graus diferentes de malignidade se refletiam em sua estrutura morfológica. Em 1928, Patey e Scarff seguiram o método de Grenhough, dando maior ênfase na quantidade da formação de túbulos (Figura 21 A,B), na variação da forma, tamanho e hipercromasia nuclear (Figura 22).

Foi em 1950 que Bloom, um radioterapeuta, seguiu o método de Patey e Scarff e valorizou a presença de figuras de mitoses, mas ainda utilizou um critério subjetivo de dividir os tumores em três graus de malignidade: baixo, moderado e alto (ALVARENGA, 2010).

Bloom junto a Richardson em 1957 instituíram um sistema numérico de *score*, baseado em grau histológico, grau nuclear e índice mitótico, sendo classificado como grau leve, moderado e intenso. Este sistema, o método de Scarff-Bloom e Richardson (SBR), foi adotado pela OMS (Scarff e Torloni, 1968) (ALVARENGA, 2010).

Elston e Ellis em 1998 modificaram e aprimoraram o sistema SBR, onde a contagem de mitoses obteve as modificações mais significativas, e os núcleos hipercromáticos foram excluídos da contagem. Esta alteração ocorreu na cidade inglesa de *Nottingham*, onde passou a ser chamada de graduação histológica de *Nottingham* (ALVARENGA, 2010).

Assim, é recomendado que todos os carcinomas invasores, com exceção do carcinoma medular, sejam submetidos à graduação; e que fragmentos pequenos de biópsias só devem ser graduados quando houver tecido tumoral suficiente (ALVARENGA, 2010).

É importante ressaltar que 85% das mulheres com tumores de grau I bem diferenciados (Figura 23), 60% das mulheres com tumores de grau II moderadamente diferenciados (Figura 24) e 15% das mulheres com tumores de grau III pouco diferenciados (Figura 25) sobrevivem por 10 anos (PINOTTI, 2003).

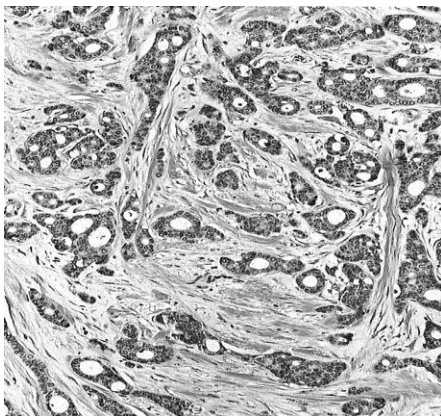
**Quadro 7** – Sistema de Gradação Histológica de *Nottingham* modificada por Elston e Ellis.

| Sistema de Gradação Histológica                                                            |      |       |       |
|--------------------------------------------------------------------------------------------|------|-------|-------|
| <b>Formação Tubular</b>                                                                    |      |       |       |
| 1 ponto: > 75% do tumor                                                                    |      |       |       |
| 2 pontos: 10-75% do tumor                                                                  |      |       |       |
| 3 pontos: < 10% de tumor                                                                   |      |       |       |
| Nota: A maior porção tumoral é que deve ser considerada para avaliação da formação tubular |      |       |       |
| Nota: A formação tumoral deve apresentar lúmens tubulares evidentes                        |      |       |       |
| <b>Pleomorfismo nuclear</b>                                                                |      |       |       |
| 1 ponto: variação nuclear mínima                                                           |      |       |       |
| 2 pontos: moderada variação nuclear                                                        |      |       |       |
| 3 pontos: marcada variação nuclear                                                         |      |       |       |
| Nota: Deve ser avaliado as áreas de maior atipia                                           |      |       |       |
| <b>Número de Figuras de Mitoses (avaliadas no aumento de x10)</b>                          |      |       |       |
|                                                                                            | (A)  | (B)   | (c)   |
| 1 ponto:                                                                                   | 0-5  | 0-9   | 0-11  |
| 2 pontos:                                                                                  | 6-11 | 10-19 | 12-22 |
| 3 pontos:                                                                                  | 11+  | 20+   | 23+   |
| Nota: Figuras de mitoses devem ser contadas na periferia do tumor                          |      |       |       |
| <b>ESCORE FINAL</b>                                                                        |      |       |       |
| 3 - 5 PONTOS: Bem diferenciado (Grau I)                                                    |      |       |       |
| 6 - 7 PONTOS: Moderadamente diferenciado (Grau II)                                         |      |       |       |
| 8 - 9 PONTOS: Pouco diferenciado (Grau III)                                                |      |       |       |

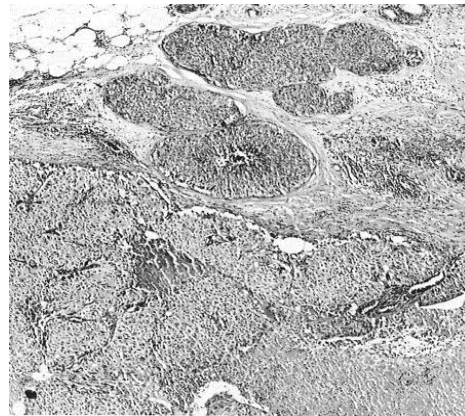
**Figura 21:** Formação tubular.

**A:** acentuada formação tubular; **B:** não houve formação tubular

**A**



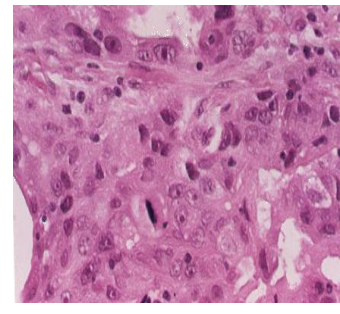
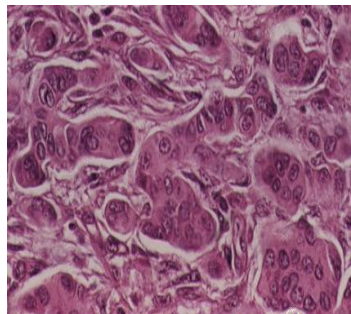
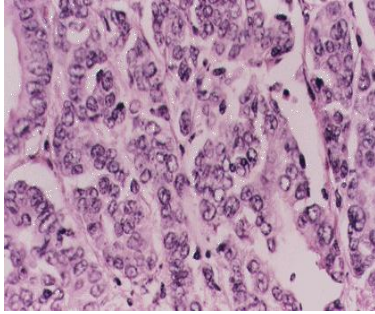
**B**



<http://www.pathologyoutlines.com/images/mammary/249.jpg>

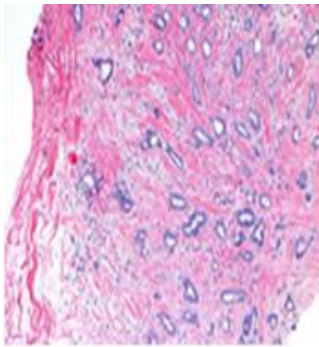


**Figura 22:** Pleomorfismo Celular. **A:** Pleomorfismo Leve;  
**B:** Pleomorfismo Moderado;  
**C:** Pleomorfismo acentuado.



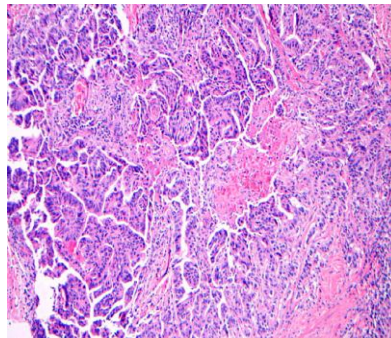
<http://www.breastdiseases.com/slides/invsl10.htm> <http://www.breastdiseases.com/slides/invsl11.htm> Fonte: Juliana Arôxa.

**Figura 23:** Baixo Grau



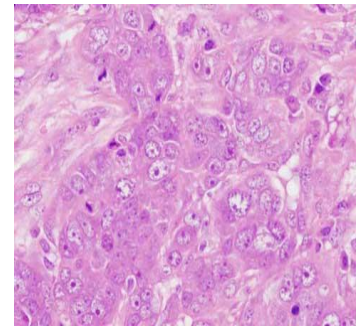
Cortesia: Dra. Ana Paula Fernandes

**Figura 24:** Grau Moderado



Cortesia: Dra. Ana Paula Fernandes

**Figura 25:** Grau acentuado



Cortesia: Dra. Ana Paula Fernandes

- **Receptores de Estrógenos e Progesterona:**

A célula normal da mama apresenta receptores de estrógeno e progesterona em seus núcleos e são detectados através do método de imuno-histoquímica. Estes receptores podem sofrer com o processo de malignização e perder suas características básicas não sendo detectado em alguns tumores.

Os receptores de estrógeno (RE) e progesterona (RP) têm sido rotineiramente estudados no câncer de mama desde 1970 (JORDAN *et al*, 1996), sendo que os tumores que contém receptores positivos (Figura 26 A,B), têm melhor prognóstico e vão obter benefícios com hormonioterapia (CLARK, 1996; HURSHAUT, 1996).

Em muitos carcinomas mamários, a célula neoplásica mantém a sua expressão nuclear de estrógeno e progesterona, em aproximadamente de 50% a 85% dos tumores, onde são mais comuns em mulheres em pós-menopausa, o que apresentam prognóstico levemente melhor, do que àquelas que não expressam esses receptores (Figura 26 C) (GAFORIO *et al*, 2003).

A detecção dos receptores estrogênicos e de progesterona é mandatória, predominantemente para avaliar a resposta terapêutica, tendo uma excelente resultado à terapia hormonal nos casos positivos, e pouca ou nenhuma resposta a este tipo de tratamento nos casos negativos (EISEMBERG, 2001; ALLEMANIC *et al*, 2004).

É possível afirmar que a positividade dos receptores de estrógeno e progesterona, seja indicativo de tumores mais indolentes, com menor velocidade de crescimento e maior período de sobrevida livre de doença (EISEMBERG, 2001; ALLEMANIC *et al*, 2004).

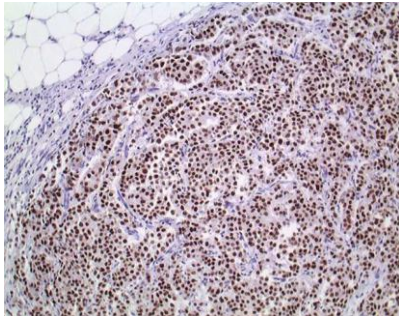
O receptor de estrógeno atua como regulador do crescimento epitelial nas células mamárias, e tem um importante papel na maturação do tecido, no desenvolvimento e na progressão do câncer de mama (EISEMBERG, 2001; ALLEMANIC *et al*, 2004).

Os receptores de progesterona (Figura 27) são regulados pelos receptores estrogênicos e a presença do PR usualmente indica que o RE está intacto e funcional (CLARKE, 2003). A expressão de progesterona está muito correlacionada com a expressão de estrógeno, porém a correlação é imperfeita, resultando em quatro possibilidades fenotípicas: O fenótipo RE+/PR+ é o mais frequente, corresponde a 70% dos tumores, com a melhor resposta terapêutica (60%); O fenótipo RE-/RP- é a próxima combinação mais frequente, correspondendo a 25% dos tumores, sendo eles totalmente não responsivos à terapia hormonal. Os outros dois padrões fenotípicos discordantes estão associados a respostas intermediárias e favorece grandes debates com relação a sua real existência (CLARKE, 2003).

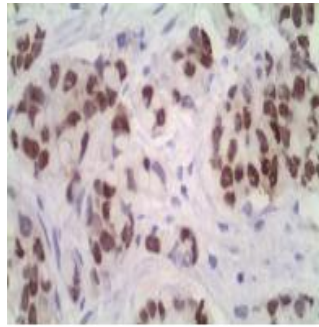
A avaliação dos receptores (RE/RP) é feita pelo método de imuno-histoquímica, que apresenta escore de proporção de células positivas de 0 a 5 e um escore de intensidade da positividade de 0 a 3. O teste é positivo quando a soma dos valores for maior que 2, ou quando a porcentagem de células for superior a 1% (HAMMOND *et al*, 2010). Outros métodos de detecção de receptores têm sido desenvolvidos, como novos métodos moleculares (SANCHEZ *et al*, 2009) (LAKHANI, 2012).

**Figura 26:** Imuno-histoquímica expressando receptores de estrógeno

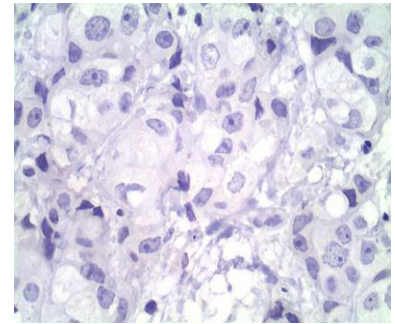
**A:** Fortemente marcado; **B:** Moderadamente marcado; **C:** Fracamente marcado



Fonte: Cortesia Dr. R. Falzoni



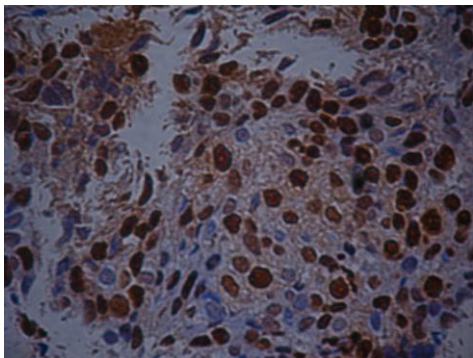
Fonte: Cortesia Dr. R. Falzoni



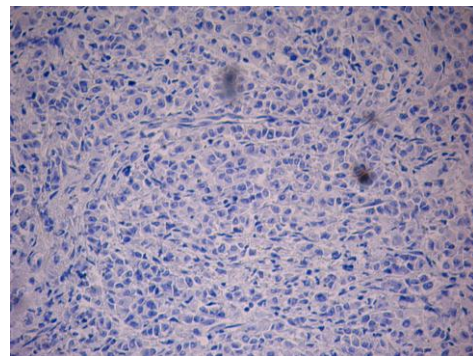
Fonte: Cortesia Dr. R. Falzoni

**Figura 27:** Imuno-histoquímica expressando receptores de progesterona.

**A:** Fortemente marcado; **B:** Fracamente marcado



Fonte: Juliana Arôxa



Fonte: Juliana Arôxa.

- **HER2/neu:**

O HER 2 ou receptor 2 do fator de crescimento epidérmico humano é uma glicoproteína transmembrana envolvida no controle do crescimento celular. Atua como co-receptor dos fatores de crescimento múltiplos. (HAYES, 2002).

A expressão do HER2/neu tem sido estudada nos cânceres invasores há 25 anos, e foi demonstrado que a amplificação deste gen ocorre em aproximadamente 15% dos tumores primários malignos de mama, e apresenta correlação com aumento da expressão da proteína HER2/neu (LAKHANI, 2012).

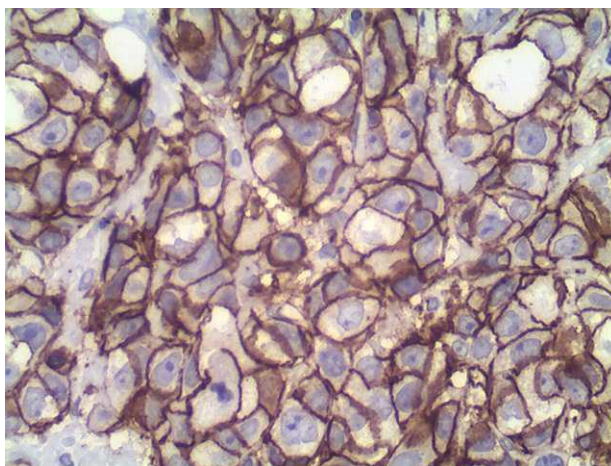
Os estudos têm demonstrado que a super expressão do HER2/neu está associada a um prognóstico ruim, porém a sua avaliação tem sido mais utilizada para determinar a resposta à terapia específica, ou seja, a um gene alvo (LAKHANI, 2012).

O Trastuzumab (Herceptin) é um anticorpo monoclonal humanizado ao HER2/neu desenvolvido especificamente para células alvo tumorais, não afetando as células normais. Embora apresente níveis de toxicidade cardíaca importante, este agente terapêutico tem tido resultados promissores (LAKHANI, 2012).

O status do HER2/neu é determinado pelo método de imuno-histoquímica e ou Hibridização in situ fluorescente (FISH). A relação entre a positividade do HER2/neu e os resultados clínicos é complexa. Alguns estudos demonstram que os pacientes com câncer de mama invasor e HER2/neu positivo, respondem favoravelmente a terapia alvo-específica anti-HER2 (Trastuzumab e lapatinib) (LAKHANI, 2012), por esta razão é de fundamental importância à verificação de sua positividade.

Tumores HER2/neu positivos são definidos em dois grupos: os que apresentaram forte coloração em membrana celular (Figura 28), referida como 3+ em >30% das células marcadas por imuno-histoquímica ou FISH; Tumores com moderada coloração circunferencial de membrana, referida como 2+ (Figura 29). Os tumores que não expressam ou pequena quantidade de expressão protéica pela imuno-histoquímica, referida com 0 ou 1+, são considerados HER2/neu negativos (Figura 30) e não terão resposta a terapia alvo (LAKHANI, 2012).

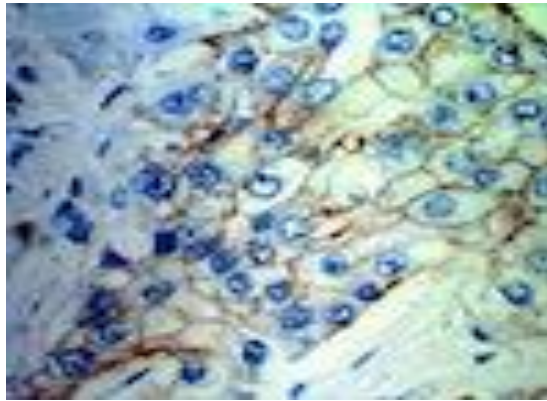
**Figura 28:** Expressão forte de HER2/neu (3+)



Fonte: Juliana Arôxa.

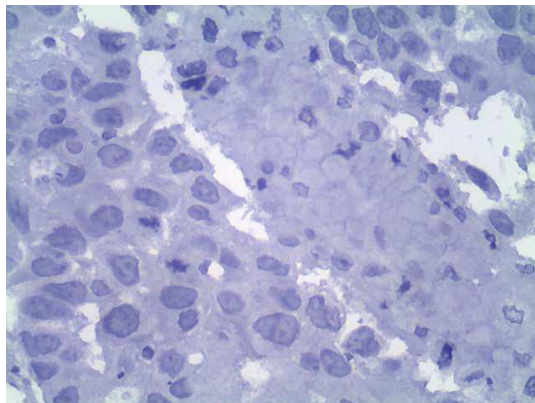


**Figura 29:** Expressão moderada de HER2/neu (2+)



<http://www.pathologyoutlines.com/topic/breastmalignanther2.html>

**Figura 30:** Expressão fraca de HER2/neu (2+)



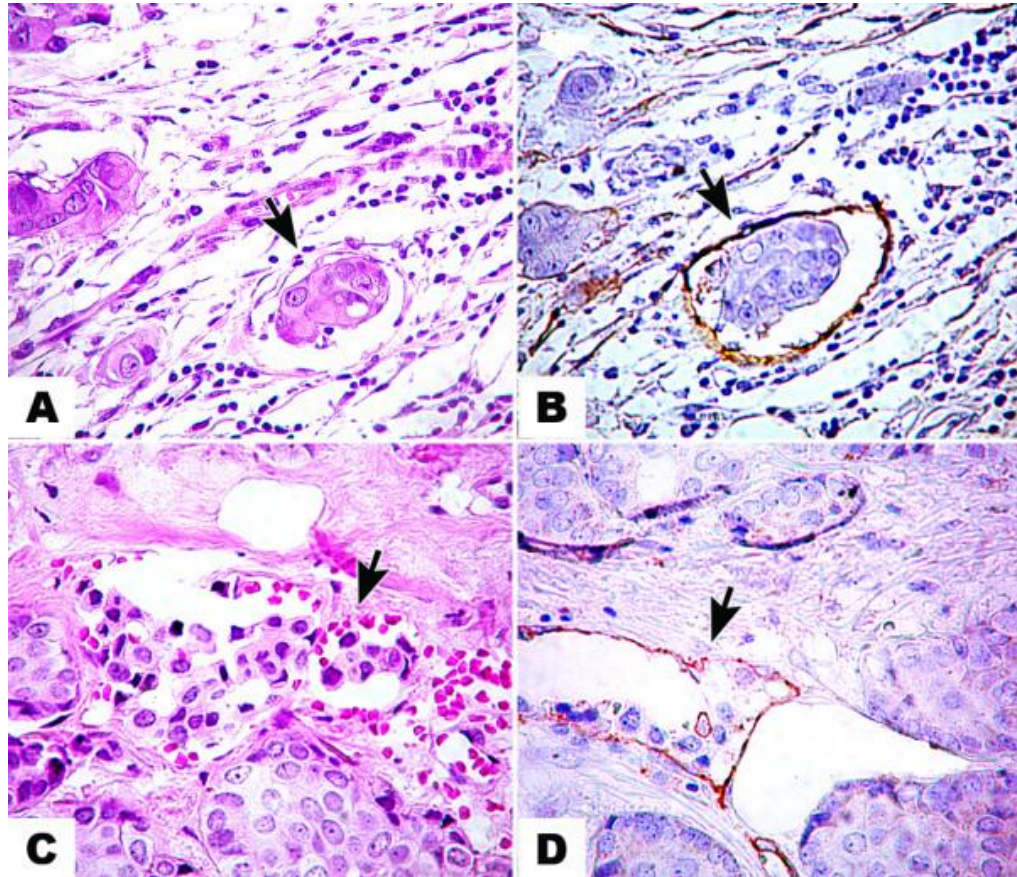
Fonte: Juliana Arôxa

- Invasão Linfovascular:

Este critério necessita ser estritamente definido para ter significância prognóstica.

A visualização de células dentro dos espaços vasculares (Figura 31), tanto linfáticos como capilares peritumorais está associada à presença de metástases em linfonodos e representa um fator prognóstico ruim para aquelas pacientes que obtiveram diagnóstico de linfonodos livres de neoplasias (LESTER, 2006).

**Figura 31:** Invasão vascular: Invasão linfática e vascular em câncer de mama invasor corados pelo HE e marcadores imuno-histoquímicos. Invasão de linfático (seta) em HE (A) e D2-40 (B) cortes corados de tumores mamários do mesmo caso; x 400; Invasão sanguínea (seta) vista em HE(A,B e C) e CD31 (D); x 400.



<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2294134/figure/F2/>

- **Frequência Proliferativa:**

Corresponde ao índice de proliferação da neoplasia e pode ser medida pela técnica de citometria de fluxo, como a avaliação da fração da fase S, pelo índice de marcação da Timidina, pela contagem mitótica ou pela detecção imuno-histoquímica de proteínas celulares, como por exemplo, as ciclinas, Ki-67 que são produzidas durante o ciclo celular.

Os tumores com altas frequências de proliferação têm pior prognóstico. É importante ressaltar que o método mais confiável para avaliar a proliferação celular ainda não está

estabelecido, embora as contagens mitóticas estejam incluídas como parte do sistema de classificação padrão (KEYOMARSI *et al*, 2002).

- Conteúdo do DNA:

A quantificação do DNA neoplásico pode ser determinada pela análise da citometria de fluxo ou pela análise da imagem das secções teciduais. Os tumores que apresentam índices de DNA anormais são tumores aneuplóides e têm um prognóstico levemente pior (LESTER, 2006).

## 2.8 MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS COMPLEMENTARES

Os biomarcadores moleculares que são preconizados na condução dos pacientes com câncer de mama invasor, de acordo com a Organização Mundial de Saúde, são os receptores de estrógenos, progesterona e HER2/neu (LAKHANI, 2012), já detalhados na sessão anterior.

O consenso de Sant. Gallen 2011 questiona também a necessidade da avaliação com o marcador Ki-67 e maiores estudos foram recomendados com outros marcadores complementares.

- Ki-67

O antígeno Ki 67 é uma proteína nuclear, que preferencialmente se expressa durante todas as fases do ciclo celular, G1, S, G2 e fase M, mas está ausente em células em fase G0 (GERDES *et al*, 1994).

Durante a interfase o antígeno pode ser detectado exclusivamente dentro do núcleo, enquanto que na maioria das mitoses, muitas proteínas são relocadas para a superfície dos cromossomos. O antígeno é rapidamente degradado à medida que as células entram em estado não proliferativo (SCHOLZEN, 2000) e geralmente não se expressam durante o processo de reparação do DNA (DAKO®, 2005).

Pesquisadores têm usado citometria de fluxo para determinar a fração da fase S ou a imuno-histoquímica para estudar a expressão do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) ou Ki-67 (CALY, 2004).

Os estudos tem demonstrado uma boa correlação de detecção nos diferentes métodos e têm evidenciado que alta expressão do Ki67 está correlacionada com pior prognóstico (MOLINO *et al*, 1997; NAKAGOMI, 1998).

Porém diferentes pontos têm sido utilizados para demonstrar o índice proliferativo alto, assim como diferentes técnicas para demonstrar este índice, o que gera uma dificuldade na interpretação da literatura, não havendo consenso para definição do Ki67.

Devido às limitações das interpretações, de como executar o teste, assim como, entender seus resultados, os autores não têm recomendado a utilização deste marcador na rotina clínica, visão endossada pela ASCO 2007 (HARRIS, 2007).

#### •p53

A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear com peso molecular de 53 Kda e pode estar presente numa variedade de células normais, porém tem meia vida curta e só está presente por alguns minutos. O gene p53 mutante é frequentemente encontrado no desenvolvimento de carcinomas mamários e devido a esta mutação, a proteína se torna mais estável podendo ser acumulada em altos níveis sendo observado o seu acúmulo em 76% de 212 neoplasias malignas humanas. Inibe a replicação do DNA e é molécula de controle de *check-points* para a progressão do ciclo, além de também está envolvido na regulação de apoptose (DAKO®, 2005).

Corresponde a um gen supressor tumoral comumente mutado em alguns cânceres humanos, e são detectados na rotina diagnóstica da patologia cirúrgica mamária pela técnica de imuno-histoquímica, que quando se apresenta fortemente corado é interpretado como positivo, enquanto que nas marcações discretas, são considerados negativos.

A superexpressão do p53 nos carcinomas de mama está associada à pior prognóstico. A maioria dos cânceres de mama têm demonstrado forte imunoreatividade de p53 mutante, predominante em subtipos basais. A utilidade clínica da avaliação do p53 em tumores não basais ainda não está muito bem definida (SORLIE *et al*, 2003). No entanto um recente estudo mostrando anormalidade no p53 tem demonstrado sequencialmente associação à pior

prognóstico e que deleções/mutações do p53 foram particularmente de valor prognóstico em pacientes com linfonodos negativos e com receptores estrogênicos positivos (OLIVIER, 2006).

Embora existam estas observações, na prática clínica ainda é insuficiente à recomendação da avaliação do p53 na rotina e no manejo de pacientes com câncer de mama, assim como foi definido em 2007 ASCO/CAP (WOLFF, 2007; HARRIS, 2007).

- CD34

É uma proteína de cadeia única com aproximadamente 116kDa, que se expressa em células hematogênicas imaturas ou células progenitoras, células endoteliais de capilares, fibroblastos embrionários, além raras células gliais (KRAUSE, 1996).

Corresponde a um potencial indicador de diferenciação vascular, sendo altamente sensível a endotélio diferenciado, independente do grau tumoral. Não obstante a especificidade deste marcador é um problema podendo estar presente com frequência em tumores vasculares e devendo ser utilizado para o diagnóstico diferencial com estes tumores (NATKUNAM *et al*, 2000; HARVELL, 1998).

## 2.9 ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA

Estadiamento tumoral é o critério utilizado para determinar o tipo de tratamento, ou seja, para definir escolha terapêutica adotada para cada paciente (TAVASSOLI, 2003).

Estadiar um carcinoma incorporado a um índice prognóstico, ou mesmo isoladamente, é um importante preditor de sobrevida e é crucial para o manejo das pacientes (TAVASSOLI, 2003).

O estadiamento pode ser puramente clínico e ou baseado na combinação de exames físicos, mamografias e outros métodos. O exame físico pode incluir a avaliação do tamanho tumoral, mobilidade, associação com alterações na pele do tumor primário, mobilidade de linfonodos e alguma evidência de metástases à distância (TAVASSOLI, 2003).

Estadiamento patológico requer exame do espécime tissular, do tumor primário, dos linfonodos axilares e de outros sítios distintos, para confirmar a presença de tumor e tamanho da lesão (TAVASSOLI, 2003).

Estadiamentos clínicos e patológicos nem sempre são concordantes, como por exemplo, um linfonodo palpável não necessariamente terá infiltração tumoral. Achados mostram que patologistas e cirurgiões só concordam em 54% dos casos com relação ao tamanho dos tumores. Cirurgiões e radiologistas concordam em 59% dos casos (TAVASSOLI, 2003).

Assim, foi desenvolvido um sistema de estadiamento de câncer de mama baseado na avaliação do tumor primário (T), linfonodos regionais (N) e metástase à distância (M) que foi inicialmente proposto em 1954 pela *International Union Against Cancer* (UICC). Esta proposta contempla um estadiamento clínico e patológico, e é denominada de sistema TNM (DONEGAN, 1988):

**Quadro 8** – A - Estadiamento do câncer de mama, relacionando tamanho tumoral, segundo sistema TNM

| pT – Tumor Primário  |                                                                                                                                                                                                        |
|----------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| TNM                  | Descrição                                                                                                                                                                                              |
| pT – Tamanho Tumoral |                                                                                                                                                                                                        |
| pTx                  | Tumor primário não pode ser avaliado                                                                                                                                                                   |
| pT0                  | Não há evidência de tumor primário                                                                                                                                                                     |
| pTis                 | Carcinoma in situ<br>Carcinoma ductal in situ<br>Carcinoma lobular in situ<br>Doença de paget de mamilo sem tumor associado.<br>Quando presente o tumor é classificado de acordo com tamanho da lesão. |
| pT1                  | Tumor menor ou igual a 2 cm.                                                                                                                                                                           |
| pT 1mic              | Carcinoma microinvasor.                                                                                                                                                                                |
| pT 1a                | Tumor maior que 0,1 e menor ou igual a 0,5cm                                                                                                                                                           |
| pT 1b                | Tumor maior que 0,5 e menor ou igual a 1 cm.                                                                                                                                                           |
| pT 1c                | Tumor maior que 1 cm e menor ou igual a 2 cm.                                                                                                                                                          |
| pT2                  | Tumor maior que 2 cm e menor ou igual a 5 cm.                                                                                                                                                          |
| pT3                  | Tumor maior que 5 cm.                                                                                                                                                                                  |
| pT4                  | Tumor de qualquer tamanho com extensão para:                                                                                                                                                           |
| pT 4a                | Parede torácica                                                                                                                                                                                        |
| pT 4b                | Edema e ulceração da pele                                                                                                                                                                              |
| pT 4c                | 4a+4b                                                                                                                                                                                                  |
| pT 4d                | Carcinoma inflamatório                                                                                                                                                                                 |

American Joint Committee on Cancer, 2009

**Quadro 8 – B** - Estadiamento do câncer de mama, relacionando comprometimento de linfonodos e metástases à distância, segundo sistema TNM

| <b>pN – Linfonodos Regionais</b>  |                                                                                                                                                                                                                         |
|-----------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <b>pNx</b>                        | Linfonodos regionais não podem ser avaliados                                                                                                                                                                            |
| <b>pN0</b>                        | Ausência de metástases para linfonodos regionais                                                                                                                                                                        |
| <b>pN1</b>                        |                                                                                                                                                                                                                         |
| pN1 mi                            | Micrometástase (maior que 0,2 mm e menor ou igual a 2mm) em axila ou cadeia mamária interna.                                                                                                                            |
| pN1 a                             | 1 a 3 linfonodos axilares ipsilaterais comprometidos, incluindo pelo menos um metástase maior que 2mm.                                                                                                                  |
| pN1 b                             | Linfonodos da cadeia interna com metástase microscópica identificada em linfonodo sentinela.                                                                                                                            |
| pN1 c                             | 1 a 3 linf. axilares positivos, incluindo uma metástase > 2mm, linf. da mamária com positividade em linf. sent.                                                                                                         |
| <b>pN2</b>                        |                                                                                                                                                                                                                         |
| pN2 a                             | 4 a 9 linfonodos axilares comprometidos, incluindo pelo menos uma metástase maior que 2mm.                                                                                                                              |
| pN2 b                             | Linfonodos da mamária interna, clinicamente aparentes, na ausência de comprometimento axilar.                                                                                                                           |
| <b>pN3</b>                        |                                                                                                                                                                                                                         |
| pN3 a                             | 10 ou mais linfonodos axilares comprometidos, incluindo pelo menos uma metástase maior que 2mm.<br>Linfonodo infra-clavicular ipsilateral comprometido                                                                  |
| pN3 b                             | Linfonodos da mamária interna, clinicamente comprometidos, na presença de linfonodos axilares positivos.<br>> 3 linfonodos axilares comprometidos e linfonodos da mamária interna com metástase em linfonodo sentinela. |
| <b>pM - Metástase à Distância</b> |                                                                                                                                                                                                                         |
| <b>pMx</b>                        | Metástase à distância não pode ser avaliada.                                                                                                                                                                            |
| <b>pM0</b>                        | Ausência de metástase à distância.                                                                                                                                                                                      |
| <b>pM1</b>                        | Presença de metástase à distância.                                                                                                                                                                                      |

American Joint Committee on Cancer, 2009

Os principais fatores prognósticos utilizados pela *American Joint Committee on Cancer*, dividem os carcinomas de mamas em estadiamentos clínicos (AJCC, 2010):

Estadiamento 0 – Carcinoma ductal in situ ou carcinoma lobular in situ – sobrevivência em 5 anos de 92%;

Estadiamento I – Carcinoma invasor com 2 cm ou menor em diâmetro (incluindo carcinoma in situ com microinvasão), sem envolvimento nodular (ou somente metástases menores que 0,02 cm de diâmetro) – sobrevivência em 5 anos de 87%;

Estadiamento II – Carcinoma invasor com 5 cm ou menor em diâmetro, com até 3 linfonodos axilares envolvidos; carcinoma invasor maior que 5 cm sem envolvimento nodular – sobrevivência em 5 anos de 75%.

Estadiamento III - Carcinoma invasor com 5 cm ou menor em diâmetro, com quatro ou mais nódulos axilares envolvidos; Carcinoma invasor maior que 5 cm de diâmetro, com envolvimento nodular; Carcinoma invasor com 10 ou mais nódulos axilares envolvidos; Carcinoma invasor com envolvimento dos linfonodos mamários internos ipsilaterais; Carcinoma invasor com envolvimento cutâneo, fixação na parede torácica ou carcinoma inflamatório clínico. - sobrevivência em 5 anos de 46%.

Estadiamento IV – Qualquer câncer de mama com metástase à distância. – sobrevivência em 5 anos de 13%.

**Quadro 9** – Estadiamento clínico do câncer de mama, segundo sistema TNM

| ESTADIAMENTO |            |            |    |
|--------------|------------|------------|----|
| Estágio 0    | Tis        | N0         | M0 |
| Estágio IA   | T1         | N0         | M0 |
| Estágio IB   | T0,T1      | N1mi       | M0 |
| Estágio IIA  | T0,T1      | N1         | M0 |
|              | T2         | N0         | M0 |
| Estágio IIB  | T2         | N1         | M0 |
|              | T3         | N0         | M0 |
| Estágio IIIA | T0,T1,T2   | N2         | M0 |
|              | T3         | N1,N2      | M0 |
| Estágio IIIB | T4         | N0,N1, N2  | M0 |
| Estágio IIIC | Qualquer T | N3         | M0 |
| Estágio IV   | Qualquer T | Qualquer N | M1 |

Fonte: American Joint Committee on Cancer, 2010

A utilização destes elementos para prever o comportamento tumoral tem grande relevância clínica, embora as recidivas tumorais possam surpreender. Segundo Manfred Kaufman, 30% das mulheres que foram linfonodos negativos no ato do diagnóstico inicial, apresentarão recidiva tumoral em um período de dez anos, bem como, 10 a 20% delas desenvolverão metástase à distância.



## 2.10 ESTRUTURA HISTOLÓGICA DA MEDULA ÓSSEA

A Medula óssea é um órgão difuso, volumoso, distribuído ao longo das cavidades ósseas e sempre em atividade, produzindo por dia cerca de 2,5 bilhões de eritrócitos, 2,5 bilhões de plaquetas e 1,0 bilhão de granulócitos por Kg de peso corporal em um adulto (JUNQUEIRA, 2004).

É classicamente subdividida em medula óssea vermelha ou hematogênica, produtora de células sanguíneas, e medula amarela, constituída por adipócitos correspondendo à fração não produtora de células (JUNQUEIRA, 2004).

### ➤ Medula óssea hematogênica e celularidade

A porção hematogênica é formada por células em meio a fibras reticulares (colágeno tipo III). Essas células e fibras formam uma esponja, permeadas por vários capilares sinusóides (JUNQUEIRA, 2004).

A celularidade da medula óssea varia de acordo com a idade do indivíduo. Durante os primeiros três meses de vida, a MO é constituída 100% de células, 80% na criança até os dez anos de idade, e segue um declínio em celularidade na idade adulta, onde será constituída de 30% de células num indivíduo com 70 anos (HARTSOCK *et al*, 1965; GULATI *et al*, 1988; BAIN, 1996; FRIEBERT *et al*, 1998; NAEIM, 1998).

É também dependente da idade do indivíduo a sua distribuição ao longo das cavidades ósseas. Em neonatos as cavidades medulares estão totalmente preenchidas por células hematopoéticas e a hematopoese ocorre até em falanges. Em adultos jovens as células estão confinadas em crânio, vértebras, costelas, clavícula, esterno, pélvis e porções proximais do úmero e fêmur. Em indivíduos na maturidade, encontramos maiores atividades medulares em costelas, esterno e crista ilíaca, existindo apenas pequenas variações de indivíduos para indivíduos (BAIN *et al*, 2010).

Na vida extrauterina a hematopoese ocorre normalmente na medula óssea, predominando em determinados tipos de ossos de acordo com idade. À medida que o organismo vai necessitando de maiores demandas, as células hematopoéticas vão se

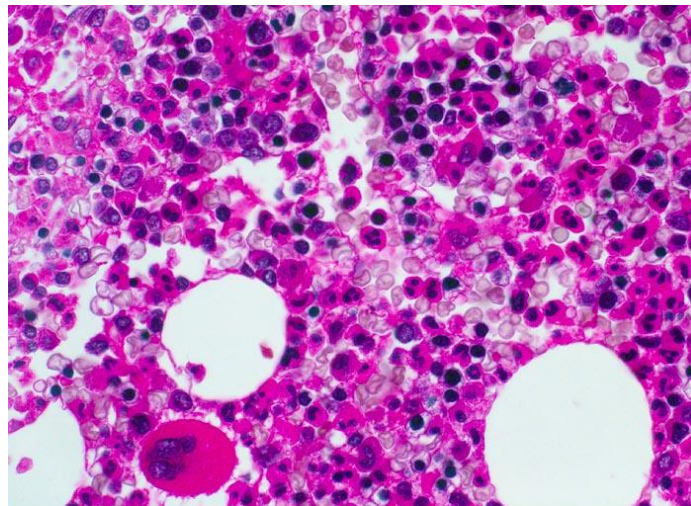
proliferando e expandindo, ocupando as cavidades medulares e gerando uma expansão tecidual, mesmo em ossos considerados já inativos (BAIN *et al*, 2010).

A porção hematogênica é constituída por três linhagens celulares: eritroblástica, mieloblástica (granulocítica) e megacariocítica (Figura 32). Células mielóides maduras correspondem ao tipo celular mais comum, e devem constituir uma proporção de 2:1 a 4:1 na relação mielócito/eritrócito, predominantemente em mulheres e crianças. Todos os estágios da maturação de granulócitos e eritrócitos estão normalmente presentes, enquanto que usualmente células blásticas só deverão estar presentes em proporção menor que 3% (ORAZI *et al*, 2006).

Eritroblastos e megacariócitos são geralmente encontrados em região central das cavidades medulares e sinusóides adjacentes. Eritroblastos normalmente apresentam-se em pequenos ou em grandes grupamentos celulares, exibindo vários estágios de maturação, enquanto que os megacariócitos são facilmente identificáveis, pois são células grandes (>15mm diâmetro) com núcleos multilobulados (ORAZI *et al*, 2006).

Os linfócitos representam entre 10% a 15% da composição celular, porém precursores linfóides e linfócitos maduros poderão estar aumentados na infância e na senilidade (LONGACRE *et al*, 1989).

**Figura 32:** Histologia da Medula Óssea



<http://alf3.urz.unibas.ch/pathopic/e/getpic-fra.cfm?id=004026>

## ➤ Estruturação Óssea

O conhecimento da estruturação óssea da medula é muitas vezes subjugado e desprezado, tendo uma grande importância na interpretação dos espécimes desse órgão, na hematopatologia (ORAZI *et al*, 2006).

A medula é constituída em sua grande parte por uma estrutura óssea que está subdividida em córtex e medula, sendo o córtex representado por uma forte camada de osso compacto, enquanto que a medula é uma porção de cavidades, semelhantes a favos de mel de ossos esponjosos, jovens e em formação que contém o tecido gelatinoso denominado medula óssea (BAIN *et al*, 2010).

O córtex é a estrutura sólida do osso que dá força e robustez, e é composta largamente por osso lamelar e poucos fragmentos de ossos esponjosos apresentando sistema Harvesiano bem organizado. Enquanto que o osso medular é trabecular, esponjoso e contém poucas lamelas, além de apresentar estrutura histológica menos organizada (BAIN *et al*, 2010).

O osso cortical é revestido na maior parte da superfície externa por perióstio (conferindo alta sensibilidade neurológica), além de apresentar uma camada externa fibrosa e uma interna osteogênica.

Osteoblastos e osteoclastos encontram-se na superfície do osso trabecular e se originam de diferentes “*stem cells*”.

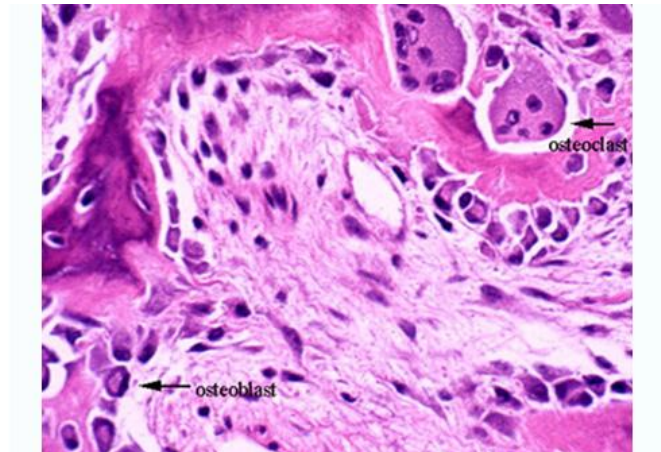
Osteoblastos e posteriormente osteócitos, têm origem mesenquimal e são derivados das mesmas *stem cells* dos condrócitos e provavelmente também de fibroblastos estromais. Osteoclastos, no entanto, são derivados de *stem cells* hematopoéticos, sendo formados pela fusão de células de linhagem monocítica (BAIN *et al*, 2010).

As células que serão formadoras de células ósseas são designadas de células osteoprogenitoras. São planas, algumas vezes fusiformes e capazes de se diferenciar ou em osteoblastos ou em condrócitos, dependendo dos fatores estimuladores estromais.

Osteoblastos sintetizam glicosaminoglicanas e a parte orgânica da matriz óssea e também fibras colágenas (colágeno I), formando o osteóide ou osso não calcificado. Têm também a capacidade de concentrar fosfato de cálcio, participando ativamente do processo de mineralização. Assim, são responsáveis pelo remodelamento ósseo e formação de ossos jovens trabeculares e calcificação.

Osteoclastos são células gigantes (Figura 33), multinucleadas, ramificadas de origem monocítica, derivada da fusão de monócitos e apresentam intensa ação enzimática com grande produção de enzimas líticas capazes de degradar a matriz óssea, promovendo assim, a reabsorção óssea (BAIN *et al*, 2010).

**Figura 33:** Estruturação óssea da medula, seta evidenciando osteoclastos/osteoblastos  
(aumento x 40)



<http://img.medscape.com/pi/features/slideshow-slide/osteoporosis/fig6.jpg>

#### ➤ Estroma da Medula Óssea

As células hematopoéticas da medula óssea estão incorporadas em um estroma de tecido conjuntivo, constituído por células adiposas e uma malha apresentando uma trama vascular, ramificações fibroblásticas, macrófagos, poucas fibras nervosas mielinizadas e não mielinizadas, além de uma pequena quantidade de fibras reticulares (BAIN, 2010).

Células estromais incluem células chamadas de reticulum ou células reticulares. Este termo inclui provavelmente dois tipos celulares de diferentes origens: o reticulum fagocítico, que são macrófagos e originam-se de progenitores hematopoéticos (são fosfatase alcalina positivas) e reticulum não fagocítico ou células reticulares relacionadas com fibroblastos, células adventícias de sinusóides e possivelmente também osteoblastos e condrócitos (fosfatase alcalina negativa).

As células adventícias de suposta origem fibroblástica estão interligadas e associadas a uma rede delicada de fibras extracelulares as quais podem ser demonstradas pela coloração de reticulina.

Fibras reticulares são formadas predominantemente por colágeno tipo III e uma pequena porção de colágeno tipo I associado a elevado teor de proteoglicanas e glicoproteínas, sendo mais finas que as outras fibras. Apresenta-se em pequena quantidade distribuindo-se em torno de vasos e próximas ao periósteo. É provável que células adventícias e fibroblastos possam sintetizá-la, especificamente em situações patológicas (WICKRAMASINGHE, 1975).

O aumento da síntese de fibras reticulares, assim como a sua deposição, evidencia anormalidades não específicas da medula óssea incluindo granulomas e infiltração por carcinomas ou células linfóides (AHLUWALIA, 2003).

A matriz extracelular deve ser demonstrada nas preparações de rotina pela coloração de Tricrômico de Gomory, Reticulina, e Prata, que coram os diversos tipos de colágeno incluindo colágeno tipo III e IV, além das fibras reticulares. Tais colorações são indicadas para a avaliação da presença e grau de fibrose na medula (ORAZI, 2006).

O grau de fibrose pode ser estimado utilizando a abordagem proposta por Manoharan *et al.* (1979).

**Quadro 10:** Graduação da fibrose na medula óssea.

| Grau de Fibrose |                                                                                     |
|-----------------|-------------------------------------------------------------------------------------|
| 1+              | Finas fibras focais com raras fibras grosseiras.                                    |
| 2+              | Rede de fibras difusamente finas com discreto aumento de fibras grosseiras.         |
| 3+              | Difusa rede de fibras grosseiras destituídas de colagenização (Tricrômico negativo) |
| 4+              | Difusa rede de fibras grosseiras com colagenização (Tricrômico positivo).           |

Modificada por Manoharan et al. 1979.

A coloração do Tricrômico (Masson) é comumente utilizada para demonstrar a presença de colágeno maduro, que pode ocorrer em estágios avançados de fibrose medular (ex.: osteomieloescleroses). A graduação de fibrose, como regra geral deve ser avaliada apenas em áreas de hematopoese ativa, áreas de medula amarela devem ser excluídas (ORAZI, 2006).

A matriz estromal inclui também muitos fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e componentes de matriz extracelular que regulam o processo hematopoético/células progenitoras hematopoéticas promovendo a proliferação e diferenciação (KAPLAN, 2006).

A diferenciação celular geralmente ocorre na porção central da cavidade medular. Isto explica a presença de células mais maduras, nesta região, enquanto que as *stem cells* hematopoéticas primitivas, localizam-se nas bordas ósseas próximas aos osteoblastos (KAPLAN, 2006).

As células totipotentes produtoras de estruturas ósseas regulam e dão suporte às *stem cells* hematopoéticas, permitindo que as mesmas permaneçam no nicho endosteal em estado quiescente (NILSSON *et al*, 2001; TAICHMAN, 1998).

*Stem cells* endoteliais exibem muitas características fenotípicas similares às hematopoéticas e provavelmente apresentam uma origem em comum, o hemangioblasto.

A contribuição das *stem cells* endoteliais para a vascularização da medula óssea é a única especialização das células endoteliais sinusoidais, a qual prover um segundo nicho dentro da medula para as células hematopoéticas primitivas, o nicho vascular. É neste local que ocorre a regulação da proliferação, diferenciação e migração transendotelial das *stem cells* hematopoéticas (KAPLAN, 2006).

Fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e seus receptores atuam na formação de novos vasos, assim como na manutenção vascular. Tem importante papel tanto no osso como na medula óssea, influenciando o crescimento de células hematopoéticas e na formação óssea (KAPLAN, 2006).

O suprimento sanguíneo da medula hematopoeticamente ativa é dado pelas artérias nutrientes e capilares das artérias musculares. A artéria nutriente penetra na cavidade medular e se abre em uma rede sinusoidal. Esta rede é o principal sítio de trocas de nutrientes entre o sangue circulante e a medula. A rede sinusoidal ou rede sinusal penetra na cavidade central medular onde o sangue fica temporariamente “aprisionado” e seguirá para a circulação venosa penetrando nas veias emissárias (IVERSEN PO, 2003).

Enquanto que a anatomia vascular da medula óssea está bem definida, o fluxo sanguíneo e ou a perfusão ainda não é bem compreendido (DANIEL, 1994). A medula necessita de um suprimento satisfatório para que ocorra uma hematopoese adequada. O real entendimento da perfusão da medula, assim como a sua regulação, foi desconhecido por várias décadas, principalmente devido às dificuldades tecnológicas. Recentes estudos e avanços na metodologia têm permitido análises mais detalhadas da perfusão da medula óssea, embora ainda necessite de maiores esclarecimentos (IVERSEN PO, 2003).

Embora não existam provas concretas de que a vascularização da medula óssea seja inervada, a vasoregulação do fluxo sugere ação neural, além de estímulos por citocinas, fatores estimuladores de colônia para granulócitos e também tem sido postulado o papel do óxido nítrico na vasodilatação e consequente aumento do fluxo sanguíneo (IVERSEN PO, 2003).

## 2.11 TÉCNICAS DE ESTUDO DA MEDULA ÓSSEA

Medula óssea foi inicialmente obtida com propósito de diagnóstico durante a primeira década do século XX, em material decorrente de necrópsia. Porém, só a partir de 1920, onde houve a introdução da aspiração esternal, que este exame se tornou um procedimento diagnóstico importante (FILHO, 2011).

O estudo das alterações anatomopatológicas da medula óssea é um campo relativamente recente na Patologia. Geralmente suas doenças refletem em sangue periférico e podem ser diagnosticadas através de um simples hemograma (FILHO, 2011)

Espécimes de medula para estudo citológico e histológico podem ser obtidos por biópsia aspirativa, por biópsia com agulha grossa (“*core biopsy*”) usando a agulha Trephina, por biópsia aberta ou na autópsia (BAIN *et al*, 2010).

As técnicas mais importantes e mais utilizadas para o estudo morfológico da medula podem ser de material decorrente de aspiração com a confecção de um esfregaço, e através de amostras de biópsias trephina, que pode ser realizado virtualmente em qualquer paciente, devendo ter maiores cuidados em pacientes com deficiência de coagulação e trombocitopenia profunda (ORAZI *et al*, 2006).

A biópsia Trephina, quando realizada em adultos deve ser coletada em crista ilíaca posterior ou anterior, sendo o local com menor taxa de complicações.

O espécime da biópsia pode ser fixado em formalina neutra por pelo menos 18 hs, em solução de ZenKer’s por no mínimo 4 hs ou em B5 (formalina e mercúrio clorídrico) por 4 hs e descalcificado em ácido fórmico a 10% e 1% de formalina ou mesmo outros descalcificadores (RILEY SR *et al*, 2004).

Os cortes histológicos de medula óssea ou cortes ósseos descalcificados devem ser cortados em uma espessura de 3 a 5 micras e utilizados as colorações de rotina. Para estudos

imuno-histoquímicos cortes de parafina de espécimes das biópsias trephine devem ser utilizados a fosfatase imunoalcalina ou o método de imunoperoxidase (RILEY SR *et al*, 2004).

O material obtido pela biópsia aspirativa ou aspiração, pode ser utilizado para preparar “*imprints*” (esfregaços) através do toque delicado desse material no vidro da lâmina, ou através da técnica de Jamshidi, o material da aspiração pode passar inicialmente por um processo de diluição, sendo células mononucleadas obtidas por centrifugação. As mesmas são lavadas e os eritrócitos são lisados, e citospins são preparados com 10<sup>6</sup> células, fixados em formalina, corados com o imunomarcador e submetidos a avaliação ótica manual e ou automatizada.

Os esfregaços mostram detalhes da morfologia celular e características individuais do tecido. O corte histológico é útil para o estudo da arquitetura tecidual como um todo (RILEY SR *et al*, 2004).

Um perfeito estudo da medula óssea requer o exame duplo, tanto o esfregaço como o corte histológico. Esfregaços são indubitavelmente as melhores preparações para o estudo de detalhes celulares e prover pouca informação da relação intercelular e da estrutura organizacional da medula, enquanto que, secções histológicas promovem o inverso, melhores informações da organização tecidual e poucas informações de morfologia celular (RILEY SR *et al*, 2004).

Assim concluímos que as duas técnicas são complementares para utilização na prática clínica, sendo importante salientar que a aspiração é mais tolerada pelos pacientes apresentando desconforto mínimo, enquanto que a biópsia trephina necessita de analgesia tópica ou até mesmo sedação principalmente nas crianças.

As complicações decorrentes destes procedimentos são raras, e têm sido relatados alguns casos de morte, decorrentes de tamponamento cardíaco após aspiração esternal (ORAZI *et al*, 2006).

A interpretação dos espécimes da medula, diferentemente de outros órgãos requer muitas vezes, técnicas complementares. A avaliação deve ser feita em conjunto com os dados clínicos, com os dados do sangue periférico, completa contagem sanguínea e em muitos casos pode se utilizar avaliação citoquímica, imunocitoquímica, imunofenotipagem com citometria de fluxo, imuno-histoquímica, biologia molecular e estudos citogenéticos (ORAZI *et al*, 2006).



Considerando a especificidade e sensibilidade destas múltiplas técnicas, um grupo de pesquisadores da Noruega, publicou uma definição de critérios na tentativa de padronizar a detecção de doença residual mínima (BORGEN *et al*, 1999).

A padronização foi recomendada e adotada pela secção Européia da *International Society of Hematotherapy and Graft Engineering* (ISHAGE). Baseia-se em critérios morfológicos identificados através da imunomarcção do método de imunocitoquímica, que propôs uma subdivisão dos elementos corados em três grupos: (1) Células tumorais com sinais patognômicos de natureza claramente epitelial, com núcleos grandes ou formando grupamentos  $>$  ou  $= 2$  células imunopositivas; (2) Células tumorais com características morfológicas intermediárias entre células hematopoéticas e células que perderam os critérios patognômicos da natureza epitelial. Serão consideradas tumorais, se a coloração do grupo controle for específica e o anticorpo for negativo; (3) Células bem definidas como hematopoéticas ou contaminantes (BORGEN *et al*, 1999).

Com a publicação deste Consenso em 1999, as pesquisas ficaram centradas em torno deste método, organizado predominantemente por Hematologistas.

Outras técnicas complementares foram testadas como Citometria de Fluxo, RT-PCR, FISH, dispositivos de imagens o “*Cell Search*” e ACIS (*Automated Cellular Image Analysis System*), métodos de enriquecimento ou técnicas que excluem as células irrelevantes, também apresentaram bons resultados de detecção, porém variáveis. Segundo Park, de acordo com o modo e local em que o pesquisador busca as micrometástases, diferenças de sensibilidade podem surgir e consequentemente de resultados.

Devemos considerar que a hematopatologia é uma subespecialidade relativamente nova no campo da anatomia patológica; e que a interpretação dos espécimes provenientes de secções de biópsias trephinas são geralmente vistas como uma das mais difíceis áreas da patologia cirúrgica (BAIN *et al*, 2010).

## 2.12 MEDULA ÓSSEA COMO SEDE DE METÁSTASES

A medula óssea é um órgão complexo que se distribui ao longo das cavidades ósseas, apresentando uma massa estimada de 1600 a 3700 g em um adulto, e apresenta três funções básicas: formação e maturação de células sanguíneas (hematopoiese), fagocitose e degradação

de partículas circulantes desde microorganismos e leucócitos senis, além de produção de anticorpos (WICKRAMASINGHE, 1997).

O processo de degradação de partículas e a renovação contínua das células sanguíneas senescentes envolve o aprisionamento de células envelhecidas, células de origem não hematopoética circulantes, que sofrerão o processo de apoptose e consequentemente serão fagocitadas (RIETHDORF S; PANTEL K, 2008).

As células tumorais perderam a sua capacidade de apoptose, ou seja, não permitem a sua autodestruição e continuam retidas na medula, criando um meio necessário a sua sobrevivência (BELLAHCÈNE A, CASTRONO A, 1997).

É constituída por uma complexa interação celular, envolvendo células hematopoéticas, células estromais e células-tronco, além de uma rede sinusoidal capilar que interagem entre si. Não se conhece ainda os mecanismos intrínsecos dessa relação, medula/estroma/células circulantes, porém se sabe que há uma grande sensibilidade a fatores de crescimento, citocinas, fatores estimuladores de colônia entre outros, que permitem e estimulam não só a proliferação celular como também, vascular; o que torna a medula óssea um tecido propício ao desenvolvimento e manutenção de tumores metastáticos (ORAZI *et al*, 2006).

Pode ser infiltrada por células de diferentes origens, tanto em processos reacionais como em neoplasias de outros sítios. A infiltração pode ser focal, não apresentando alteração de sua função, como pode ser maciça comprometendo a sua função e gerando falência da hematopoese normal (ORAZI *et al*, 2006).

Metástases de neoplasias sólidas na medula são relativamente frequentes. Em adultos a maioria dos tumores metastáticos são carcinomas ou melanomas malignos, embora sarcomas possam raramente comprometê-la. Por ordem de frequência de comprometimento, as neoplasias malignas não hematológicas que mais comprometem a medula óssea são as de próstata, de mama, carcinoma de pulmão, neuroblastoma, sarcoma de Ewing/tumor neuroectodérmico periférico (PNET), rabdomiosarcoma e melanoma maligno (ANNER, 1977; PAPAC, 1994).

De acordo com Attilio Orazi, Dennis O'Malley e Daniel Arber, o uso rotineiro de técnica de imuno-histoquímica na avaliação de tumores metastáticos ou mesmo em medulas pós terapia anti-neoplásica não é necessário. Células tumorais metastáticas são usualmente grandes, apresentam-se agrupadas e têm grande associação com fibrose, apresentando ou não necrose (ORAZI, 2006).

A infiltração medular por células metastáticas promovem frequentemente reação estromal incluindo proliferação fibroblástica com deposição de reticulina apresentando colagenização ou não; neoangiogênese e reposta inflamatória; assim como algumas alterações ósseas (BAIN, 2010).

Fibrose corresponde à alteração arquitetural mais marcante e frequente em carcinomas mamários e da próstata, podendo corresponder a critério morfológico indireto de infiltração medular. Em pacientes com fibrose, o número de células tumorais é variável podendo ser até pouco frequente. A não visualização de células tumorais dentro do estroma fibroso pode resultar em erro diagnóstico de mielofibrose primária (BAIN, 2010).

Quando focos de fibrose estão presentes sem evidência morfológica de células tumorais, estudo imuno-histoquímico deve ser indicado para excluir células tumorais aprisionadas no estroma fibroso, contudo carcinomas lobulares da mama geralmente infiltra a medula óssea como pequenas células isoladas sem associação com fibrose e poderá facilmente não ser visualizada na coloração de rotina por HE (BITTER *et al*, 1994; LYDA *et al*, 2000).

## 2.13 CÂNCER DE MAMA E MEDULA ÓSSEA

A detecção de células tumorais na medula óssea (DTC) foi inicialmente descrita em 1981 (DEARNALEY, PH, 1981) e correlacionada com diversas neoplasias, onde posteriormente alguns estudos demonstraram a sua importância na avaliação do câncer de mama metastático (DIEL *et al*, 1996).

Vários estudos a partir de 1996 se desenvolveram predominantemente na Europa, com foco especial na Alemanha na tentativa de detectar células epiteliais na medula óssea de pacientes com câncer de mama.

A maioria dos trabalhos tinha objetivo inicial de diagnosticar estas células e foram testados vários métodos para esta detecção, onde começa também a surgir pesquisas relacionando a presença de células malignas em sangue periférico.

No final de 1999 e início de 2000, surgem publicações que expressam a preocupação em correlacionar os achados de micrometástases em MO com comprometimento de linfonodos axilares. A comunidade científica passa a questionar se a detecção de células tumorais (DTC) na medula tem valor prognóstico para pacientes com câncer de mama.

A partir de então, vários estudos têm demonstrado que a ocorrência de células citoqueratinas positivas na MO em pacientes com câncer de mama está associada a um prognóstico ruim, constituindo fator que indica recidiva precoce da doença (BISCHOFF *et al*, 2003).

O comprometimento da medula óssea está fortemente associado a metástases ósseas (76%), metástases viscerais (73%), assim como recidiva tumoral locorregional (62%). Isto sugere que a presença de células tumorais neste sítio reflete a capacidade que o tumor primário tem de metastatizar e que, estas células representam um marcador de doença sistêmica não limitada ao tecido ósseo. Nesta situação a terapia sistêmica adjuvante, pode ser considerada e poderia ter maior importância do que a dissecação linfonodal (DIEL *et al*, 1996).

Dr. Klaus Pantel, diretor do Instituto de Biologia Tumoral da Universidade de Hamburgo na Alemanha, iniciou um estudo em doença residual mínima, há mais de uma década, na busca de um marcador precoce e indicativo de doença sistêmica metastática. Em seu departamento, medulas ósseas eram rotineiramente testadas para micrometástases em leucemias e linfomas, favorecendo a utilização das mesmas técnicas para a detecção de células tumorais em MO de pacientes com câncer de mama.

Em 25 de agosto de 2005 foi publicado no *New England Journal of Medicine* uma pesquisa que envolveu 4.500 pacientes com câncer de mama, e concluiu que a presença de micrometástases na MO no momento do diagnóstico, está associada a um pior prognóstico (PANTEL, 2005).

Esta publicação destruiu a visão antiga do processo metastático como um desenvolvimento tardio no câncer, e traz uma nova era nas pesquisas das metástases, indicando que alguns tumores, mesmo pequenos, podem se disseminar e outros apresentam tendências à disseminação muito precoce, como é o caso dos tumores malignos da mama.

As pesquisas para detecção de células tumorais em sangue periférico se intensificam e verificou-se que estas células também estão presentes na corrente sanguínea de pacientes com neoplasia mamária maligna.

Em 2004, Cristofanilli, Hayes e seus colaboradores reportaram os níveis de células circulantes tumorais em pacientes com câncer de mama metastático, para iniciar um novo tratamento, como um preditor independente de progressão livre de doença e sobrevida global. Para ele, a medida e contagem dessas células no sangue, não é apenas uma nova medida tumoral, representa maior valor prognóstico do que a medida de um sítio metastático isolado

ou marcador tumoral. A presença das células no sangue, fala sobre a biologia da doença, e leva a considerar um tratamento personalizado (McBRIDE, 2005).

É importante citar que estas células isoladamente na corrente sanguínea, não representam fator preditor de mau prognóstico, embora indique progressão tumoral, e ficou evidenciada correlação entre presença de células circulantes tumorais em sangue periférico (CTC) e presença de micrometástases na medula óssea (ZHU L, 2005).

Os grandes centros em oncologia demonstraram que as sobrevidas das pacientes não aumentaram, mesmo àquelas que eram tratadas com quimioterapia agressiva como o Taxotere.

Os dados Europeus mostram que a medula óssea pode conter células tumorais inativas e que não são destruídas pela quimioterapia convencional, sendo necessário desenvolver novas estratégias terapêuticas para atuar especificamente nesta doença microscópica.

O sucesso da terapia adjuvante é baseado na habilidade de erradicação de metástases ocultas, assim como de células tumorais disseminadas, antes que elas se tornem clinicamente evidentes. Contudo, existe um subgrupo de pacientes que irão ter recorrência de doença independente do tratamento adjuvante convencional. Um objetivo importante das investigações em curso é identificar estas pacientes e oferecer um tratamento adjuvante secundário adequado (BECKER S, 2005).

Os regimes de terapias adjuvantes não são capazes de eliminar completamente as células citoqueratinas positivas na medula óssea (BECKER S, 2005), o que inviabiliza a cura efetiva das pacientes, podendo apresentar recorrência tumoral e morte.

Além do aumento significativo de metástases, o comprometimento medular pode também trazer implicações clínicas graves para as pacientes, como por exemplo, o desenvolvimento de aplasias medulares, complicação gravíssima para uma paciente que estará em um provável tratamento quimioterápico associado naturalmente a depleção imunológica (CAWTHORN TR *et al*, 2009).

O diagnóstico de aplasia medular por carcinomatose, muitas vezes é interpretada como efeito pós-quimioterapia, sendo indicado nestes casos, um transplante autólogo de medula óssea.

Um grupo médico nos Estados Unidos, em Los Angeles publicou um ensaio clínico em 2011, onde foram examinadas 3413 pacientes, com o objetivo de comparar micrometástases em linfonodos e medula, com a sobrevida de mulheres com câncer de mama

invasor. Este trabalho concluiu que pacientes com axila positiva tratadas com terapia conservadora, não alterou a relação da sobrevida global, enquanto que as pacientes com metástases ocultas em MO, embora raras, tiveram diminuição de sobrevida (GUILIANO, 2011).

Um fator de alerta ao analisar os dados numéricos, no estudo americano, embora realizado com um grande número de pacientes, obteve apenas 3% de positividade para micrometástases em MO, enquanto que os resultados europeus estão em torno de 30% em média, utilizando os mesmos métodos de detecção.

Para garantir a validação destes conceitos é necessário avaliar as técnicas utilizadas na detecção de micrometástases. Os trabalhos variam muito com relação aos métodos, onde a aspiração associada à imunocitoquímica com diversos marcadores correspondeu à maioria dos estudos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **Objetivo Geral:**

Avaliar a frequência da detecção de células tumorais em medula óssea, através do exame anatomopatológico complementado com técnica de imuno-histoquímica, utilizando o marcador citoqueratina 19, nas pacientes com diagnóstico de câncer de mama.

#### **Objetivos Específicos:**

Correlacionar os casos positivos com critérios indicadores de agressividade tumoral dos tumores primários como tamanho do tumor, grau histológico, grau nuclear, receptores hormonais (RE/RP), expressão do HER2/neu.

Observar a associação das micrometástases medulares com a expressão do p53, KI 67 e CD34 dos tumores primários.

Correlacionar a associação de micrometástases, com a presença e quantificação fibrose na medula, como critério indireto de infiltração neoplásica.



# MATERIAL E MÉTODOS

~~~~~

4. MATERIAL E MÉTODOS

Para a realização deste estudo utilizamos os seguintes preceitos e adotamos rigorosamente os métodos para atingir os objetivos finais.

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Em todo o estudo foi seguido os preceitos éticos determinados pelo Conselho Nacional de Saúde da Resolução 196/96 que regulamenta as diretrizes de pesquisa envolvendo seres humanos.

Este projeto foi encaminhado ao Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital do Câncer de Pernambuco para apreciação e parecer, tendo sido aprovado em 13/03/2011 de nº 48/2011 – CAAE 0037.0.447.172-11 (ANEXO A).

Obteve-se carta de anuência do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes, autorizando a execução da pesquisa para fins de dissertação (ANEXO B).

As pacientes foram convidadas para participar do estudo, o qual foi explicado detalhadamente a cada uma delas o propósito da pesquisa, e as mesmas assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (ANEXO C). É importante ressaltar que as informações, de caráter pessoal, são absolutamente sigilosas e não serão divulgadas em caso de publicações.

Foi esclarecido às pacientes que as mesmas terão acesso a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas.

As pacientes tiveram seu direito garantido de obter os resultados dos exames realizados, assim como, terão o resultado final desta pesquisa se assim desejar.

As coletas foram realizadas em ambiente hospitalar, dentro das normas de segurança e em acompanhamento médico, devendo ser enfatizado que não houve nenhum tipo de complicação e ou intercorrência, durante ou pós-procedimento.

Os benefícios que esta pesquisa propõe para as pacientes é o diagnóstico de possíveis micrometástases do câncer de mama na medula óssea, contribuindo diretamente para um melhor estadiamento da doença e propiciando ao oncologista clínico uma melhor avaliação do risco da paciente desenvolver metástases à distância no futuro ou mesmo recidiva tumoral.

As metástases, se não tratadas, podem provocar complicações e diminuir o tempo de vida livre de doença. No entanto, a avaliação da medula óssea ajudará ao médico adotar tratamentos mais eficientes visando o combate desta complicação.

Devemos também ressaltar que estas pacientes estão contribuindo diretamente para o desenvolvimento científico e o progresso da luta contra o câncer.

4.2 LOCAL DO ESTUDO

Este trabalho foi realizado no Hospital Universitário Professor Alberto Antunes (HUPAA) da Universidade Federal de Alagoas situado na Avenida Lourival Melo Mota, s/número, Tabuleiro dos Martins, Maceió-AL.

4.3 POPULAÇÃO DO ESTUDO

Critérios de inclusão: foram analisadas as medulas ósseas de mulheres com câncer de mama operável, assim como seu tecido mamário tumoral correspondente, de acordo com UICC - *International Union Against Cancer Criteria*, que concordaram em participar do estudo através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Critérios de exclusão: foram excluídos do presente estudo pacientes do sexo masculino, pacientes do sexo feminino que fizeram tratamento antineoplásico (quimioterapia e ou radioterapia prévia) antes da avaliação da medula óssea, e pacientes que não concordaram em participar da pesquisa.

4.4 PERÍODO DE REALIZAÇÃO

A coleta do material foi realizada no período de 01 de Abril a 31 de Outubro de 2012, onde foram sistematicamente avaliadas por três patologistas capacitados.

4.5 DESENHO DO ESTUDO

É um estudo prospectivo e analítico realizado por meio do material coletado e dados provenientes dos prontuários das pacientes.

4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO

Dependentes: Local do tumor, tamanho do tumor, número de linfonodos comprometidos, estadiamento patológico, tipo de procedimento cirúrgico das mamas, marcadores imuno-histoquímicos.

Independentes: idade, etnia, tipo histológico, grau histológico, lateralidade da mama, trama de fibrose da medula.

4.7 MÉTODOS DE COLETA

O estudo foi realizado com biópsias de medula óssea e peças cirúrgicas de mama, provenientes dos Serviços de Clínica Cirúrgica, Hematologia e Mastologia do Hospital Universitário – UFAL.

➤ Envio do material ao laboratório:

O material da medula óssea, assim como o produto cirúrgico do tumor da mama, foi encaminhado ao laboratório de anatomia patológica acompanhado da requisição médica e solicitação do histopatológico com as devidas informações clínicas, seguindo todo o protocolo de rotina do Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes.

➤ Material Obtido da Medula Óssea:

O material obtido de medula óssea foi fixado em formol neutro por 24hs, em temperatura ambiente seguido de descalcificação por 20 min em solução aquosa de ácido fórmico a 10%, e seguiu para processamento histológico de rotina (RILEY SR *et al*, 2004).

Os espécimes passaram por processo convencional para microscopia de luz, desidratados com etanol e diafanizados com xilol, sendo incluídos em parafina.

Os cortes foram obtidos com espessura de aproximadamente 3 micrômetros e foram corados pelos métodos de hematoxilina e eosina, Tricrômico de Gomory e Reticulina, além da

utilização do marcador imuno-histoquímico de citoqueratina 19 (ALVARENGA C, SCHIMIT F *et al*, 2011).

➤ Material Obtido do Tumor da Mama:

O produto da ressecção cirúrgica, que corresponde desde a biópsia por agulha grossa (“*Core biopsy*”), biópsias incisionais até a mastectomia total, ou seja, dos procedimentos mais conservadores aos radicais, foi cortado e devidamente fixado em formol tamponado a 10% por 12h. Posteriormente, seguiu-se o exame macroscópico da peça cirúrgica, seguindo os critérios postulados pela Sociedade Brasileira de Patologia (BACCHI, 2005) e Ministério da Saúde, através do programa SISMAMA (INCA, 2013).

Cortes histológicos foram obtidos para o exame histopatológico convencional e para a realização da técnica de imuno-histoquímica, utilizando os marcadores: receptor de estrógeno (MCLAREN BK *et al*, 2003), progesterona (LEAL,C *et al*,1995), Her2/neu (LEAL,C *et al*,1995), p53 (DAKO®, 2005), Ki-67 (DAKO®, 2005), CD-34 (DAKO®, 2005).

➤ Preparação dos cortes histológicos para exame imuno-histoquímico:

Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram montados em lâminas histológicas silanizadas e após 12 horas, colocados em estufa a 50° C por uma hora. Após essas etapas, foram desparafinizadas com xileno, hidratados em soluções decrescentes de álcool e lavados em água destilada.

As lâminas foram deixadas em solução detergente neutro 10% por 2 horas, lavadas em água corrente até retirar todo o excesso, e posteriormente, imersas sequencialmente em cubas com acetona:

- 1ª cuba: acetona P A (acetona para análise pura);
- 2ª cuba: silano (3-aminopropiltriethoxysilano) a 6% diluído em acetona P A;
- 3ª cuba: três mergulhos;
- 4ª cuba: três mergulhos;
- 5ª cuba: deixa um minuto e depois secar na estufa por 10 min.

➤ Recuperação antigênica

As lâminas com os cortes histológicos foram incubadas em tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos ou TRIS EDTA pH 9,0 a 95°C por uma hora em panela a vapor. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido.

➤ Reação imuno-histoquímica

1° Inibição da peroxidase endógena (lavagem com água destilada e oxigenada);

2° Colocação dos reagentes (anticorpos) monoclonal e /ou policlonal por 30 minutos. O anticorpo utilizado para receptor de estrógeno foi o clone ER-ID5 (DAKO®, 2005), para a citoqueratina 19 foi utilizado o clone RCK 108(DAKO®,2005) , o receptor de progesterona foi utilizado o clone PGR 636 (DAKO®,2005) , para a proteína do HER2/neu foi o POLICLONAL (DAKO®, 2005), para a proteína p53 foi o clone DO-7 (DAKO®,2005), para a proteína CD34 class II foi utilizado o clone QBEnd 10, para o Ki67 foi o clone MIB-1.(DAKO®,2005). Foi utilizada a técnica da Estreptavidina-Biotina-Marcada (LSAB+) ou Envision.

3° Lavagem em água destilada, contracoloração com hematoxilina, desidratação, montagem e leitura.

➤ Arquivamento do material examinado:

Após a interpretação das amostras coletadas, pelo pesquisador e por mais três Patologistas capacitados, o material foi arquivado no setor de Anatomia Patológica seguindo às regras de arquivamento de material biológico, preconizados pela Sociedade Brasileira de Patologia.

4.8 MÉTODOS DE ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados deste estudo foram analisados pelo pesquisador, em conjunto com um estatístico e orientador da pesquisa, utilizando estatística descritiva e análise inferencial, além de *Hardware* e *Software* específicos para a finalidade.

Para realização dos cálculos estatísticos, o *Hardware* utilizado foi um Desktop com as seguintes características:

- Intel® Core™ i3-2100 CPU @ 3.10GHz
- Memória RAM de 6,00 GB
- Sistema Operacional Windows 7 Enterprise de 64 Bits

O Software utilizado para a análise estatística descritiva e inferencial foi o:

- R Studio Versão 0.97.248.
- Plataforma R versão 2.15.2 (2012-10-26)
- ISBN 3-900051-07-0

Neste estudo os dados estatísticos para avaliar a positividade e ou a negatividade da medula óssea foram obtidos pela divisão do número total de casos positivos pelo número total de pacientes, em seguida avaliadas todas as variáveis citadas anteriormente, de maneira descritiva.

Para correlacionar as frequências de metástases, utilizou-se análise inferencial aplicando os seguintes testes:

- Teste de Proporções
- Teste Exato de Fisher.
- Teste do X^2

4.8.1 – Teste de Proporções

Tem por finalidade realizar a comparação entre duas proporções. No caso da pesquisa, a proporção encontrada de micrometástase em medula óssea na amostra, comparada com a proporção da Literatura.

Procedeu-se com um teste Bi-caudal ou Bilateral no qual, tenta-se obter como resposta a igualdade ou desigualdade das proporções.

O teste de hipóteses é descrito da seguinte forma:

- Hipótese Nula (H_0): $p = p_0$ (As proporções são iguais)
- Hipótese Alternativa (H_1): $p \neq p_0$ (As proporções são diferentes)

Na amostra analisada a comparação foi a seguinte, sendo a proporção da literatura de 3% de achados de micrometástases em um dos trabalhos selecionados:

- Hipótese Nula (H_0): $p = 0.05$ (As proporções são iguais);
- Hipótese Alternativa (H_1): $p \neq 0.05$ (As proporções são diferentes);

Concluimos que a proporção encontrada neste estudo é significativa e correspondeu a 3,2%.

4.8.2 – Teste Exato de Fisher e Teste do X^2

Tem por finalidade avaliar a existência de associação entre variáveis independentes, utilizando tabelas de contingência $c \times r$. No caso específico desta pesquisa a técnica será utilizada para comparar a existência ou não de associação entre a Presença ou Não de Micrometástases (MT) na medula óssea e as diversas características morfológicas e imuno-histoquímicas das amostras tissulares das neoplasias mamárias.

Procedeu-se com um teste Bi-caudal ou Bilateral na qual o teste de hipóteses é descrito da seguinte forma:

- Hipótese Nula (H_0): $p \neq p_0$ (Não existe associação entre as variáveis)
- Hipótese Alternativa (H_1): $p = p_0$ (Existe associação entre as variáveis)

Concluimos que não houve associação das demais variáveis com a presença de micrometástases.

5. RESULTADOS

Nossos resultados estão apresentados na forma de três artigos:

- 5.1 Primeiro artigo: Frequência de micrometástases em medula óssea e a associação com critérios de agressividade tumoral em pacientes com câncer de mama. Será submetido à revista *Breast Cancer Research*, fator de impacto de 5,25 e Qualis A1 em Medicina II.
- 5.2 Segundo artigo: A presença de micrometástases em medula óssea e a expressão do p53, KI67 e CD34 em seus respectivos tumores primários da mama. Será submetido à revista *Breast Cancer Research and Treatment*, fator de impacto de 4,431 e Qualis A1 em Medicina II.
- 5.3 Terceiro artigo: Fibrose em medula óssea como critério indireto morfológico, indicativo de micrometástases em carcinomas ductais da mama. Será submetido à revista *Journal of Pathology*, fator de impacto 6,318 e Qualis A1 em Medicina II.



PRIMEIRO ARTIGO

.....

5.1 PRIMEIRO ARTIGO

FREQUÊNCIA DE MICROMETÁSTASES EM MEDULA ÓSSEA E A ASSOCIAÇÃO COM CRITÉRIOS DE AGRESSIVIDADE TUMORAL EM PACIENTES COM CÂNCER DE MAMA

Resumo

Objetivos: Avaliar a frequência da detecção de células tumorais em medula óssea, através da biópsia com exame anatomo patológico complementada com técnica de imuno-histoquímica utilizando CK-19, nas pacientes com diagnóstico de câncer de mama, assim como, correlacionar os casos positivos com critérios indicadores de agressividade tumoral dos tumores primários como tamanho do tumor, grau histológico, grau nuclear, receptores hormonais (RE/RP), expressão do HER2/neu.

Material e Métodos: Biópsias de medula óssea foram obtidas de 32 pacientes do sexo feminino com câncer de mama. As amostras foram processadas dentro da rotina para microscopia de luz, coradas pela técnica do H&E, assim como complementada com técnica de imuno-histoquímica utilizando a Citoqueratina 19 como imunomarcador, além de correlacionada com características morfológicas do tumor primário e perfil imuno-histoquímico.

Resultados: 3% das 32 pacientes tiveram positividade na medula óssea para CK-19 indicando presença de micrometástases. Não foi encontrada associação entre a positividade da medula e os referidos critérios de agressividade tumoral.

Conclusão: Em nossa série concluímos que a positividade para células tumorais na medula óssea de pacientes com câncer de mama, não apresenta associação estatística com os critérios de agressividade tumoral como: tamanho do tumor, grau histológico, grau nuclear, receptores hormonais (RE/RP), expressão do HER2/neu, não podendo os mesmos corresponder à indicadores de micrometástases.

Palavras-chave: Neoplasias de mama. Medula Óssea. Metástases.

Abstract

Objectives: To assess the frequency of detection of tumor cells in bone marrow by biopsy and immunohistochemical techniques using CK-19, in patients with breast cancer, as well as the positive cases correlate with tumor aggressiveness criteria indicators of primary tumors as tumor size, histological grade, nuclear grade, hormone receptors (ER/PR), HER2/neu expression.

Material and Methods: Bone marrow biopsies were obtained from 32 female patients with breast cancer. The samples were processed in the routine light microscopy, stained by H&E, as complemented with a technique of immunohistochemical using cytokeratin 19 as a immuno marker, and correlated with immunohistochemical profile and morphological characteristics of the primary tumor.

Results: 3% of the 32 patients had positive bone marrow CK-19 indicating the presence of metastasis. We didn't observed correlations between positive marrow and primary tumor size, estrogen receptor and progesterone expression of HER2/neu.

Conclusion: In our study we conclude 3% positive for micro-metastases, there was no statistical association with tumor aggressiveness criteria such as tumor size, histological grade, nuclear grade, hormone receptor (ER/PR), HER2/neu expression, reaffirming the literature, emphasizing the need to evaluate the bone marrow of patientes with breast cancer as a routine procedure.

Keywords: Breast Neoplasms. Bone Marrow. Metastasis.

Introdução

Apesar dos avanços na prática oncológica, dos grandes esforços e pesquisas na Mastologia mundial, o câncer de mama continua sendo uma patologia com alta incidência de óbitos com taxas de decréscimo ao longo dos anos pouco significativas [1].

O combate à recorrência dos tumores primários, tanto sob a forma de metástases à distância, como recorrência locorregional, assim como, a busca por maior tempo livre de doença e maior sobrevida global, continua sendo um grande desafio na prática clínica.

Em torno de 25% dos pacientes pós-tratamento com aparente cirurgia curativa de carcinomas mamários apresentam recidiva tumoral e mesmo metástases à distância. É provável que este grupo de pacientes exibiam doença micrometastática no momento da terapêutica inicial e que provavelmente foram subestadiados [2].

Micrometástases têm sido evidenciadas em mais de 38% de pacientes com câncer de mama em estágios I e II [3], e está presente em medula óssea em torno de 1/3 das pacientes correspondendo a estágio I, II e III [4], indicando neste órgão, redução do tempo livre de doença e sobrevida global [3].

Vários estudos têm demonstrado células tumorais em medula óssea, assim como têm observado a associação com prognóstico do tumor [5,6]. A significância das micrometástases medulares relacionada a critério prognóstico foi confirmada por estudo com meta-análise [7] e seu impacto negativo tem sido descrito por diversos autores [8,9,10].

Uma análise conjunta envolvendo oito grandes estudos, com um número total de 4703 pacientes concluiu que a infiltração medular está associada a pior prognóstico, tanto em resultados clínicos como na sobrevida dos pacientes [11].

A presença de células tumorais representa fator prognóstico significativo de diminuição da sobrevida, tempo livre de doença e tempo livre de metástase à distância durante um período de seguimento de 10 anos. Em uma análise multivariável a positividade de medula óssea correspondeu a fator preditor independente de mal prognóstico [12].

É necessário enfatizar que a detecção da célula tumoral disseminada pode corresponder a uma ferramenta importante de avaliação de prognóstico, além de possibilitar a avaliação da terapia sistêmica [13,15].

Frequentemente observamos resistência de algumas células à quimioterapia [12] que enquanto permanecem na medula óssea apresentam-se muitas vezes em estado de dormência,

fora da atividade mitótica, conseqüentemente livres dos efeitos dos quimioterápicos anti-neoplásicos.

É possível detectar célula tumoral em pacientes pós- terapia antineoplásica. Regimes de tratamentos adjuvantes diminuem a quantidade de células malignas na medula, porém não são capazes de eliminar completamente estas células, sendo necessário, mais pesquisas e estudos prospectivos para que as micrometastases possam ser usadas como alvo na terapia adjuvante [17].

Diante do exposto, torna-se mandatório a investigação e a avaliação de medula óssea dos pacientes com câncer de mama, assim como o estudo de todos os possíveis critérios indicadores de presença de micrometástases.

Portanto em nossa série, avaliamos a presença de células tumorais em medula óssea e sua possível associação com critérios indicadores de agressividade tumoral, incorporados ao sistema de estadiamento da *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) [18], como tamanho do tumor, tipo e grau histológico, comprometimento linfonodal, receptores hormonais e expressão do HER2/neu, que correspondem aos mais fortes preditores de morte por câncer de mama.

Material e Métodos:

Pacientes: O presente estudo envolveu 32 pacientes do sexo feminino com câncer de mama, admitidas no Centro de Oncologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA), no período de 01 de abril a 31 de outubro de 2012. Todas as pacientes aceitaram participar do presente estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram avaliados e registrados os tumores primários de acordo com o sistema TNM [19], tamanho tumoral, número de linfonodos comprometidos, além de tipo histológico, grau histológico. A presença de receptores de estrógeno e progesterona foi determinada nos 32 casos pela técnica de imuno-histoquímica, assim como a expressão do HER2/neu.

Amostras de Medula Óssea: As amostras das medulas ósseas foram obtidas através do método de biópsia por agulha triphina, unilateral em crista ilíaca após indução da anestesia geral em 25 pacientes no momento da primeira cirurgia, enquanto que 7 pacientes foram obtidas de material formolizado encaminhado do serviço de hematologia do HUPAA/AL. As amostras foram fixadas em formol a 10% por 24 hs, em temperatura ambiente seguido de

descalcificação por 20 min em solução aquosa de ácido fórmico a 10%, e seguiu para processamento histológico de rotina. Os espécimes passaram por processo convencional para microscopia de luz, desidratados com etanol e diafanizados com xilol, sendo incluídos em parafina. Os cortes foram obtidos com espessura de aproximadamente 3 micrômetros e foram corados pelos métodos de hematoxilina e eosina, além da utilização do marcador imuno-histoquímico de citoqueratina 19 [20].

Amostras do tumor da mama: O produto da ressecção cirúrgica, que corresponde desde a biópsia por agulha grossa (“Core biopsy”), biópsias incisionais até a mastectomia total, ou seja, dos procedimentos mais conservadores aos radicais, foi cortado e devidamente fixado em formol a 10% por 12h. Posteriormente, seguiu-se o exame macroscópico da peça cirúrgica, seguindo os critérios postulados pela Sociedade Brasileira de Patologia [21] e Ministério da Saúde, através do programa SISMAMA [22]. Cortes histológicos foram obtidos para o exame histopatológico convencional e para a realização da técnica de imuno-histoquímica, utilizando os marcadores: receptor de estrógeno [23], progesterona [24], Her2/neu [24].

Preparação dos cortes histológicos para exame imuno-histoquímico: Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram montados em lâminas histológicas silanizadas e após 12 horas colocadas em estufa a 50° C por uma hora. Após essas etapas, foram desparafinizadas com xileno, hidratados em soluções decrescentes de álcool e lavados em água destilada. As lâminas foram deixadas em solução detergente neutro 10% por 2 horas, lavadas em água corrente até retirar todo o excesso, e posteriormente, imersas sequencialmente em cubas com acetona.

Recuperação antigênica: As lâminas com os cortes histológicos foram incubadas em tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos ou TRIS EDTA pH 9,0 a 95°C por uma hora em panela a vapor. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido.

Reação imuno-histoquímica: A imunomarcação inicialmente ocorreu através da peroxidase endógena e corada pelos anticorpos monoclonal e /ou policlonal por 30 minutos. O anticorpo utilizado para receptor de estrógeno foi o clone ER-ID5 [25], para o receptor de progesterona foi utilizado o clone PGR 636 [25], para a proteína do HER2/neu foi o POLICLONAL [25]. Foi utilizada a técnica da Estreptavidina-Biotina-Marcada (LSAB+) ou Envision. Seguiu a contracoloração com hematoxilina, desidratação, montagem e leitura.

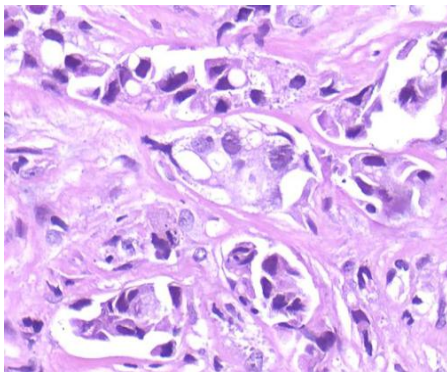
Análise do Material: O material foi analisado e observado por três Patologistas capacitados e interpretados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

Análise Estatística: Foi realizada uma análise estatística descritiva e inferencial utilizando o *software R Studio* Versão 0.97.248; **Plataforma R** versão 2.15.2 (2012-10-26), ISBN 3-900051-07-0. Os dados estatísticos para verificar a positividade e ou a negatividade da medula óssea foram obtidos pela divisão do número total de casos positivos pelo número total de pacientes. Em seguida foram avaliadas as variáveis de maneira descritiva. Para correlacionar as frequências de metástases, utilizou-se análise inferencial aplicando os seguintes testes: Teste de Proporções, Teste Exato de Fisher, Teste do X^2 . Procedeu-se com um teste Bi-caudal ou Bilateral no qual, tenta-se obter como resposta a igualdade ou desigualdade das proporções. O teste de hipóteses é descrito como: Hipótese Nula (H_0): $p = p_0$ (As proporções são iguais) e Hipótese Alternativa (H_1): $p \neq p_0$ (As proporções são diferentes).

Resultados:

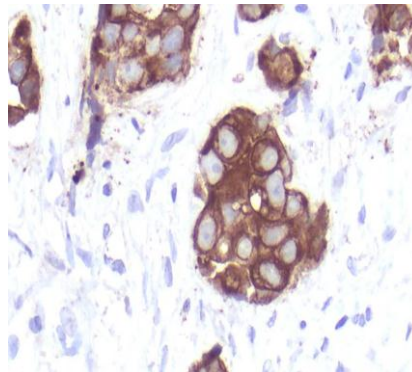
Foi identificado a presença de células tumorais no corte histológico corado pela H&E (Figura 1), onde foi confirmado com a expressão do marcador CK-19 (Figura 2) em uma paciente da série de 32 correspondendo a 3,1% de ocorrência de micrometástases em medula óssea. Não foi verificada associação entre a positividade e outras características das pacientes como, tamanho do tumor, tipo histológico, grau histológico, comprometimento de linfonodos, marcadores de estógeno e progesterona, expressão de HER2/neu. O valor p não foi estatisticamente significativo.

Figura 1: H&E micrometástases em MO



Fonte: Juliana Arôxa

Figura 2: CK 19 Positiva em MO



Fonte: Juliana Arôxa

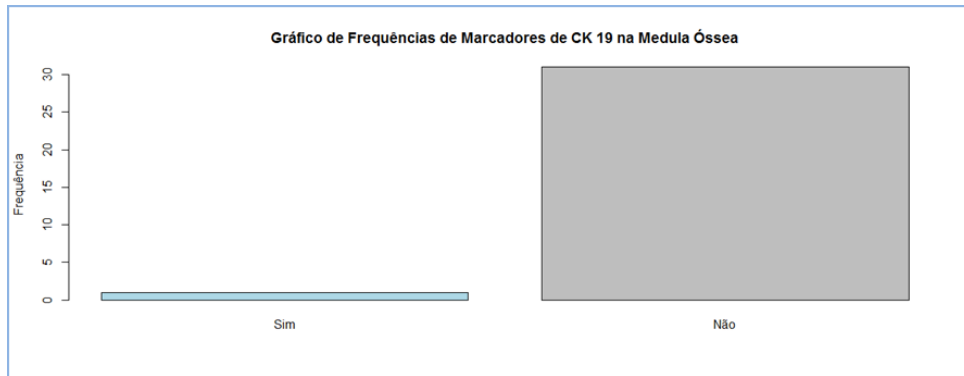
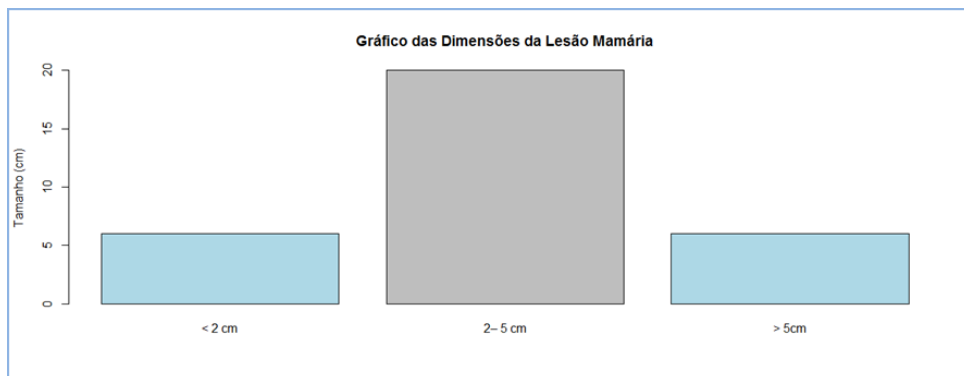
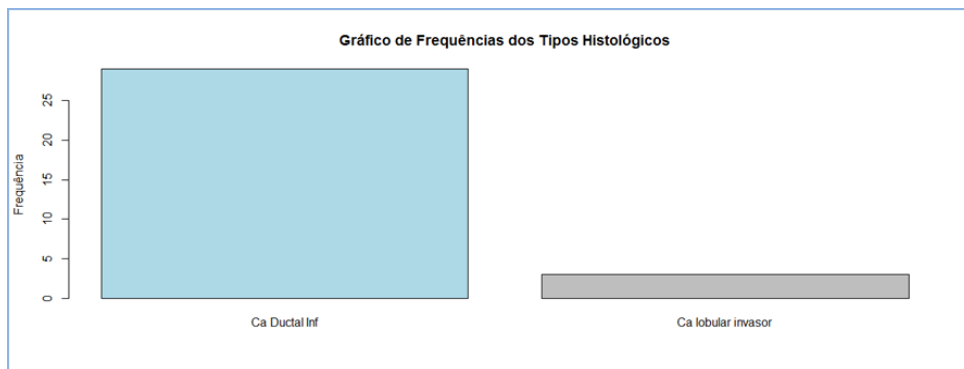
Gráfico 1: Frequência de marcadores CK19**Gráfico 2:** Frequência de tamanho tumoral**Gráfico 3:** Frequência de tipos histológicos

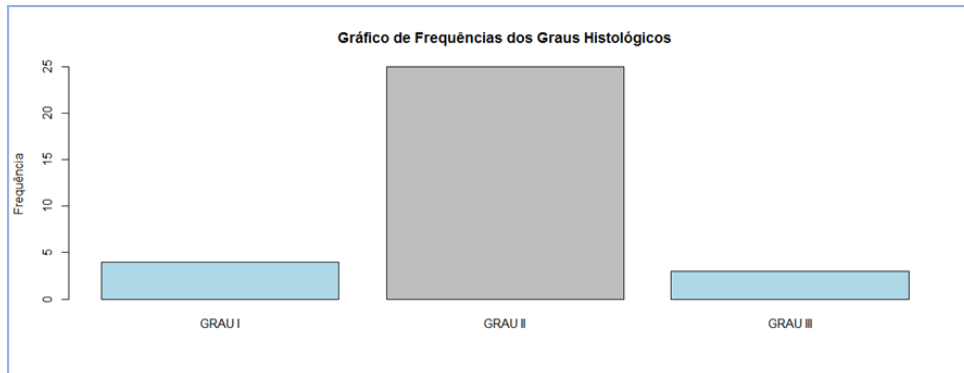
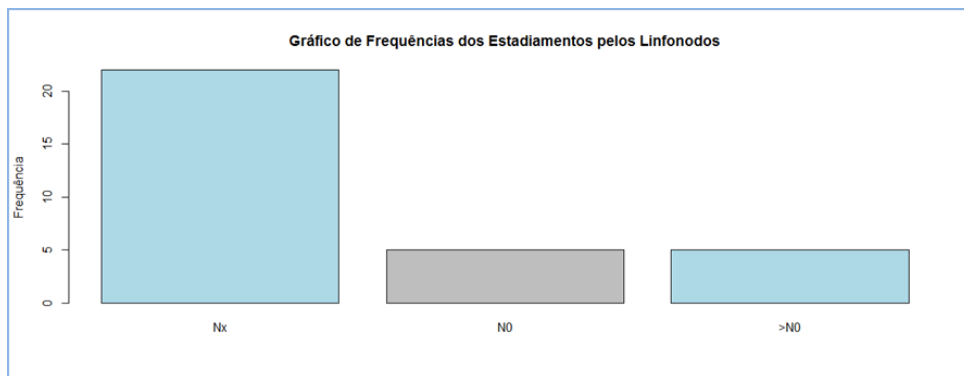
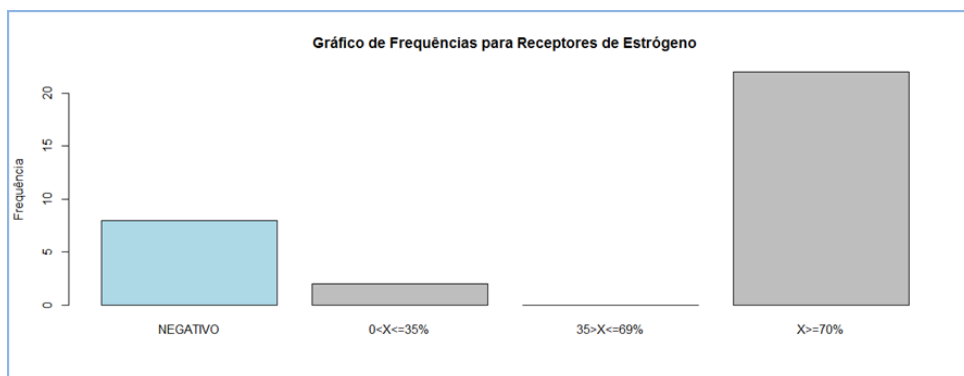
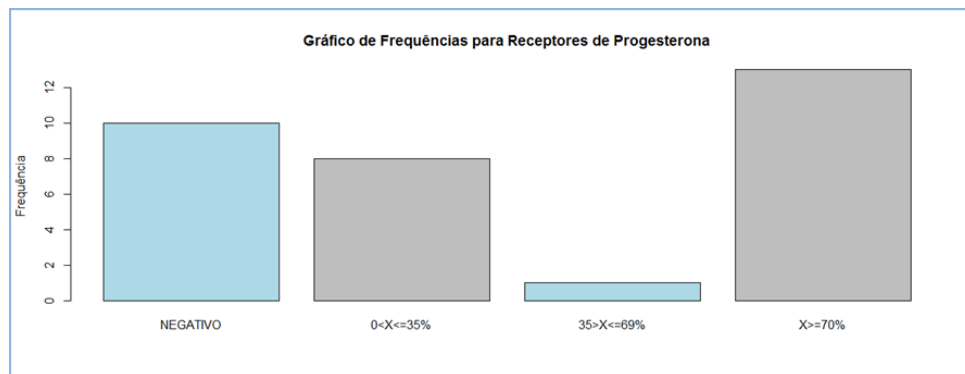
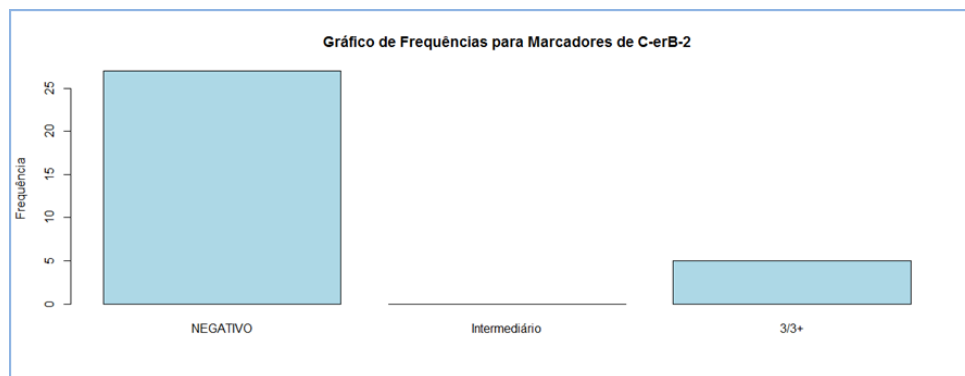
Gráfico 4: Frequência dos graus histológicos**Gráfico 5:** Frequência do comprometimento de linfonodos**Gráfico 6:** Frequência da expressão de estrogênio

Gráfico 7: Frequência da expressão de progesterona**Gráfico 8:** Frequência da expressão do HER2/neu**Tabela 1:** Associação micrometástases x tamanho do tumor

MICROMETÁSTASE	TAMANHO DA LESÃO			TOTAL
	<2 cm	2-5 cm	>5cm	
SIM	1	0	0	1
NÃO	5	20	6	31
TOTAL	6	20	6	32
p-valor Teste de Fisher		p-valor Teste do χ^2		
0.375		0.1068		

Tabela 2: Associação micrometástases x comprometimento de linfonodos

MICROMETÁSTASE	LINFONODOS			TOTAL
	Nx	N0	>N0	
SIM	0	1	0	1
NÃO	21	5	5	31
TOTAL	22	5	5	32
p-valor Teste de Fisher		p-valor Teste do X^2		
1.0		0.7909		

Tabela 3: Associação micrometástases x Tipo histológico.

MICROMETÁSTASE	TIPO HISTOLÓGICO		TOTAL
	Ca Ductal Inf	Ca lobular invasor	
SIM	1	0	1
NÃO	28	3	31
TOTAL	29	3	32
p-valor Teste de Fisher		p-valor Teste do X^2	
1.0		1.0	

Tabela 4: Associação micrometástases x Grau histológico

MICROMETÁSTASE	GRAU HISTOLÓGICO			TOTAL
	GRAU I	GRAU II	GRAU III	
SIM	0	1	0	1
NÃO	4	24	3	31
TOTAL	4	25	3	32
p-valor Teste de Fisher		p-valor Teste do X^2		
1.0		0.8654		

Tabela 5: Associação micrometástases x Estrógeno

MICROMETÁSTASE	ESTRÓGENO				TOTAL
	NEGATIVO	0<X<=35%	35>X<=69%	X>=70%	
SIM	0	0	0	1	1
NÃO	8	2	0	21	31
TOTAL	8	2	0	22	32
p-valor Teste de Fisher		p-valor Teste do X^2			
1.0		NA			

Tabela 6: Associação micrometástases x Progesterona

MICROMETÁSTASE	PROGESTERONA				TOTAL
	NEGATIVO	0<X<=35%	35>X<=69%	X>=70%	
SIM	0	1	0	0	1
NÃO	10	7	1	13	31
TOTAL	10	8	1	13	32
p-valor Teste de Fisher		p-valor Teste do X^2			
0.2813		0.3769			

Tabela 7: Associação micrometástases x HER2/neu

MICROMETÁSTASE	c-ERB-B-2			TOTAL
	NEGATIVO	INTERMEDIÁRIO	3/3+	
SIM	1	0	0	1
NÃO	26	0	5	31
TOTAL	27	0	5	32
p-valor Teste de Fisher		p-valor Teste do X^2		
1.0		NA		

Tabela 8: Comparação do p-valor nos Teste de Fisher x Teste X^2

Parâmetro	p-valor Teste Fisher	p-valor Teste do X^2
Idade	0,1563	0,134
Tamanho Tumoral	0,375	0,1068
Tipo Histológico	1	1
Grau Histológico	1	0,8654
Status linfonodal	1	0,7909
Estrógeno	1	NA
Progesterona	0,2813	0,3769
HER2/neu	1	NA

Discussão:

Neste trabalho avaliamos as medulas ósseas de pacientes com câncer de mama na tentativa de detectar células tumorais, utilizando a biópsia por agulha Thriphina e exame anatomopatológico com imuno-histoquímica, como método de detecção de micrometástases.

Os resultados obtidos corresponderam à mesma porcentagem dos achados do Guiliano e colaboradores publicados em 2011, que obteve 3% de positividade em uma série de 3474 pacientes [26], utilizando aspirado com imunocitoquímica, técnica recomendada e considerada padrão ouro para detecção [27].

A nossa amostra é muito homogênea, com tamanho tumoral predominante entre 2 e 5 cm (T2), grau histológico II, com alta positividade para estrógeno e progesterona, além de negatividade para expressão de HER2/neu, que de acordo com Lester, correspondem aos principais fatores prognósticos definidos pela AJCC [28].

De acordo com Tavassoli o tamanho tumoral representa o segundo fator prognóstico mais importante e é independente da condição do linfonodo. Todavia, o risco de metástases em linfonodos axilares, aumenta proporcionalmente ao tamanho do carcinoma [29]. Alvarenga defende que os subtipos histológicos têm importância prognóstica, sendo o carcinoma ductal invasor sem outras especificações o relacionado à menor tempo de sobrevida em 10 anos [30].

Pinotti ressalta que 85% das mulheres com tumores de grau I bem diferenciados, 60% com tumores de grau II moderadamente diferenciados e 15% das mulheres com tumores de grau III pouco diferenciados sobrevivem por 10 anos, seguindo o Sistema de Gradação Histológica de *Nottingham* modificada por Elston e Ellis [31].

Tumores com receptores hormonais (estrógeno e progesterona) positivos têm melhor prognóstico e vão obter benefícios com hormonioterapia [33,34], sendo indicativo de tumores mais indolentes, com menor velocidade de crescimento e maior período de sobrevida livre de doença [35,36].

Estudos também têm demonstrado que a super expressão do HER2/neu está associada a prognóstico ruim, porém a sua avaliação tem sido mais utilizada para determinar a resposta à terapia específica [37].

Assim de um modo geral, as pacientes de nosso estudo, estariam contidas em um grupo considerado de bom prognóstico. A paciente que detectamos positividade na medula

óssea, apresentou uma lesão mamária < 1 cm, positividade difusa para receptores de estrógeno e positividade focal para progesterona. Estes dados permitiria concluir que esta paciente estaria no grupo de excelente resultado. Trata-se de um tumor pequeno (T1), que possivelmente responderia bem a hormonioterapia, porém com micrometástase medular.

De acordo com Molino, não existe correlação entre a positividade da medula óssea com o tamanho tumoral, tipo histológico, grau histológico, definidos como marcadores de agressividade tumoral [38], o que correspondeu aos achados de nossa pesquisa que também não encontramos associação entre estas variáveis e a presença da micrometástase.

Quanto ao envolvimento linfonodal, Schindlbeck e a maioria dos autores não verificou associação, com exceção de Langer Igo que publicou em 2007 o primeiro estudo prospectivo na literatura e evidenciou associação estatística significativa entre a positividade do status de linfonodos e MO, embora a porcentagem de não concordância tenha sido levada em consideração [40].

Os nossos achados foram concordantes com Schindlbeck, onde também não encontramos associação estatística entre comprometimento de linfonodos e presença de células tumorais medulares. O mesmo autor, também não correlaciona *status* do HER2/neu e receptores hormonais, o que representou o mesmo resultado de nossa pesquisa [39].

Em outro trabalho, Stephan Braun observou que quando comparadas com mulheres sem micrometástases, as pacientes positivas apresentaram tumores grandes, com alto grau histológico, metastases linfonodais e receptores hormonais negativos, sendo o valor $p < 0,001$, para cada variável, o que representa significância. Porém em uma análise múltipla, avaliando inclusive o fator tempo, ou seja, relação com sobrevida, presença de micrometástases em medula óssea correspondeu ao critério de maior associação com menor tempo livre de doença e sobrevida global, independente dos tamanhos tumorais, graus e tipos histológicos, comprometimento de linfonodos, *status* dos receptores hormonais e HER2/neu, concluindo assim que a presença de células tumorais na medula óssea de pacientes com câncer de mama representa fator preditor independente de pior prognóstico [16].

Mansi *et al* (1999) pode demonstrar diminuição da sobrevida em pacientes com *follow up* de 12 anos, e Landys (1998) seguiu um protocolo de *follow up* de 20 anos e confirmou as hipóteses acima descritas [41,42].

Assim os resultados obtidos em nosso estudo são concordantes com as maiores publicações da literatura, onde encontramos células tumorais em medula óssea de pacientes

com câncer de mama, assim como não evidenciamos associação da positividade com as variáveis indicadoras de agressividade tumoral, o que nos permite concordar com o conceito descrito por Braun que doença residual mínima em medula óssea é fator preditor independente de mal prognóstico [16].

Fortalecidos pela idéia de que ainda não existe critério que possa indicar uma medula óssea comprometida, reforçamos a necessidade de avaliar este órgão em todas as pacientes com carcinomas mamários.

Defendemos ainda a implantação de grandes estudos sob este tema, existindo uma necessidade real de determinar o verdadeiro significado da presença de células tumorais em medula óssea, assim como identificar melhores possibilidades de detectá-las, sendo importante despertar interesse da comunidade científica com objetivo de alcançar maiores conhecimentos no processo metastático da carcinogênese mamária, tornando possível à sobrevivência ao câncer de mama.

Referências:

1. Instituto Nacional do Câncer. Estimativas do câncer de mama no Brasil 2012. <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>
2. Kell MR, Winter DC, O'Sullivan GC, Shanahan F, Redmond HP. Biological behaviour and clinical implications of micrometastases. *Br J Surg.* 2000 Dec;87(12):1629-39.
3. Cote RJ, Rosen PP, Lesser ML, Old LJ, Osborne MP. Prediction of early relapse in patients with operable breast cancer by detection of occult bone marrow micrometastases. *J Clin Oncol.* 1991 Oct;9(10):1749-56.
4. Braun S, Auer D, Marth C. The prognostic impact of bone marrow micrometastases in women with breast cancer. *Cancer Invest.* 2009 Jul;27(6):598-603. doi: 10.1080/07357900802574496. Review.
5. Mansi JL, Easton D, Berger U, Gazet JC, Ford HT, Dearnaley D, Coombes RC. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *Eur J Cancer.* 1991;27(12):1552-5.

6. Solomayer EF, Diel IJ, Salanti G, Hahn M, Gollan C, Schütz F, Bastert G. Time independence of the prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clin Cancer Res.* 2001 Dec;7(12):4102-8.
7. Funke I, Schraut W. Meta-analyses of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *J Clin Oncol.* 1998 Feb;16(2):557-66.
8. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 2001 Aug 15;19(16):3669-74.
9. Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol.* 2001 Feb 15;19(4):960-71.
10. Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Sep 15;21(18):3469-78.
11. Braun S, Vogl FD, Naume B, Janni W, Osborne MP, Coombes RC, Schlimok G, Diel IJ, Gerber B, Gebauer G, Pierga JY, Marth C, Oruzio D, Wiedswang G, Solomayer EF, Kundt G, Strobl B, Fehm T, Wong GY, Bliss J, Vincent-Salomon A, Pantel K. A pooled analysis of bone marrow micrometastasis in breast cancer. *N Engl J Med.* 2005 Aug 25;353(8):793-802.
12. Braun S, Auer D, Marth C. The prognostic impact of bone marrow micrometastases in women with breast cancer. *Cancer Invest.* 2009 Jul;27(6):598-603. doi: 10.1080/07357900802574496. Review.
13. Thurm H, Ebel S, Kentenich C, Hemsén A, Riethdorf S, Coith C, Wallwiener D, Braun S, Oberhoff C, Jänicke F, Pantel K. Rare expression of epithelial cell adhesion molecule on residual micrometastatic breast cancer cells after adjuvant chemotherapy. *Clin Cancer Res.* 2003 Jul;9(7):2598-604.
14. Pantel K, Felber E, Schlimok G. Detection and characterization of residual disease in breast cancer. *J Hematother.* 1994 Winter;3(4):315-22. Review.
15. Schlimok G, Pantel K, Loibner H, Fackler-Schwalbe I, Riethmüller G. Administered monoclonal antibody: towards a novel surrogate test to monitor adjuvant therapies of solid tumours. *Eur J Cancer.* 1995 Oct;31A(11):1799-803.

16. Braun M, Jacobs VR, Wagenpfeil S, Sattler D, Harbeck N, Nitz U, Bernard R, Kuhn W, Ihbe-Heffinger A. Cost analysis comparing an anthracycline/docetaxel regimen to CMF in patients with early stage breast cancer. *Onkologie*. 2009 Sep;32(8-9):473-81. doi: 10.1159/000226211. Epub 2009 Jul 27.
17. Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 May;97(1):91-6. Epub 2005 Dec 1.
18. AJCC/World Health Organization. Breast Cancer. Incidência de Câncer de Mama no Mundo (Texto na Internet). Fevereiro, 2011. <
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>
19. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch, CM, Haller DG, Morrow, M. *AJCC Cancer Staging Manual*, 6ª ed. New York: Springer Verlag, 2002.
20. Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, Schmitt F. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2011 Jun;64(6):493-7. doi: 10.1136/jcp.2011.089862. Epub 2011 Mar 22.
21. Bacchi CE, Almeida PC, Franco M. *Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos Sociedade Brasileira de Patologia*. São Paulo. Reichmann e Autores Editores, 2005.
22. Instituto Nacional do Câncer. Programa Nacional do controle do câncer de mama. 2013. <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/aco/programas/site/home/nobrasil%20programa_controle_cancer_mama/>
23. Regan MM, Price KN, Giobbie-Hurder A, Thürlimann B, Gelber RD. International Breast Cancer Study Group and BIG 1-98 Collaborative Group. Interpreting Breast International Group (BIG) 1-98: a randomized, double-blind, phase III trial comparing letrozole and tamoxifen as adjuvant endocrine therapy for postmenopausal women with hormone receptor-positive, early breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2011 May 26;13(3):209. doi: 10.1186/bcr2837. Review.
24. Leal CB, Schmitt FC, Bento MJ, Maia NC, Lopes CS. Ductal carcinoma in situ of the breast. Histologic categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormone receptors, p53, and c-erbB-2 protein. *Cancer*. 1995 Apr 15;75(8):2123-31.
25. Dako®, 2005, *Leading de way in cancer diagnosis*. <http://www.dako.com/28829_connection_14.pdf>

26. Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV, Whitworth PW, Blumencranz PW, Reintgen DS, Morrow M, Leitch AM, Hunt KK, McCall LM, Abati A, Cote R. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. *JAMA*. 2011 Jul 27;306(4):385-93. doi: 10.1001/jama.2011.1034.
27. Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol*. 2008 May;61(5):570-6. Epub 2007 Nov 23. Review.
28. Lester S. Capítulo 23 Mama. Em: Bases Patológicas das Doenças. Robbins e Cotran. Patologia, p 1181-1202. 2006.
29. Tavassoli F. Chapter 1. Normal Development and Anomalies. In: Pathology of the Breast. p 1-23. 1992.
30. Alvarenga M. Tumores da mama. In: BILLIS, A.V.J.(editor) Patologia Diagnóstica de Tumores. 2 Ed. Campinas, p. 295-340, 2010.
31. Pinotti JA. Câncer de Mama inicial. São Paulo: BYK; capítulo 3; pág. 61, 2003.
32. Pinotti JA. Câncer de Mama inicial. São Paulo: BYK; capítulo 4; pág. 80-1, 2003.
33. Clark GM, McGuire WL. New biologic prognostic factors in breast cancer. *Oncology*; 3:49-54, 1989. < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2578003> >
34. Hurshaut Y, Pressman P. Breast cancer: The complete guide. New York: Bontom; 1996.
35. Einsenberg AJA, Koifman S. Câncer de mama: marcadores tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*, Rio de Janeiro, v.47, n.4, p.377-388, 2001.
36. Allemani C, Sant M, Berrino F, Aareleid T, Chaplain G, Coebergh JW, Colonna M, Contiero P, Danzon A, Federico M, Gafà L, Grosclaude P, Hédelin G, Macè-Lesech J, Garcia CM, Paci E, Raverdy N, Tretarre B, Williams EM. Prognostic value of morphology and hormone receptor status in breast cancer - a population-based study. *Br J Cancer*. 2004 Oct 4;91(7):1263-8.
37. Lakhani S, Ellis I, Schnitt S, Tan P, Van de Vijver M. Who Classification of Tumours of the Breast. 4 Ed. Lyon: IARC, 2012.

38. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, Fattovich G, Alaimo C, Piubello Q, Pavanel F, Micciolo R, Cetto GL. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Jan;42(1):23-30.
39. Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S, Friese K. Comparative analysis between the HER2 status in primary breast cancer tissue and the detection of isolated tumor cells in the bone marrow. *Breast Cancer Res Treat.* 2004 Sep;87(1):65-74.
40. Langer I, Guller U, Koechli OR, Berclaz G, Singer G, Schaer G, Fehr MK, Hess T, Oertli D, Bronz L, Schnarwyler B, Wight E, Uehlinger U, Infanger E, Burger D, Zuber M; Swiss Multicenter Sentinel Lymph Node Study Group in Breast Cancer. Association of the presence of bone marrow micrometastases with the sentinel lymph node status in 410 early stage breast cancer patients: results of the Swiss Multicenter Study. *Ann Surg Oncol.* 2007 Jun;14(6):1896-903. Epub 2007 Mar 14.
41. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet.* 1999 Jul 17; 354(9174):197-202.
42. Landys K, Persson S, Kovarík J, Hultborn R, Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 May;49(1):27-33.



SEGUNDO ARTIGO

~~~~~

## 5.2 SEGUNDO ARTIGO

### A PRESENÇA DE MICROMETÁSTASES EM MEDULA ÓSSEA E A EXPRESSÃO DO P53, KI67 E CD 34 EM SEUS RESPECTIVOS TUMORES PRIMÁRIOS DA MAMA.

#### Resumo

**Objetivos:** Observar a associação de micrometástases em medula óssea de pacientes com câncer de mama, detectada através da biópsia com exame anatomopatológico e técnica de imuno-histoquímica utilizando CK-19, com a expressão do p53, KI 67 e CD34 dos tumores primários.

**Material e Métodos:** Biópsias de medula óssea foram obtidas de 32 pacientes do sexo feminino com câncer de mama. As amostras foram processadas dentro da rotina para microscopia de luz, coradas pela técnica do H&E, , assim como complementada com técnica de imuno-histoquímica utilizando a Citoqueratina 19 como imunomarcador, além de correlacionada com a expressão de p53, ki67 e CD34 do tumor primário.

**Resultados:** 3% das 32 pacientes tiveram positividade na medula óssea para CK-19 indicando presença de micrometastases. Não foi encontrada associação entre a positividade da medula e a expressão do p53, Ki67, CD 34.

**Conclusão:** A positividade para micrometástases, não apresentou associação estatística com a expressao do p53, ki 67 e CD34 do tumor primário.

**Palavras-chave:** Neoplasias de mama. Medula óssea. Metástases.

## Abstract

**Objectives:** To observe the association of micrometastases in bone marrow of patients with breast cancer detected by biopsy with histology and immunohistochemistry technique using CK-19, with the expression of p53, Ki 67 and CD34 of primary tumors.

**Material and Methods:** Bone marrow biopsies were obtained from 32 female patients with breast cancer. The samples were processed in the routine light microscopy, stained by H&E, as well as supplemented by the technique of immunohistochemistry using cytokeratin 19 as immunohistochemical marker, and correlated with expression of p53, Ki67 and CD34 of primary tumor.

**Results:** 3% of the 32 patients had positive bone marrow CK-19 indicating the presence of micrometastases. No association was found between positive marrow and expression of p53, Ki67, CD34 of primary tumor.

**Conclusion:** The presence of micrometastases in bone marrow, showed no statistical association with the expression of p53, Ki67 and CD34 primary tumor.

**Keywords:** Breast neoplasms. Bone marrow. Metastasis.

## Introdução

O envolvimento da medula óssea na disseminação do câncer de mama tem sido estudado nas últimas décadas, sendo um tema de pesquisa muito promissor.

Braun e colaboradores (2000) mostraram que a presença de células tumorais disseminadas em medula tem significado clínico e representam fator indicador de redução de tempo livre de doença e diminuição de sobrevida global em todos os estágios do câncer de mama [1].

Mansi *et al* (1999) pode demonstrar diminuição da sobrevida em pacientes com *follow up* de 12 anos, e Landys (1998) seguiu um protocolo de *follow up* de 20 anos e confirmou as hipóteses acima descritas [2,3].

O impacto prognóstico negativo das células tumorais disseminadas pode ser confirmado por diversos autores [4,5,6], que trouxeram juntos o resultado de um múltiplo estudo realizado em oito centros Europeus, confirmando que a detecção de células tumorais em medula óssea não apenas tem impacto no início do diagnóstico, como também, quando são detectadas no seguimento da doença [7] ou mesmo após completa quimioterapia adjuvante [8].

Os regimes de terapias adjuvantes não são capazes de eliminar completamente as células tumorais na medula óssea [9], inviabilizando a cura efetiva das pacientes, podendo apresentar recorrência tumoral e morte.

Com estes dados, torna-se imperativo, maiores pesquisas e a busca das micrometástases nas pacientes com câncer de mama, assim como todas as possíveis associações indicativas diretas ou indiretas de infiltração medular.

Estudos têm demonstrado que não existe correlação da presença de micrometástases em MO com indicadores de agressividade tumoral como tipo histológico, tamanho do tumor [10], envolvimento linfonodal, status do HER2/neu e receptores hormonais do tumor primário [11].

Outros marcadores tumorais, como o KI67, p53 e CD34 têm sido foco de muitas pesquisas e demonstrados em tumores agressivos, embora não exista ainda consenso para sua utilização prática, devido às limitações de execução e interpretação, visão endossada pela ASCO 2007 [12].

O antígeno Ki 67 é uma proteína nuclear, que preferencialmente se expressa durante todas as fases do ciclo celular, G1, S, G2 e fase M, porém está ausente em células em fase G0 [13]. Durante a interfase o antígeno pode ser detectado exclusivamente dentro do núcleo, enquanto que na maioria das mitoses muitas proteínas são relocadas para a superfície dos cromossomos. O antígeno é rapidamente degradado à medida que as células entram em estado não proliferativo [14] e geralmente não se expressam durante o processo de reparação do DNA. Os estudos mostram que alta expressão do Ki67 está correlacionada com pior prognóstico [15,16], indicando maior atividade mitótica e consequentemente maior índice proliferativo da neoplasia.

A proteína p53 é uma fosfoproteína nuclear com peso molecular de 53 Kda e pode estar presente numa variedade de células normais, porém tem meia vida curta e só está presente por alguns minutos. O gene p53 mutante é frequentemente encontrado no desenvolvimento de carcinomas mamários e devido a esta mutação, a proteína se torna mais estável podendo ser acumulada em altos níveis sendo observado o seu acúmulo em 76% de 212 neoplasias malignas humanas. Inibe a replicação do DNA e é molécula de controle de *check-points* para a progressão do ciclo, além de também está envolvido na regulação de apoptose [17]. Corresponde a um gen supressor tumoral comumente mutado, e são detectados na rotina diagnóstica da patologia cirúrgica mamária pela técnica de imuno-histoquímica, que quando se apresenta fortemente corado é interpretado como positivo, enquanto que nas marcações discretas, são considerados negativos.

A superexpressão do p53 nos carcinomas de mama está associada à pior prognóstico. A maioria dos cânceres de mama têm demonstrado forte imunoreatividade de p53 mutante, predominante em subtipos basais. A utilidade clínica da avaliação do p53 em tumores não basais ainda não está muito bem definida [18]. No entanto um estudo mostrando anormalidade no p53 demonstrou associação à pior prognóstico e que deleções/mutações do p53 foram particularmente de valor prognóstico em pacientes com linfonodos negativos e com receptores estrogênicos positivos [19].

Embora existam estas observações, na prática médica ainda é insuficiente à recomendação da avaliação do p53 na rotina e no manejo de pacientes com câncer de mama, assim como foi definido em 2007 ASCO/CAP [20,21].

O CD34 é uma proteína de cadeia única com aproximadamente 116kDa, que se expressa em células hematogênicas imaturas ou células progenitoras, células endoteliais de capilares, fibroblastos embriônicos, além raras células gliais [22].

Corresponde a um potencial indicador de diferenciação vascular, sendo altamente sensível a célula endotelial diferenciada, independente do grau tumoral. Não obstante a especificidade deste marcador é um problema podendo estar presente com frequência em tumores vasculares e devendo ser utilizado para o diagnóstico diferencial com estes tumores [23, 24].

Nosso estudo teve como objetivo, avaliar a associação da expressão destes marcadores (KI67, p53 e CD34) em tumores primários da mama, com a presença de micrometástases na medula óssea.

## **Material e Métodos**

**Pacientes:** O presente estudo envolveu 32 pacientes do sexo feminino com câncer de mama, admitidas no Centro de Oncologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA), no período de 01 de abril a 31 de outubro de 2012. Todas as pacientes aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foi avaliada através da técnica de imuno-histoquímica, a expressão do p53, Ki-67 e CD 34.

**Amostras de Medula Óssea:** As amostras das medulas ósseas foram obtidas através do método de biópsia por agulha triphina, unilateral em crista ilíaca após indução da anestesia geral em 25 pacientes no momento da primeira cirurgia, enquanto que 7 pacientes foram obtidas de material formolizado encaminhado do serviço de hematologia do HUPAA/AL. As amostras foram fixadas em formol a 10% por 24 hs, em temperatura ambiente seguido de descalcificação por 20 min em solução aquosa de ácido fórmico a 10%, e seguiu para processamento histológico de rotina.

Os espécimes passaram por processo convencional para microscopia de luz, desidratados com etanol e diafanizados com xilol, sendo incluídos em parafina. Os cortes foram obtidos com espessura de aproximadamente 3 micrômetros e foram corados pelos métodos de hematoxilina e eosina, além da utilização do marcador imuno-histoquímico de citoqueratina 19 [25].



**Amostras do tumor da mama:** O produto da ressecção cirúrgica, que corresponde desde a biópsia por agulha grossa (“Core biopsy”), biópsias incisionais até a mastectomia total, ou seja, dos procedimentos mais conservadores aos radicais, foi cortado e devidamente fixado em formol a 10% por 12h. Posteriormente, seguiu-se o exame macroscópico da peça cirúrgica, seguindo os critérios postulados pela Sociedade Brasileira de Patologia [26] e Ministério da Saúde, através do programa SISMAMA [27]. Cortes histológicos foram obtidos para o exame histopatológico convencional e para a realização da técnica de imuno-histoquímica, utilizando os marcadores: p53 [28], Ki-67 [28], CD-34 [28].

**Preparação dos cortes histológicos para exame imuno-histoquímico:** Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram montados em lâminas histológicas silanizadas e após 12 horas colocadas em estufa a 50° C por uma hora. Após essas etapas, foram desparafinizadas com xileno, hidratados em soluções decrescentes de álcool e lavados em água destilada. As lâminas foram deixadas em solução detergente neutro 10% por 2 horas, lavadas em água corrente até retirar todo o excesso, e posteriormente, imersas sequencialmente em cubas com acetona.

**Recuperação antigênica:** As lâminas com os cortes histológicos foram incubadas em tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos ou TRIS EDTA pH 9,0 a 95°C por uma hora em panela a vapor. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido.

**Reação imuno-histoquímica:** A imunomarcação inicialmente ocorreu através da peroxidase endógena e coradas pelos anticorpos monoclonal e /ou policlonal por 30 minutos. O anticorpo utilizado para a proteína p53 foi o clone DO-7 [28], para a proteína CD34 class II foi utilizado o clone QBEnd 10 [28], para o Ki67 foi o clone MIB-1 [28]. Foi utilizada a técnica da Estreptavidina-Biotina-Marcada (LSAB+) ou Envision. Seguiu a contracoloração com hematoxilina, desidratação, montagem e leitura.

**Análise do Material:** O material foi analisado e observado por três Patologistas capacitados e interpretados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

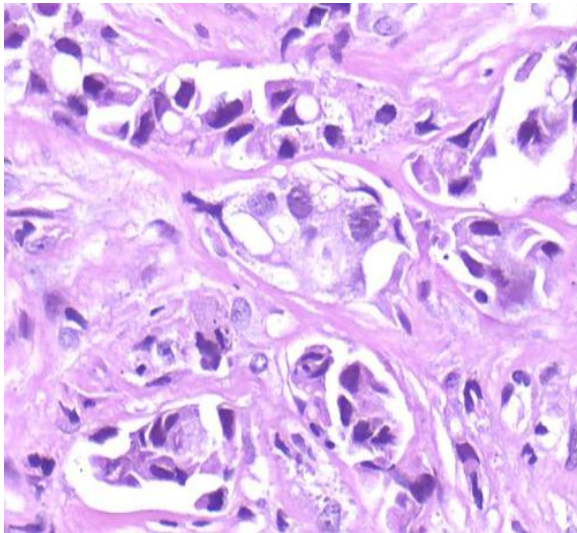
**Análise Estatística:** Foi realizada uma análise estatística descritiva e inferencial utilizando o *software R Studio* Versão 0.97.248; **Plataforma R** versão 2.15.2 (2012-10-26), ISBN 3-900051-07-0. Os dados estatísticos para verificar a positividade e ou a negatividade da medula óssea foram obtidos pela divisão do número total de casos positivos pelo número total de pacientes. Em seguida foram avaliadas as variáveis de maneira descritiva. Para

correlacionar as frequências de metástases, utilizou-se análise inferencial aplicando os seguintes testes: Teste de Proporções, Teste Exato de Fisher, Teste do  $X^2$ . Procedeu-se com um teste Bi-caudal ou Bilateral no qual, tenta-se obter como resposta a igualdade ou desigualdade das proporções. O teste de hipóteses é descrito como: Hipótese Nula ( $H_0$ ):  $p = p_0$  (As proporções são iguais) e Hipótese Alternativa ( $H_1$ ):  $p \neq p_0$  (As proporções são diferentes).

## Resultados

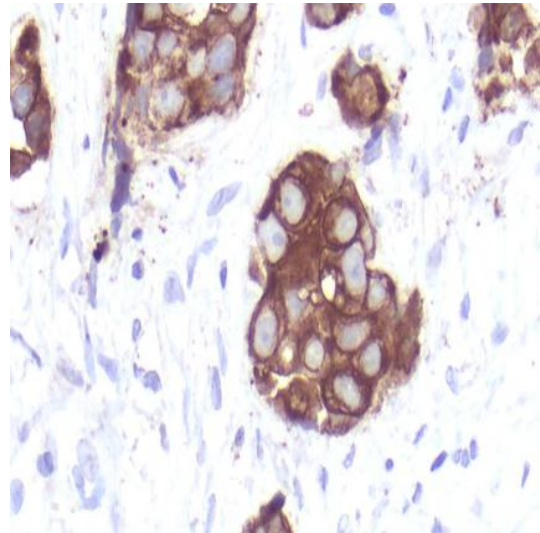
Foi identificado presença de células tumorais no corte histológico corado pela H&E (Figura 1) e confirmado com a expressão do marcador para CK-19 (Figura 2) em uma paciente da série de 32 correspondendo a 3,125% de ocorrência de micrometástases em medula óssea. Não foi verificada associação entre a positividade e expressão de p53, Ki67 e CD34 do tumor primário. O valor p não foi estatisticamente significante.

**Figura 1:** H&E micrometástases em MO



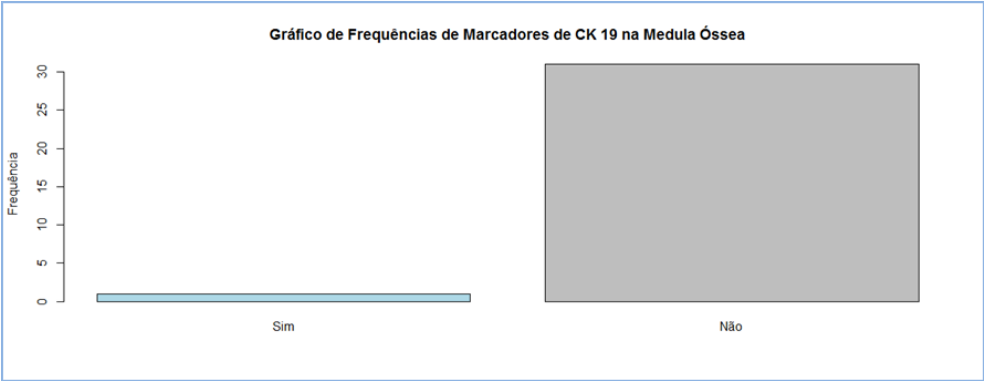
Fonte: Juliana Arôxa.

**Figura 2:** CK 19 Positiva em MO

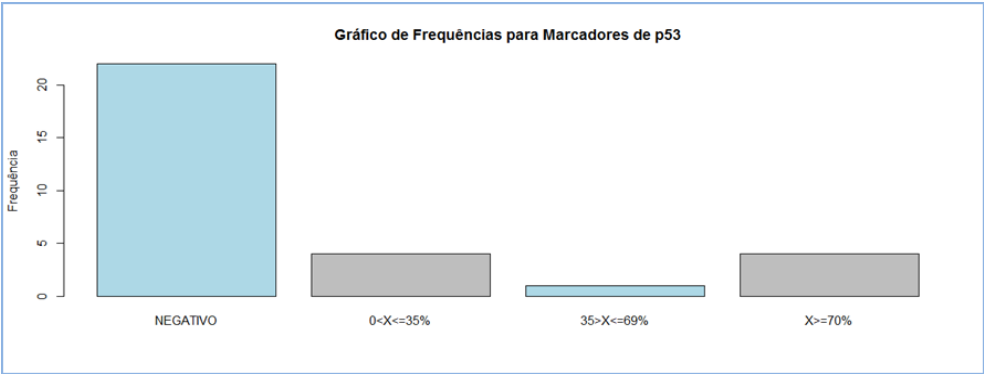


Fonte: Juliana Arôxa

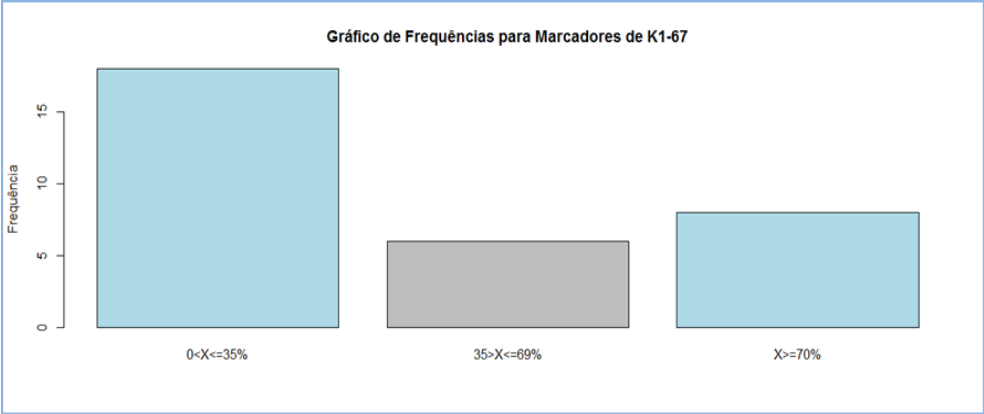
**Gráfico 1:** Frequência de micrometástases na medula (CK positiva)

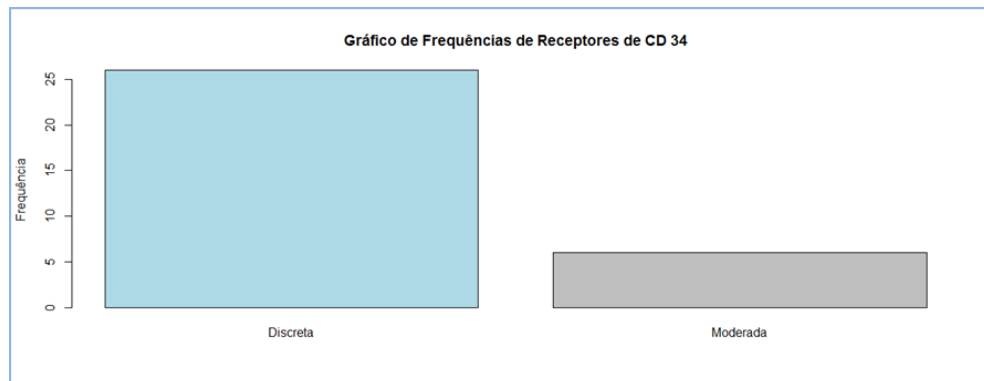


**Gráfico 2:** Frequência para marcadores de p53



**Gráfico 3:** Frequência de expressão Ki 67



**Gráfico 4:** Frequência para marcadores de CD34**Tabela 1:** Correlação p-valor Teste de Fisher x Teste do  $\chi^2$ 

| Parâmetro | Teste de Fisher | p-valor Teste do $\chi^2$ |
|-----------|-----------------|---------------------------|
| Ki-67     | 0,4375          | 0,2126                    |
| P53       | 1               | 0,9355                    |
| CD34      | 1               | 1                         |

Análise Inferencial:

**Gráfico 5:** Micrometástases x marcador p53

| MICROMETÁSTASE          | p53      |                           |           |        | TOTAL |
|-------------------------|----------|---------------------------|-----------|--------|-------|
|                         | NEGATIVO | 0<X<=35%                  | 35>X<=69% | X>=70% |       |
| SIM                     | 1        | 0                         | 0         | 0      | 1     |
| NÃO                     | 21       | 4                         | 1         | 4      | 30    |
| TOTAL                   | 22       | 4                         | 1         | 4      | 31    |
| p-valor Teste de Fisher |          | p-valor Teste do $\chi^2$ |           |        |       |
| 1.0                     |          | 0.9355                    |           |        |       |

**Gráfico 6:** Micrometástases x marcador Ki-67

| MICROMETÁSTASE          | Ki-67   |                           |       | TOTAL |
|-------------------------|---------|---------------------------|-------|-------|
|                         | 0<X≤35% | 35>X≤69%                  | X≥70% |       |
| SIM                     | 0       | 0                         | 1     | 1     |
| NÃO                     | 18      | 6                         | 7     | 31    |
| TOTAL                   | 18      | 6                         | 8     | 32    |
| p-valor Teste de Fisher |         | p-valor Teste do $\chi^2$ |       |       |
| 0.4375                  |         | 0.2126                    |       |       |

**Gráfico 7:** Micrometástases x marcador CD34

| MICROMETÁSTASE          | CD 34    |                           | TOTAL |
|-------------------------|----------|---------------------------|-------|
|                         | DISCRETA | MODERADA                  |       |
| SIM                     | 1        | 0                         | 1     |
| NÃO                     | 25       | 6                         | 31    |
| TOTAL                   | 26       | 6                         | 32    |
| p-valor Teste de Fisher |          | p-valor Teste do $\chi^2$ |       |
| 1.0                     |          | 1.0                       |       |

## Discussão

Neste trabalho avaliamos as medulas ósseas de pacientes com câncer de mama na tentativa de detectar células tumorais, utilizando a biópsia por agulha Thriphina e exame anatomopatológico com imuno-histoquímica, como método de detecção de micrometástases.

Os resultados obtidos corresponderam à mesma porcentagem dos achados de Guillianio e colaboradores publicados em 2011, que encontraram 3% de positividade em uma série de 3474 pacientes, utilizando a técnica de aspiração e imunocitoquímica, recomendada para detecção de células tumorais em medula óssea [29], embora existam estudos com porcentagem de detecção em torno de 24% ou mais [30].

A nossa amostra é muito homogênea e de um modo geral, estariam contidas em um grupo considerado de pacientes com bom prognóstico: apresenta baixa expressão da proteína p53, prevalência de ki-67 abaixo de 30% e discreta marcação para CD34 [31].

A baixa expressão do marcador p53, indica menor presença de proteína mutante e a prevalência de Ki-67 abaixo de 30%, corresponde a neoplasias com menor índice mitótico [18,15,16], assim como a discreta marcação para CD34 excluindo o diagnóstico de sarcomas, e evidenciando uma baixa neoformação vascular peritumoral [22], reafirmando a idéia de um grupo de tumores homogêneos e teoricamente indolentes.

Embora tenha sido um número pequeno de pacientes avaliadas, o resultado obtido nos faz considerar alguns fatos: obtivemos 3% de positividade em um grupo considerado de bom prognóstico, onde foi encontrada micrometástase em uma paciente com tamanho tumoral pequeno (T1) e com receptores hormonais positivos, com provável resposta à hormonioterapia, assim como baixa expressão de p53 e discreta marcação para CD 34.

É necessário mais pesquisas e estudos a respeito da presença de células tumorais na medula óssea, assim como compreender o comportamento destas células. Segundo MOLINO, ainda não existe correlação da presença das micrometástases com outros critérios ou marcadores [15], envolvimento linfonodal, status do HER2/neu e receptores hormonais do tumor primário [11], E segundo Schindlbeck, a expressão de KI-67 e p53 não representam fatores preditivos para a detecção de metástases em MO [32], onde concordamos com estes autores.

Estes dados se confirmam em nosso estudo onde não foi encontrada associação da positividade da medula com a expressão da proteína p53, ki-67 e CD34, mostrando que doença residual mínima em medula óssea é fator preditor independente de mal prognóstico, reforçando a necessidade de avaliar este órgão em todas as pacientes com câncer de mama, tanto no início do diagnóstico, como no seguimento para a avaliação da eficácia terapêutica, visto que regimes de tratamentos adjuvantes diminuem, porém não são capazes de eliminar completamente células CK+ na medula [9].

Desta forma, concordamos com Vincent Salomon (2008), que a detecção de células tumorais na medula óssea corresponde a um parâmetro prognóstico promissor podendo melhorar o manejo clínico de pacientes com câncer de mama num futuro próximo, porém assim como Schindlbeck (2004) não encontramos associação com a expressão de p53, Ki67 e CD34 nos tumores primários, não podendo os mesmos, corresponder a critério preditor de presença de micrometástases medulares, o que nos faz reafirmar a idéia de avaliar medula óssea em todas as pacientes com carcinomas mamários.

## Referências:

1. Braun S, Pantel K. Diagnosis and clinical significance of disseminated tumor cells in bone marrow. *Dtsch Med Wochenschr.* 2000 Oct 13;125(41):1237-9.
2. Mansi JL, Gogas H, Bliss JM, Gazet JC, Berger U, Coombes RC. Outcome of primary-breast-cancer patients with micrometastases: a long-term follow-up study. *Lancet.* 1999 Jul 17;354(9174):197-202.
3. Landys K, Persson S, Kovarík J, Hultborn R, Holmberg E. Prognostic value of bone marrow biopsy in operable breast cancer patients at the time of initial diagnosis: Results of a 20-year median follow-up. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 May;49(1):27-33.
4. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Beck EP, Lang N, Jäger W. Epithelial cells in bone marrow of breast cancer patients at time of primary surgery: clinical outcome during long-term follow-up. *J Clin Oncol.* 2001 Aug 15;19(16):3669-74.
5. Gerber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reimer T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *J Clin Oncol.* 2001 Feb 15;19(4):960-71.
6. Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2003 Sep 15;21(18):3469-78.
7. Janni W, Rjosk D, Braun S. Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer. *Clin Breast Cancer.* 2000 Oct;1(3):217-25. Review.

8. Braun S, Kantenich C, Janni W, Hepp F, de Waal J, Willgeroth F, Sommer H, Pantel K. Lack of effect of adjuvant chemotherapy on the elimination of single dormant tumor cells in bone marrow of high-risk breast cancer patients. *J Clin Oncol*. 2000 Jan;18(1):80-6.
  
9. Becker S, Becker-Pergola G, Wallwiener D, Solomayer EF, Fehm T. Detection of cytokeratin-positive cells in the bone marrow of breast cancer patients undergoing adjuvant therapy. *Breast Cancer Res Treat*. 2006 May;97(1):91-6. Epub 2005 Dec 1.
  
10. Molino A, Pelosi G, Turazza M, Sperotto L, Bonetti A, Nortilli R, Fattovich G, Alaimo C, Piubello Q, Pavanel F, Micciolo R, Cetto GL. Bone marrow micrometastases in 109 breast cancer patients: correlations with clinical and pathological features and prognosis. *Breast Cancer Res Treat*. 1997 Jan;42(1):23-30.
  
11. Schindlbeck C, Janni W, Shabani N, Rack B, Gerber B, Schmitt M, Harbeck N, Sommer H, Braun S, Friese K. Comparative analysis between the HER2 status in primary breast cancer tissue and the detection of isolated tumor cells in the bone marrow. *Breast Cancer Res Treat*. 2004 Sep;87(1):65-74.
  
12. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr. American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20;25(33):5287-312. Epub 2007 Oct 22. Review.
  
13. Böcker W, Bier B, Ludwig A, de Hessel B, Gerdes J. Benign proliferative lesions and in situ carcinoma of the breast: new immunohistological findings and their biological implications. *Eur J Cancer Prev*. 1993 Nov;2 Suppl 3:41-9.
  
14. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311-22.
  
15. Molino A, Micciolo R, Turazza M, Bonetti F, Piubello Q, Bonetti A, Nortilli R, Pelosi G, Cetto GL. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int J Cancer*. 1997 Aug 22;74(4):433-7.



16. Nakagomi H, Furuya K, Hagiwara J, Nishio T, Watanabe K, Muto S, Takano K, Tada Y. Toremifene sensitized the effect of adriamycin on human breast cancer cell lines. *Gan To Kagaku Ryoho*. 1998 Apr;25 Suppl 3:454-8. Japanese.
17. Bártek J, Bártková J, Vojtěšek B, Stašková Z, Lukáš J, Rejthar A, et al. Aberrant expression of the p53 oncoprotein is a common feature of a wide spectrum of human malignancies. *Oncogene* 1991; 6: 1699-703.
18. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, Deng S, Johnsen H, Pesich R, Geisler S, Demeter J, Perou CM, Lønning PE, Brown PO, Børresen-Dale AL, Botstein D. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23. Epub 2003 Jun 26.
19. Olivier M, Langerød A, Carrieri P, Bergh J, Klaar S, Eyfjord J, Theillet C, Rodriguez C, Lidereau R, Bièche I, Varley J, Bignon Y, Uhrhammer N, Winqvist R, Jukkola-Vuorinen A, Niederacher D, Kato S, Ishioka C, Hainaut P, Børresen-Dale AL. The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1,794 patients with breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2006 Feb 15;12(4):1157-67.
20. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, Dowsett M, Fitzgibbons PL, Hanna WM, Langer A, McShane LM, Paik S, Pegram MD, Perez EA, Press MF, Rhodes A, Sturgeon C, Taube SE, Tubbs R, Vance GH, van de Vijver M, Wheeler TM, Hayes DF; American Society of Clinical Oncology; College of American Pathologists. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Jan 1;25(1):118-45. Epub 2006 Dec 11.
21. Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, Somerfield MR, Hayes DF, Bast RC Jr; American Society of Clinical Oncology. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007 Nov 20; 25(33):5287-312. Epub 2007 Oct 22. Review.
22. Krause DS, Fackler MJ, Civin CI, May WS. CD34: structure, biology, and clinical utility. *Blood*. 1996 Jan 1;87(1):1-13.
23. Natkunam Y, Rouse RV, Zhu S, Fisher C, van De Rijn M. Immunoblot analysis of CD34 expression in histologically diverse neoplasms. *Am J Pathol*. 2000 Jan;156(1):21-7.

24. Harvell JD, Kilpatrick SE, White WL. Histogenetic relations between giant cell fibroblastoma and dermatofibrosarcoma protuberans. CD34 staining showing the spectrum and a simulator. *Am J Dermatopathol*. 1998 Aug;20(4):339-45.
  
25. Alvarenga CA, Paravidino PI, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino LC, Schmitt F. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol*. 2011 Jun;64(6):493-7. doi: 10.1136/jcp.2011.089862. Epub 2011 Mar 22.
  
26. Bacchi CE, Almeida PC, Franco M. Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos Sociedade Brasileira de Patologia. São Paulo. Reichmann e Autores Editores, 2005
  
27. Instituto Nacional do Câncer. Programa Nacional do controle do câncer de mama.2013.<[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes\\_programas/site/home/nobrasil%20programa\\_controle\\_cancer\\_mama/](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/acoes_programas/site/home/nobrasil%20programa_controle_cancer_mama/)>
  
28. DAKO®, 2005. Leading de way in cancer diagnosis.<[http://www.dako.com/28829\\_connection\\_14.pdf](http://www.dako.com/28829_connection_14.pdf)>
  
29. Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV, Whitworth PW, Blumencranz PW, Reintgen DS, Morrow M, Leitch AM, Hunt KK, McCall LM, Abati A, Cote R. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. *JAMA*. 2011 Jul 27;306(4):385-93. doi: 10.1001/jama.2011.1034.
  
30. Lucci A, Krishnamurthy S, Singh B, Bedrosian I, Meric-Bernstam F, Reuben J, Broglio K, Mosalpuria K, Lodhi A, Vincent L, Cristofanilli M. Cyclooxygenase-2 expression in primary breast cancers predicts dissemination of cancer cells to the bone marrow. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Sep;117(1):61-8. doi: 10.1007/s10549-008-0135-x. Epub 2008 Jul 29.
  
31. Faria G, Cardoso MJ, Martins D, Bettencourt H, Amendoeira I, Schmitt F. P-cadherin as prognostic factor for loco-regional relapse in breast cancer. *Acta Med Port*. 2012 Mar-Apr;25(2):97-105. Epub 2012 Jun 25.

32. Schindlbeck C, Kampik T, Janni W, Rack B, Jeschke U, Krajewski S, Sommer H, Frieze K. Prognostic relevance of disseminated tumor cells in the bone marrow and biological factors of 265 primary breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2005;7(6):R1174-85. Epub 2005 Nov 24.
33. Vincent-Salomon A, Bidard FC, Pierga JY. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *J Clin Pathol.* 2008 May;61(5):570-6. Epub 2007 Nov 23.



## TERCEIRO ARTIGO

~~~~~

5.3 TERCEIRO ARTIGO

FIBROSE EM MEDULA ÓSSEA COMO CRITÉRIO INDIRETO MORFOLÓGICO, INDICATIVO DE MICROMETÁSTASES EM CARCINOMAS DUCTAIS DA MAMA.

Resumo

Objetivos: Observar a associação de micrometástases em medula óssea de pacientes com carcinomas ductais de mama, detectada através da biópsia com exame anatomopatológico e técnica de imuno-histoquímica utilizando CK-19, com a presença e quantificação de fibrose na medula, como critério indireto de infiltração neoplásica.

Material e Métodos: Biópsias de medula óssea foram obtidas de 30 pacientes do sexo feminino com câncer de mama. As amostras foram processadas dentro da rotina para microscopia de luz, coradas pela técnica do H&E, Tricrômico de Gomory e Reticulina, para avaliar a presença de fibrose medular, assim como complementada com técnica de imuno-histoquímica utilizando a Citoqueratina 19 como imunomarcador.

Resultados: 3% das 30 pacientes tiveram positividade na medula óssea para CK-19 indicando presença de micrometástases. Foi demonstrada forte associação entre a positividade da medula e a proliferação de fibras colágenas e elásticas, evidenciando um quadro histológico de fibrose medular secundária a processo neoplásico.

Conclusão: Em nossa série concluímos que a positividade para micrometástases, foi significativa com a presença e desenvolvimento de fibrose na medula óssea, podendo este aspecto morfológico ser útil na rotina, como critério indireto de infiltração neoplásica medular.

Palavras-chave: Neoplasias de mama. Medula óssea. Metástases. Fibrose.

Abstract

Objectives: To observe the association of micrometastases in bone marrow of patients with ductal carcinoma, detect by biopsy with histology and immunohistochemistry technique using CK19, with the presence and quantification of fibrosis in the marrow as an indirect criterion for infiltration.

Material and Methods: Bone marrow biopsies were obtained from 30 female patients with breast cancer. The samples were processed in the routine light microscopy, stained by HE and Masson's Gomori, Reticulin to assess the presence of fibrosis, as well as supplemented by immunohistochemical technique using cytokeratin 19 as immunomarker.

Results: 3% of the 30 patients had positive bone marrow CK19 indicating the presence of micrometastases. It demonstrated a strong association between positive marrow and proliferation of collagen and elastic fibers, showing a histological picture of fibrosis secondary to neoplastic process.

Conclusion: In our series we conclude 3% positive for micrometastasis, with statistical association with the presence and development of fibrosis in bone marrow, which may be useful in the morphological routine, as an indirect criterion for marrow infiltration.

Keywords: Breast neoplasms. Bone marrow. Metastasis. Fibrosis.

Introdução

Câncer de mama é uma doença heterogênea caracterizada por apresentar propensão à disseminação hematogênica precoce [1], tendo sido evidenciado em vários estudos a presença de células tumorais em medula óssea destas pacientes.

A detecção microscópica de tais células é definida como doença residual mínima (MRD), que têm ganhado cada vez mais atenção e maior importância no diagnóstico e na terapêutica antineoplásica [2].

Numerosas pesquisas têm demonstrado que micrometástases em medula óssea de pacientes com câncer de mama tem pior prognóstico em relação às pacientes sem infiltração medular [3,4]. A relevância prognóstica da detecção de células tumorais foi confirmada por estudo com meta-análise [5] e seu impacto prognóstico negativo tem sido reafirmado por diversos autores [6,7,8], que trouxeram juntos o resultado de um múltiplo estudo, confirmando que a detecção de células tumorais em medula óssea não apenas tem impacto no início do diagnóstico, como também, quando observadas no seguimento da doença [9] ou mesmo após completa quimioterapia adjuvante [10].

As micrometástases têm sido detectadas utilizando métodos moleculares e imunológicos. No momento, o aspirado citológico associado à imuno-citoquímica corresponde ao método recomendado [11].

A maioria dos estudos descritos na literatura são estudos citológicos, e ainda não existe um amplo consenso quanto a melhor abordagem metodológica [12]. As pesquisas diferem em número de pacientes, em tempo de seguimento de doença, em imunomarcador, além de não ter sido realizada uma comparação das técnicas com a mesma população, o que impossibilita uma padronização e escolha de melhor método para a detecção de células tumorais.

Publicações de estudos morfológicos através da biópsia trephine, complementada com técnica de imuno-histoquímica são raras, por motivos que necessitamos questionar. Em dois estudos de autópsias de pacientes com tumores metastáticos, foram testados os métodos de aspiração e biópsia para detecção de células tumorais, onde na primeira foi observada uma positividade de 28%, enquanto que nas biópsias, a positividade foi em torno de 35 a 45% [13,14].

De acordo com algumas diretrizes internacionais, o exame histológico melhora consideravelmente a especificidade da detecção de células tumorais, porém necessita de altos níveis de controle de qualidade [15] e consequentemente maior exploração dos aspectos morfológicos e conhecimento da histologia normal da MO (Figura 3,4) [15].

De acordo com Attilio Orazi *et al*, o uso rotineiro de técnica de imuno-histoquímica na avaliação de tumores metastáticos ou mesmo em medulas pós terapia anti-neoplásica não é necessário. Células tumorais metastáticas são usualmente grandes, apresentam-se agrupadas e têm grande associação com fibrose (Figura 5,6), apresentando ou não necrose [16].

A infiltração medular por células metastáticas promovem frequentemente reação estromal incluindo proliferação fibroblástica com deposição de reticulina (Figura 8,9) apresentando colagenização (Figura 7,10) ou não; neoangiogênese e resposta inflamatória; assim como algumas alterações ósseas [17].

Fibrose corresponde à alteração arquitetural mais marcante e frequente em infiltrações medulares por carcinomas mamários, podendo corresponder a critério morfológico indireto de presença de micrometástases [17].

Em pacientes com fibrose, o número de células tumorais é variável podendo ser até pouco frequente, dificultando sua obtenção em esfregaços e reafirmando a indicação da biópsia. A não visualização de células tumorais dentro do estroma fibroso pode resultar em erro diagnóstico de mielofibrose primária [17].

Quando ocorrer deposição de fibras reticulares sem evidência morfológica de células tumorais, estudo imuno-histoquímico deve ser indicado para excluir células malignas aprisionadas no estroma fibroso, com exceção dos carcinomas lobulares da mama que não desenvolvem fibrose [18,19].

Assim em nossa série foi realizado um estudo morfológico das medulas ósseas de pacientes com câncer de mama, com objetivo de avaliar fibrose e sua possível associação com micrometástases.

Material e Métodos

Pacientes: O presente estudo envolveu 30 pacientes do sexo feminino com carcinomas ductais da mama, admitidas no Centro de Oncologia do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas (HUPAA), no período de 01 de abril a 31 de outubro de 2012. Todas as pacientes aceitaram participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE). Foram avaliadas as medula ósseas através da técnica de biópsia para estudo morfológico e avaliação de fibrose medular.

Amostras de Medula Óssea: As amostras das medulas ósseas foram obtidas através do método de biópsia por agulha triphina, unilateral em crista ilíaca após indução da anestesia geral em 24 pacientes no momento da primeira cirurgia, enquanto que 6 pacientes foram obtidas de material formolizado encaminhado do serviço de hematologia do HUPAA/AL. As amostras foram fixadas em formol a 10% por 24 hs, em temperatura ambiente seguido de descalcificação por 20 min em solução aquosa de ácido fórmico a 10%, e seguiu para processamento histológico de rotina.

Os espécimes passaram por processo convencional para microscopia de luz, desidratados com etanol e diafanizados com xilol, sendo incluídos em parafina. Os cortes foram obtidos com espessura de aproximadamente 3 micrômetros e foram corados pelos métodos de Hematoxilina e Eosina, Tricrômico de Gomory e Reticulina, além da utilização do marcador imuno-histoquímico de citoqueratina 19 [20].

Preparação dos cortes histológicos para exame imuno-histoquímico: Os cortes histológicos de 3µm de espessura foram montados em lâminas histológicas silanizadas e após 12 horas colocadas em estufa a 50° C por uma hora. Após essas etapas, foram desparafinizadas com xileno, hidratados em soluções decrescentes de álcool e lavados em água destilada. As lâminas foram deixadas em solução detergente neutro 10% por 2 horas, lavadas em água corrente até retirar todo o excesso, e posteriormente, imersas sequencialmente em cubas com acetona.

Recuperação antigênica: As lâminas com os cortes histológicos foram incubadas em tampão citrato pH 6,0 por 20 minutos ou TRIS EDTA pH 9,0 a 95°C por uma hora em panela a vapor. A recuperação antigênica foi realizada por calor úmido.

Reação imuno-histoquímica: A imunomarcagem inicialmente ocorreu através da peroxidase endógena e corada pelos anticorpos monoclonal e /ou policlonal por 30 minutos. O anticorpo utilizado para a CK19 foi o clone RCK 108. Foi utilizada a técnica da

Estreptavidina-Biotina-Marcada (LSAB+) ou Envision. Seguiu a contracoloração com hematoxilina, desidratação, montagem e leitura.

Análise do Material: O material foi analisado e observado por três Patologistas capacitados e interpretados de acordo com as normas da Sociedade Brasileira de Patologia (SBP).

O grau de fibrose pode ser estimado utilizando à abordagem proposta por Manoharan *et al.* (1979).

Tabela 1: Graduação da fibrose na medula óssea.

Grau de Fibrose	
1+	Finas fibras focais com raras fibras grosseiras.
2+	Rede de fibras difusamente finas com discreto aumento de fibras grosseiras.
3+	Difusa rede de fibras grosseiras destituídas de colagenização (Tricrômico negativo).
4+	Difusa rede de fibras grosseiras com colagenização (Tricrômico positivo).

Modificada por Manoharan et al. 1979.

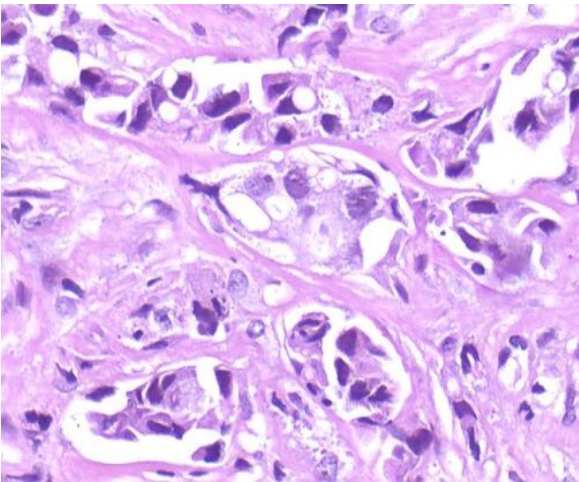
Análise Estatística: Foi realizada uma análise estatística descritiva e inferencial utilizando o *software R Studio* Versão 0.97.248; **Plataforma R** versão 2.15.2 (2012-10-26), ISBN 3-900051-07-0. Os dados estatísticos para verificar a positividade e ou a negatividade da medula óssea foram obtidos pela divisão do número total de casos positivos pelo número total de pacientes. Em seguida foram avaliadas as variáveis de maneira descritiva. Para correlacionar as freqüências de metástases, utilizou-se análise inferencial aplicando os seguintes testes: Teste de Proporções, Teste Exato de Fisher, Teste do X^2 . Procedeu-se com um teste Bi-caudal ou Bilateral no qual, tenta-se obter como resposta a igualdade ou desigualdade das proporções. O teste de hipóteses é descrito como: Hipótese Nula (H_0): $p = p_0$ (As proporções são iguais) e Hipótese Alternativa (H_1): $p \neq p_0$ (As proporções são diferentes).

Em nossa série foi realizado o teste do X^2 e o Teste de Fisher, sendo ambos menores que 0.05. Desta forma não podemos sustentar a hipótese nula, validando a alternativa. Ou seja, a proporção de fibrose no grupo de pacientes com micrometástases foi estatisticamente significativa em relação ao grupo sem micrometátases.

Resultados

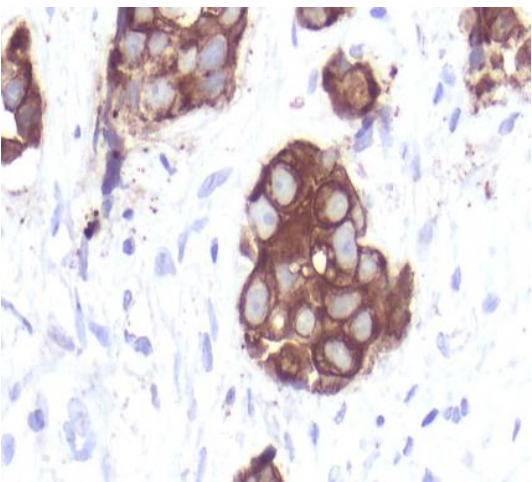
Foi identificado presença de micrometástase no corte histológico corado pela H&E (Figura 1) e confirmado com marcador CK-19 (Figura 2) em uma paciente da série de 30 correspondendo a 3,0 % de ocorrência de micrometástases em medula óssea. Foi verificada associação entre a positividade e presença extensa de fibrose na medula óssea. O p valor foi estatisticamente significativo.

Figura 1: H&E micrometástases em MO



Fonte: Juliana Arôxa

Figura 2: CK 19 Positiva em MO



Fonte: Juliana Arôxa

Gráfico 1: Frequência de micrometástases na medula (CK positiva)

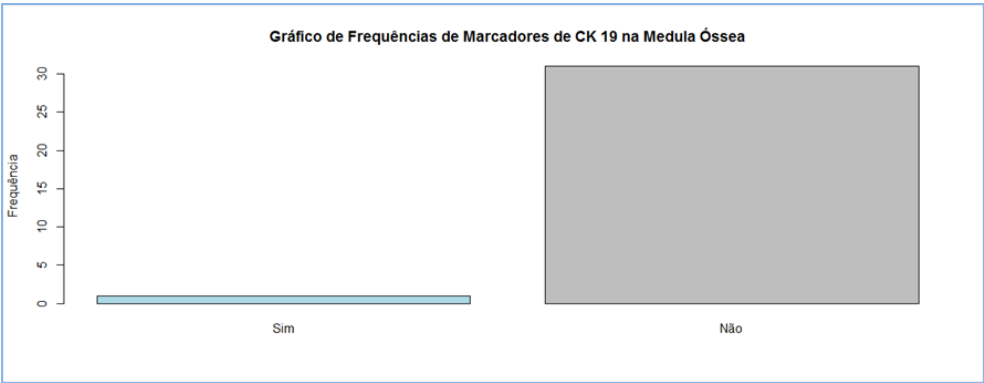
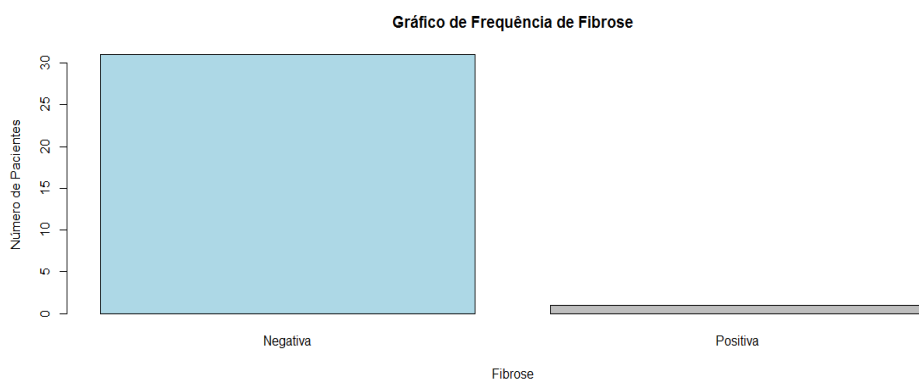
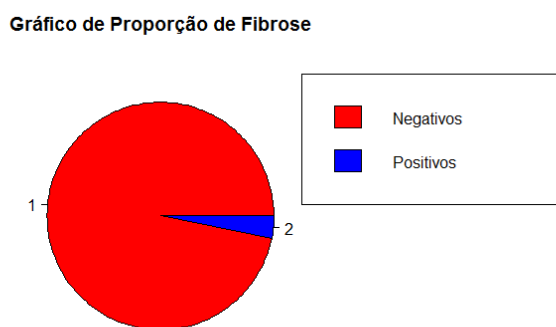
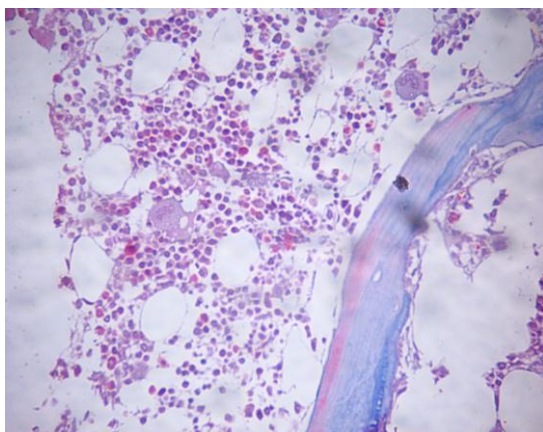
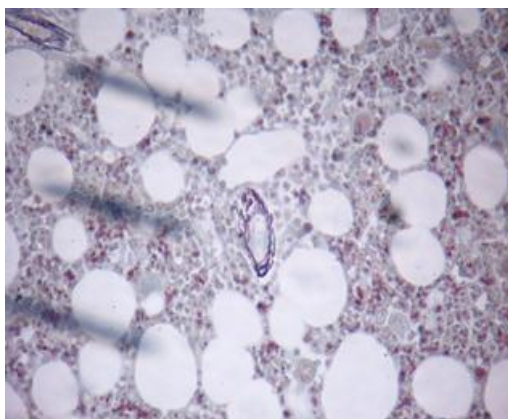


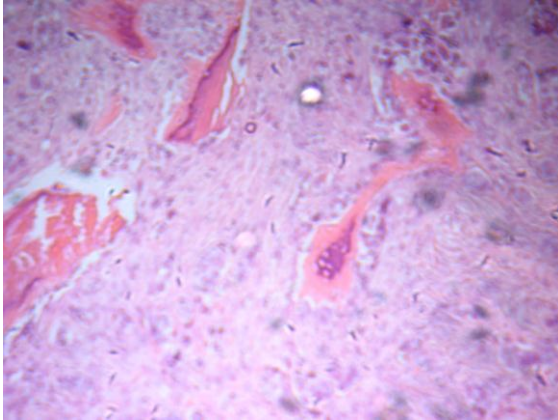
Gráfico 2: Frequência de Fibrose Medular**Gráfico 3:** Frequência de Fibrose Medular**Figura 3:** MO corada Masson. Normal. Aumento 10x

Fonte: Juliana Arôxa

Figura 4: MO corada Reticulina. Normal. Aumento 20x

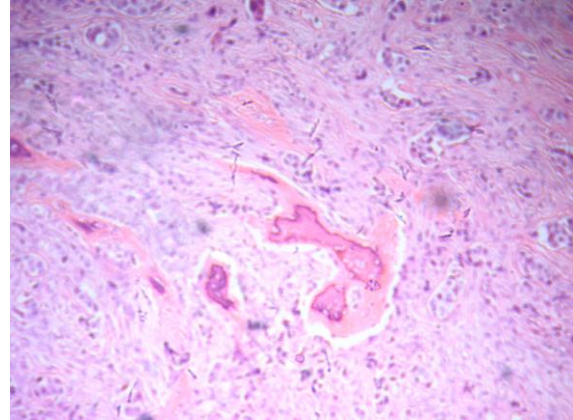
Fonte: Juliana Arôxa

Figura 5: MO H&E. Aumento de 20x (Fibrose)



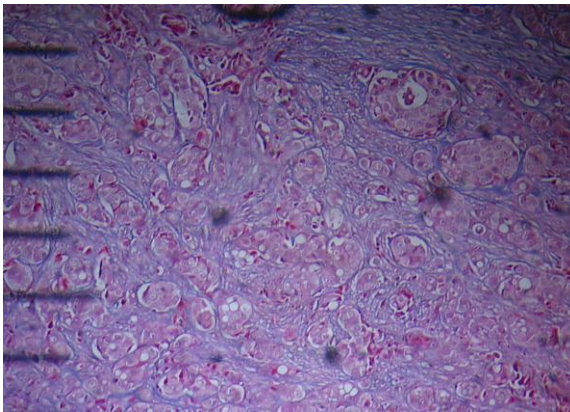
Fonte: Juliana Arôxa

Figura 6: MO H&E. Aumento 10x (Fibrose)



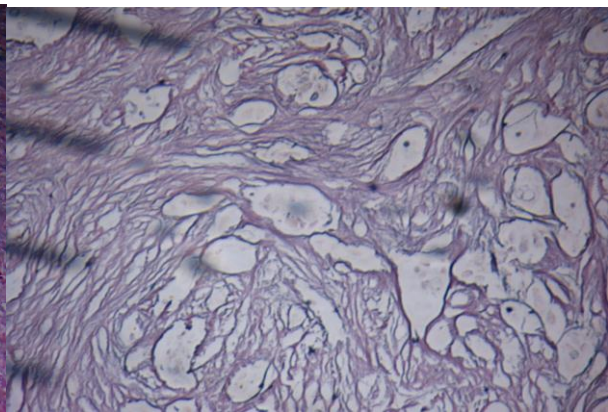
Fonte: Juliana Arôxa

Figura 7: MO corada Masson Aumento 20x. (Fibrose).



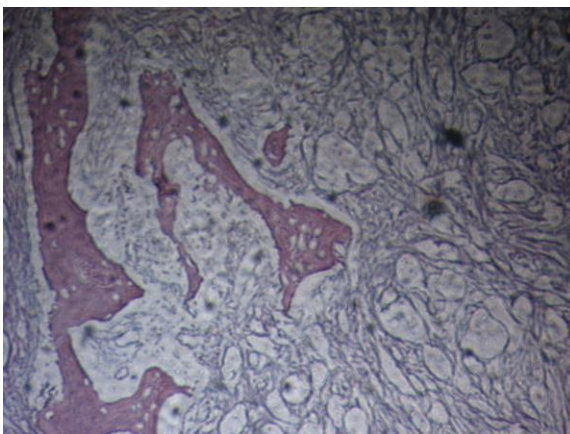
Fonte: Juliana Arôxa

Figura 8: MO corada Reticulina. Aumento 20x. (Fibrose).



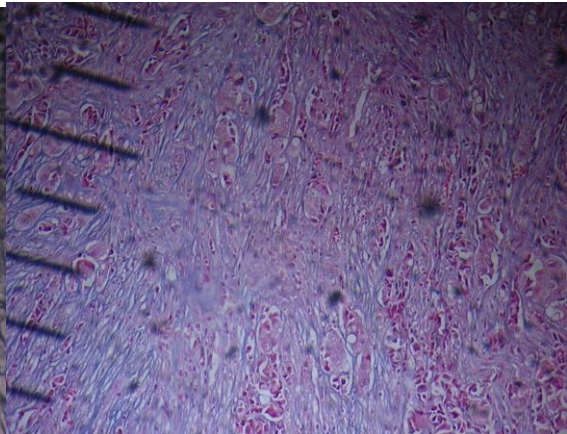
Fonte: Juliana Arôxa

Figura 9: MO corada Reticulina. Aumento 20x. (Fibrose).



Fonte: Juliana Arôxa

Figura 10: MO corada Masson. Aumento 20x. (Fibrose).



Fonte: Juliana Arôxa

Discussão

Em nosso estudo avaliamos o grau de fibrose em medulas ósseas de pacientes com Carcinomas Ductais da mama na tentativa de correlacionar a morfologia do estroma medular com a presença de micrometástases, utilizando a biópsia por agulha Thriphine e exame anatomopatológico com técnica de imuno-histoquímica, para confirmação de detecção de micrometástases.

Em nossa série obtivemos 3% de positividade para CK19 indicando comprometimento medular, correspondendo à mesma porcentagem dos achados de Guillianio e colaboradores, em uma série de 3474 pacientes, publicados em 2011, utilizando aspirado associado à imunocitoquímica, técnica sugerida para detecção de células tumorais em medula óssea [21].

Estudos anatomo-patológicos para detecção de células tumorais são raros na literatura, por motivos que necessitamos questionar. A Hematopatologia é uma subespecialidade relativamente nova no campo da Anatomia Patológica; e a interpretação dos espécimes provenientes de secções de biópsias é vista como uma das mais difíceis áreas da patologia cirúrgica [17].

Segundo Salomon, o exame histológico melhora a especificidade do diagnóstico de micrometástases, o que também é ressaltado por Attilio Orazi, que discorda do uso rotineiro da técnica de imuno-histoquímica na avaliação de tumores metastáticos, afirmando que células tumorais são geralmente grandes, apresentando-se agrupadas e com grande associação com fibrose, sendo um grande defensor da avaliação cuidadosa da morfologia medular [15,16].

De acordo com BAIN, a infiltração por células tumorais promovem extensa reação estromal, sendo a fibrose à alteração arquitetural mais marcante em micrometástases de carcinomas mamários [17], com exceção dos carcinomas lobulares mamários que não desenvolvem deposição de fibras reticulares [18,19].

Concordamos com os autores descritos acima, visto que, em nosso estudo encontramos associação entre a positividade para células tumorais e a presença extensa de fibrose, que foi estatisticamente significativa, sugerindo que a deposição de fibras reticulares na medula óssea possa corresponder a um critério morfológico indireto da presença de micrometástases em carcinomas ductais mamários.

São necessárias mais pesquisas e estudos a respeito da detecção de células tumorais metastáticas assim como o conhecimento do comportamento destas células.

Concluimos, portanto, que a detecção de micrometástases é imperativa em pacientes com câncer de mama, existindo uma real necessidade de avaliação das medulas ósseas destas pacientes tanto no diagnóstico como no seguimento da doença, sendo importante uma maior exploração dos aspectos morfológicos, podendo estes, corresponder a critérios indiretos de infiltração medular.

REFERÊNCIAS

1. Diel IJ, Kaufmann M, Costa SD, Holle R, Minckwitz VG, Solomayer EF, Kaul S, Bastert G. Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Marrow at Primary Surgery: Prognostic Value in Comparison With Nodal Status. *Journal of the National Cancer Institute*. 1996, v.88, n. 22, p. 1652-1658.
2. Becker S, Pergola BG, Fehm T, Emig R, Wallwiener D, Solomayer, FE. Image Analysis System for the Detection of Disseminated Breast Cancer Cells on Bone Marrow Cytospins. *Journal of Clinical Laboratory Analysis*. 2005. v. 19, p.115-119.
3. Mansi JL, Easton D, Berger U, *et al*. Bone marrow micrometastases in primary breast cancer: prognostic significance after 6 years' follow-up. *European Journal of Cancer*. 1991, v.27, p.1552-1555.
4. Solomayer EF, Diel IJ, Salant IG, *et al*. Time Independence of prognostic impact of tumor cell detection in the bone marrow of primary breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*, 2001,v.7, p. 4102-4108.
5. Funke I, Schraut W. Meta-analysis of studies on bone marrow micrometastases: an independent prognostic impact remains to be substantiated. *Journal of Clinical Oncology*.1998, v. 16, p.557-566.
6. Gebauer G, Fehm T, Merkle E, Jaeger W, Mitze M. Micrometastases in axillary lymph nodes and bone marrow of lymph node-negative breast cancer patients--prognostic relevance after 10 years. *Anticancer Res*. 2003 Sep-Oct; 23(5b):4319-24.

7. Geber B, Krause A, Müller H, Richter D, Reiter T, Makovitzky J, Herrnring C, Jeschke U, Kundt G, Friese K. Simultaneous immunohistochemical detection of tumor cells in lymph nodes and bone marrow aspirates in breast cancer and its correlation with other prognostic factors. *Journal of Clinical Oncology*. 2001. v.19, p. 960-971.
8. Wiedswang G, Borgen E, Kåresen R, Kvalheim G, Nesland JM, Qvist H, Schlichting E, Sauer T, Janbu J, Harbitz T, Naume B. Detection of isolated tumor cells in bone marrow is an independent prognostic factor in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*. 2003.v.18, p. 3469-3478.
9. Janni W, Rjosk D, Braun S. Clinical relevance of occult metastatic cells in the bone marrow of patients with different stages of breast cancer. *Clin Breast Cancer*. 2000 Oct;1(3):217-25. <http://theoncologist.alphamedpress.org/content/6/2/125>.
10. Braun S, Pantel K, Muller P, Janni W, Hepp F, Kentenich CR, 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. *N Engl J Med*. 2000. Feb 24; 342 (8): 525-33.
11. Pantel K, Cote RJ, Fodstad O. Detection and importance of micrometastases disease. *Journal of National Cancer Institute*. 1999. v.91, p. 1113-1124.
12. Becker S, Becker-Pergola G, Fehm T, Emig R, Wallwiener D, Solomayer EF. Image analysis systems for the detection of disseminated breast cancer cells on bone-marrow cytopins. *J Clin Lab Anal*. 2005;19(3):115-9.
13. Suprun H, Rywlin AM. Metastatic carcinoma in histologic sections of aspirated bone marrow: a comparative autopsy study. *Journal of South Medicine*. 1976. v. 69, p.438-439.
14. Lang W, Stauch G, Soudah B, Georgil A. The effectiveness of bone marrow punctures for staging carcinomas of the breast and lung. In: Lennert K (ed) *Pathology of Bone Marrow*. Gustav Fischer Verlag. Stuttgart. 1984.
15. Salomon V, Bidard FC, Pierga JY. Bone marrow micrometastasis in breast cancer: review of detection methods, prognostic impact and biological issues. *Journal of Clinical Pathology*. 2008. v.61, p. 570-576.
16. Orazi A, O'Malley DP, Arber DA. *Illustrated Pathology of the Bone Marrow*. Cambridge University Press. p.1-14.2006.

17. Bain BJ, Clark MD, Wilkins BS. In: Bone Marrow Pathology. 4 Ed. Hong Kong. Wiley-Blackwell. p.1-51. 2010.
18. Bitter MA, Fiorito D, Corkil ME, *et al.* Bone marrow involvement by lobular carcinoma of the breast cannot be identified reliably by routine histological examination alone. Human Pathology. 1994. v.25, p.781-788.
19. Lyda MH, Teref M, Carter NH, Ikle D, Weiss LM, Arber DA. Keratin immunohistochemistry detects clinical significant metastases in bone marrow biopsy. American Journal of Surgical Pathology, 2000. v. 24, p.1593-1599.
20. Alvarenga C, Paravidino P, Alvarenga M, Dufloth R, Gomes M, Zeferino L, Schmit F. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. J Clin Pathol 2011; 64:493-497. doi:10.1136/jcp.
21. Giuliano AE, Hawes D, Ballman KV, Whitworth PW, Blumencranz PW, Reintgen DS, Morrow M, Leitch AM, Hunt KK, McCall LM, Cote R. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. JAMA. 2011 Jul 27;306(4):385-93.
22. Wickramasinghe, SN. Human bone marrow. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.
23. Ahluwalia J, Garewal G, Das R, Vaiphet K. The reticulin stain in bone marrow biopsies: beyond marrow. Br. J. Haematology. 2003. v. 123. p.378.



CONCLUSÃO

~~~~~

## 6 CONCLUSÃO

- Micrometástases em medula óssea de pacientes com câncer de mama pode ocorrer mesmo em tumores pequenos;
- Não houve associação entre micrometástases e fatores de agressividade tumoral do tumor primário;
- São necessárias novas pesquisas para desenvolver estes conhecimentos e trazer novos conceitos para a patologia mamária.
- Assim, defendemos a inclusão da avaliação da medula óssea no protocolo de estadiamento das pacientes com câncer de mama, e também no seguimento, para avaliar a resposta terapêutica e sobrevivência ao câncer de mama.



## REFERÊNCIAS

.....

## REFERÊNCIAS

ABREU, E; KOIFMAN, S. Prognostic factors in woman breast cancer. *Revista Brasileira de Cancerologia*, 48 (1): 113-31, 2002.

AHULUWALIA, J; GAREWAL, G; DAS, R; VAIPHET, K. The reticulin stain in bone marrow biopsies: beyond marrow. *Br. J. Haematology*, v. 123. p.378. 2003.

AJCC/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast Cancer. *Incidência de Câncer de Mama no Mundo*. Fevereiro, 2011. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>

AJCC/WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast Cancer. *Incidência de Câncer de Mama no Mundo*. Fevereiro, 2008. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>

AJCC/World Health Organization. Breast Cancer. *Incidência de Câncer de Mama no Mundo* (Texto na Internet). Fevereiro, 2011. <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>

ALVARENGA, C; PARAVIDINO,P; ALVARENGA, M; DUFLOTH,R; GOMES,M; ZEFERINO, L; SCHMIT, F. Expression of CK19 in invasive breast carcinomas of special histological types: implications for the use of one-step nucleic acid amplification. *J Clin Pathol* 2011;64:493 e 497. doi:10.1136/jcp.2011.

ALVARENGA, M. *Tumores da mama*. In: BILLIS, A.V.J. *Patologia Diagnóstica de Tumores*. 2 ed. Campinas, p. 295-340, 2010.

ANNER, R.M.; DREWINKI, B. Frequency and significance of bone marrow involvement by metastatic solid tumors. *Cancer*. v 39, p. 1337-1344. 1977.

BACCHI, C.E.; ALMEIDA, P.C.; FRANCO, M. *Manual de Padronização de Laudos Histopatológicos Sociedade Brasileira de Patologia*. São Paulo. Reichmann e Autores Editores, 2005.

BAIN, B.J. The normal bone marrow. In: *Bone Marrow Pathology*, 2 ed. B.J. Bain, D.M. Clark, I.A. Lampert. Oxford: Blackwell, p. 1-50. 1996.

BAIN, B.J.; CLARK, M.D.; WILKINS, B.S. *Bone Marrow Pathology*. 4 ed. Hong Kong. Wiley-Blackwell. p.1-51.2010.

BECKER S, BECKER-PERGOLA G, FEHM T, EMIG R, WALLWIENER D, SOLOMAYER EF. Image analysis systems for the detection of disseminated breast cancer cells on bone-marrow cytopins. *J Clin Lab Anal*. 2005;19(3):115-9.2005.

BELLAHCENE, A; CASTRONO, V. Expression of bone matrix proteins in human breast cancer: potential roles in microcalcification formation and in the genesis of bone metastases. *Bull Cancer*. Jan;84 (1):17-24.1997.

BILIMORIA, MM; MORROW, M. The Woman at increased risk for breast cancer: evaluation and management strategies. *CA Cancer J Clin*. Sep-Oct; 45 (5): 263-78,1995.

BISCHOFF, J; ROSENBERG,R; DAHM, M; JANNI, W; GUTSCHW, K. Minimal residual disease in bone marrow and peripheral blood of patients with metastatic breast cancer . *Recent Results in Cancer Research*, vol 162, 135-140, 2003.

BITTER, M.A.; FIORITO, D.; CORKIL, M.E.; *et al*. Bone marrow involvement by lobular carcinoma of the breast cannot be identified reliably by routine histological examination alone. *Human Pathology*, v.25, p.781-788. 1994.

BORGEN, E; NAUME, B; NESLAND, JM; KVALHEIM, G; BEISKE, K; FODSTAD, O, *et al*. Standardization of the immunological detection of cancer cells in bone marrow and blood: Establishment of objective criteria for the evaluation of immunostained cells. *Cytotherapy*, v. 5, p.377-388, 1999.

BRAUN, S; PANTEL, K; MULLER, P; JANNI, W; HEPP,F; KENTENICH, CR; GASTROPH, S; WISCHINIK, A; DIMPFL, T; KINDERMANN, G; RIETHMULLER, G; SCLIMOK, G. Cytokeratin-positive cells in the bone marrow and survival of patients with stage I, II or III breast cancer. *N Engl J Med*. Feb 24; 342 (8): 525-33, 2000.

CALY, M.; GENIN, P.; GHUZLAN, A.A *et al*. Analysis of correlation between mitotic index, MIB1 score and S-phase fraction as proliferation markers in invasive breast carcinoma.

Methodological aspects and prognostic value in a series of 257 cases. *Anticancer Research*, v. 24, p. 3283-3288, 2004.

CAWTHORN, TR; AMIR, E; BROOM, R; FREEDMAN, O; GIANFELICE, D; BARTH, D; WANG, D; HOLEN, I; DONE, SJ; CLEMONS, M. Mechanisms and pathways of bone metastasis: challenges and pitfalls of performing molecular research on patient samples. *Clin Exp Metastasis*. 2009; 26(8):935-43. Epub Aug 21, 2009.

CIFUENTES, N; PICKREN, JW: Metastases from carcinoma of mamary gland. An autopsy study. *J Surg Oncol* 11: 193-205, 2001.

CLARK, G.M; McGUIRE, W.L. Follow-up study of HER2/neu amplification in primary breast cancer. *Cancer Research*, v.51, n.3, p.944-948, 1991.

CLARK, GM; McGUIRE, WL. New biologic prognostic fators in breast cancer. *Oncology*; 3:49-54, 1989.

CLARKE, R.B. *Steroid receptors and proliferation in the human breast*. *Steroids* 68:789-794, 2003.

DAKO, 2010. Leading de way in cancer diagnosis. <[http://www.dako.com/28829\\_connection\\_14.pdf](http://www.dako.com/28829_connection_14.pdf)>

DANIEL KAHN; GEORGE, J;WEINER; SIMONA, B; MARK, T; MADSEN; DAVID, L; BUSHNELL, G; WATKINS, L; ARGENVI, EA; HICHWA,RD.Positron Emission Tomographic Measuremenotf Bone Marrow Blood Flow to the Pelvis and Lumbar Vertebrae in Young Normal Adults. *Blood* Vol83, No 4. pp 958-963, 1994.

DIEL, J.I; KAUFMANN, M; COSTA, DS; MINCKWITZ, VGR; SOLOMAYER, F; KAUL, E; Baster, G. Micrometastatic Breast Cancer Cells in Bone Marrow at Primary Surgery: Prognostic Value in Comparison with Nodal Status. *Journal of the National Cancer Institute*, Vol. 88, No. 22, November 20, 1996.

DONEGAN, WL. Staging and primary treatment. *Cancer of the breast*. Philadelphia, WB Saunders, p.336-402, 1988.

EINSENBURG, A.J.A; KOIFMAN, S. Câncer de mama: marcadores tumorais. *Revista Brasileira de Cancerologia*, v.47, n.4, p.377-388, 2001.

FILHO, G.B.; *Bogliolo Patologia*. 8 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan. p. 841-891. 2011.

FRANCO, M (Org) *et al: Patologia Processos Gerais*. 5.ed. São Paulo: Atheneu, p 273- 285. 2010.

FRIEBERT, S.E.; SHEPARDSON,L.B.; SHURIN, S.B.; ROSENTHAL, G.E.; ROSENTHAL, N.S. Pediatric bone marrow cellularity: are we expecting too much? *Journal of Pediatric Hematology/Oncology*, v. 20, p.439-443. 1998.

GAFORIO, JJ; SERRANO, MJ; SANCHES-ROVIRA, P; SIRVENT, A; RODRIGUES, M; CAMPOS, M; DE LA TORRE,N; ALGARRA, I; DUENAS, R; LOZANO, A. Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogen-receptor status and predicts for poor prognosis. *Int. J Cancer*, Dec 20; 107 (6): 984-90, 2003.

GERDES, J; LEMKE, H; BAISCH, H;WACKER ,H; SCHUWAB, U; STEIN, H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody ki-67. *Journal of Immunology*, v. 133, p.1710, 1984.

GIULIANO, AE; HAWES, D; BALLMAN, KV; WHITWORTH, PW; BLUMENCRANZ, PW; REINTGEN, DS; MORROW, M; LEITCH, AM; HUNT, KK; McCALL, LM; COTE, R. Association of occult metastases in sentinel lymph nodes and bone marrow with survival among women with early-stage invasive breast cancer. *JAMA*. Jul 27;306(4):385-93.2011.

GONÇALVES, ATC. Câncer de Mama: Mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. *Cad Saúde Pública*;23: 1785-90, 2007.

GULATI, G. L.; ASHTON, J. K.; HYUN, B.H. Structure and function of the bone marrow and hematopoieses. *Hematology/Oncology Clinics of North America*, v.2, p.495-511, 1988.



HAMMOND, M.E. *et al.* American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists Guideline Recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Journal of Clinical Oncology*, v.6, n.4, p.195-197, 2010.

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

HARTSOCK, R.J.; SMITH, E.B.; PETTY, C.S. Normal variations with aging of the amount of hematopoietic tissue in bone marrow from the anterior iliac crest: a study made from 177 cases of sudden death necropsy. *American Journal of Clinical Pathology*, v. 43, p. 326-331, 1965.

HARVELL, J.D.; KILPATRICK, S.E.; WHITE, W.L; Histologic relations between giant cell fibroblastoma and dermatofibrosarcoma protuberans: CD34 staining showing the spectrum and a simulator. *American Journal of Dermatopathology*, v. 20, p. 339-345, 1998.

HAYES, DF; THOR, AD. C-erbB-2 in breast cancer: development of a clinically useful marker. *Semin Oncol* 29:231, 2002.

HURSHAUT, Y.; PRESSMAN, P. *Breast cancer: The complete guide*. New York: Bontom; 1996.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Estimativas do câncer de mama no Brasil 2012*. <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama>>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Coordenação de Prevenção e Vigilância do Câncer – CONPREV; Divisão de Gestão da Rede Oncológica - DGRO <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/bec370804eb696e0979297f11fae00ee/M anual\\_Gerencial+SISMAMA.pdf?MOD=AJPERES](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/bec370804eb696e0979297f11fae00ee/M anual_Gerencial+SISMAMA.pdf?MOD=AJPERES)>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Definição de câncer*. 2013. <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer/site/oquee>>

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. *Programa Nacional do controle do câncer de mama*. 2013. <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/aco/programas/site/home/nobrasil%20programa\\_controle\\_cancer\\_mama/](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/aco/programas/site/home/nobrasil%20programa_controle_cancer_mama/)>

IOACHIM, E.E; MALAMOU-MITSI, V.; KAMINA, S.A; GOUSSIA, A.C; AGNANTIS, N.J. Immunohistochemical expression of Bcl-2 protein in breast lesions: correlation with Bax, p53, Rb, C-erbB-2, EGFR and proliferation indices. *Anticancer Research*. v.20 (6B), p. 4221-5. 2000.

IVERSEN, PO. Blood flow to the haemopoietic bone marrow. *Acta Physiol Scand* 159 , 269–276. 1997.

JONHSON-THOMPSON, MC; GUNTHER, J. Ongoing research to identify environmental risk factors in breast carcinoma. *Cancer*. Mar 1; 88 (5 Suppl): 1224-9, 2000.

JORDAN, V.C. *Tamoxifen: A guide of clinicians and patients*. Huntigton, NY PRR, 1996.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J; *Histologia Básica*. 10 ed. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, p.240-242. 2004.

KAPLAN, R; PSAILA, B; LYDEN, D. Bone marrow cells in the “pre-metastatic nich”: within bone and beyond. *Cancer and Metastasis Reviews*. v 25, p 521-529. 2006.

KENNETH, S; MCCARTY, JR; NATH, M. Breast. In: Sternberg S. Stephen. *Histology for Pathologists*, p. 71-73, 2006.

KEYOMARSI, K *et al*: Cyclin E and survival in patients with breast cancer. *N. Engl J Med* 346:1566, 2002.

KRAUSE, D.S; FACKLER, M.J; CIVIN, C.I; MAY, W.S. CD34: Structure, biology and clinical utility. *Blood*, v. 87, p. 1-13, 1996.

KUMAR, V; ABBAS, AK; FAUSTO, N. Capítulo 7 Neoplasias. Em: *Bases Patológicas das Doenças*. Robbins e Contran, p 281-356. 2006.

LAKHANI, S; ELLIS, I; SCHNITT, S; TAN, P; VAN DE VIJVER, M. *Who Classification of Tumours of the Breast*. 4 ed. Lyon: IARC, 2012.

LALLE, M; DE ROSA, L; MARZETTI, L; MONTUORO, A. Detection of breast cancer cells in the bone marrow or peripheral blood: methods and prognostic significance. *Tumori*. May-Jun; 86 (3): 183-90, 2000.

LEAL, C, SCHIMTT, FC; BENTO, MJ; MAIA, N; LOPES, C. Ductal carcinoma in situ of the breast: histological categorization and its relationship to ploidy and immunohistochemical expression of hormones receptors, p 53 and c-erbB-2 protein. *Cancer*, 75:2123-31,1995.

LESTER, C S. A MAMA. In: Robbins e Cotran. *Bases Patológicas das Doenças Patologia*, p. 1182-1183 2008.

LESTER, CS; A Mama. In: Robbins e Cotran. *Bases Patológicas das Doenças Patologia*, p. 1169-1206, 2011.

LESTER, S. Capítulo 23 Mama. Em: *Bases Patológicas das Doenças*. Robbins e Cotran. Patologia, p 1181-1202. 2006.

LI, F; *et al.* EGFR and COX-2 protein expression in non-small cell lung cancer and the correlation with clinical features. *J Exp Clin Cancer Res*, 2011 Mar 7. 2011.

LONGACRE, T.A.; FOUCAR, K.; CRAGO, S. *et al.* Hematogones: a multiparameter analysis of bone marrow precursor cells. *Blood*, v.73, p. 544-552. 1989.

LYDA, M.H.; TEREFE, M.; CARTER, N.H.; IKLE, D.;WEISS, L.M.; ARBER, D.A. Keratin immunohistochemistry detects clinical significant metastases in bone marrow biopsy. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 24, p.1593-1599. 2000.

MA, C.X; SANCHEZ, C.G.; ELLIS, M.J. Predicting endocrine therapy responsiveness in breast cancer. *Oncology* 23: p.133-142, 2009.

MANGESH, A; THORAT,SANJANA MEHROTRA; AKIRA MORIMIYA; SUNIL BADVE. COX-2 Expression Does Not Correlate with Microvessel Density in Breast Cancer. *Pathobiology*. Vol. 76, No. 1, 2009.

McBRIDE, G. Researchers exploring implications of minimal residual cancer. *Journal of the National Cancer Institute*,v. 97, n. 22, p.1642-1643, 2005.

McCARTY, K; NATH, M.Chapter 4.Breast. In: *Histology for Pathologists*. Stephen S. Sternberg. P 71-81. 1997.

McLAREN, BK; GOBBI, H; SCHUYLER,PA; OLSON, SJ; PARI, FF; DUPONT,WD; PAGE,DL. Immunohistochemical expression of estrogen receptor in enlarged lobular units with columnar alteration in benign breast biopsies: a nested case control study. *AM. J. Pathol*, 29:105-8,2003.

MILLER, K. Estrogen and DNA damage: the silente source of breast câncer? *J Natl Cancer Inst* 95:100, 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. Coordenação de Prevenção e Vigilância. *Estimativa 2010: Incidência de Câncer no Brasil*. Rio de Janeiro: INCA 2010. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/versãofinal.pdf>

MOLINO, A.; MICCIOLO, R.; TURAZZA, M.*et al*. Ki-67 immunostaining in 322 primary breast cancers: Associations with clinical and pathological variables and prognosis. *Int. Journal Cancer*, v. 5, p. 433-437. 1997.

MULLER, A; HOMEY, B; SOTO, H. Gene expression predictors of breast cancer outcomes. *Lancet* 361: 1590, 2003.

NAEIM, F.; *Pathology of Bone Marrow*. Baltimore, MD: Williams e Wilkins. 1998.

NAKAGOMI, H.; MIYAKE, T.; HADE, M. et al. Prognostic and Therapeutic implications of the MIB-1 Labeling Index in Breast Cancer. *Breast Cancer*, v.5, p.255-259. 1998.

NATKUNAM, Y; ROUSE, R.V.; ZHU, S *et al*. Immunoblot analysis of CD34 expression in histologically diverse neoplasms. *American Journal of Pathology*, v. 156, p.21-27, 2000.

NILSSON, S.K; JOHNSTON,H.M.; COVERDALE, J. A. Spatial localization of transplanted hemopoietic stem cells: Inferences for the localization of stem cell niches. *Blood*, v.97, p. 2293-2299.2001.

OLIVIER, M; LANGEROD, A; CARRIERI, P *et al.* The clinical value of somatic TP53 gene mutations in 1, 794 patients with breast cancer. *Clinical Cancer Research*, v. 12, p. 1157-1167, 2006.

ORAZI, A; O'MALLEY, D.P; ARBER, D.A; Illustrated Pathology of the Bone Marrow. *Cambridge University Press*. p.1-14.2006.

ORGANIZACIÓN MUNDIAL DE LA SALUDE. Cáncer de mama: prevención y control<<http://www.who.int/topics/cancer/breastcancer/es/index1.html>>

PANTEL K, WOELFLE U. Micrometastasis in breast cancer and other solid tumors. *J Biol Regul Homeost Agents*. 2004 Apr-Jun;18(2):120-5. 2004<<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15471214>>

PAPAC, R.J.; Bone marrow metastases: a review. *Cancer*, v.74, p.2403-2413. 1994.

PARKIN, DM; BRAY, F; FERLAY, J; PISONI, P. Global Cancer Statistics, 2002, *Cancer J Clin*, 55 (2) 74-108, 2005.

PINOTTI JA. *Câncer de Mama inicial*. São Paulo: BYK; capítulo 3; pág. 61, 2003.

PINOTTI JA. *Câncer de Mama inicial*. São Paulo: BYK; capítulo 4; pág. 80-1, 2003.

RACILA, E; EUTHUS, D; WEISS, AJ; RAO, C; McCONNELL, J; TERSTAPPEN, LW; UHR, JW. Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc. Natl Acad Sci USA*. Apr 14;95(8): 4589-94, 1998.

RIETHDORF, S; PANTEL, K; Disseminated tumor cells in bone marrow and circulating tumor cells in blood of breast cancer patients: current state of detection and characterization. In: *Pathobiology*; 75(2): 140-8, 2008.

RILEY, RS; HOGAN, TF; PAVOT, DR; FORYSTHE, R; MASSEY, D; SMITH, E; WRUGHT, L Jr; BEN-EZRA, JM. A pathologist's perspective on bone marrow aspiration and biopsy: I. Performing a bone marrow examination. *J Clin Lab Anal.*;18(2):70-90, 2004.

ROSAI, J. *Surgical Pathology*. 8. ed. New York: Mosbay,1996, p 1565-1638.v.2.

ROSEN, P. In: *Breast Pathology*. P 1-14.1997.

ROSEN, P.P. In: Rosen P. Peter. *Breast Pathology* p. 195-204, 1997.

SCHOLZEN, T; GERDES, J; The Ki-67 protein: from the know and the unknow. *Journal of cell Physiology*, v.22, p.182-311, 2000.

SORLIE, T; TIBSHIRANI, R; PARKER, J *et al*. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100:8418-8423, 2003.

SUKAMAL, S; SARAH, A; MAHER, G; MEHUL, S; DAVID, W; MADAN, A; SINGH, T; DOUGLAS, I. Comparative Analysis of Bone Marrow Micrometastases with Sentinel Lymph Node Status in Early-Stage Breast Cancer. *Annals of Surgical Oncology* vol. 16 issue 2 February p. 276 – 280. 2009.

TAICHMAN, R.S.; EMERSON, S.G.; The role of osteoblasts in the hematopoietic microenvironment. *Stem Cells*, v.16, p.7-15. 1998.

TAUBERT, H; BLUMKE, K; BILKENROTH, U; MEYE, A; KUTZ, A; BARTEL, I F; LAUNTENSCHLAGER, C; ULBRICH, EJ; NASS, N; HOLZHAUSEN, HJ; KOELBL, H; LEBRECHT, A. Detection of disseminated tumor cells in peripheral blood of patients with breast cancer: correlation to nodal status and occurrence of metastases. *Gynecol Oncol*. Jan;92(1): 256-61,2004.

TAVASSOLI, A.F. *Normal Development and Anomalies of the Breast*. In: Tavassoli. Pathology of the Breast, .p.4-5, 1999.

TAVASSOLI, A.F. *Normal Development and Anomalies of the Breast*. In: Tavassoli, AF. Pathology of the Breast, p.45, 2003.

TAVASSOLI, F. Chapter 1. *Normal Development and Anomalies*. In: Pathology of the Breast. p 1-23. 1992.

TAVASSOLI, F.A; DEVILEE, P. editors. *Pathology and genetics of tumors of the breast and female genital organs*. Lyon: WHO/IARC; 2003.

TLISTY, TD; HEIN, PW. *know thy neighbor:stromal cells can contribute signals*. Curr Opin Genet Dev 11:54, 2001.

VAN`T VEER, L.J.M. *et al*. Gene expression profiling predicts clinical outcome of breast cancer. *Nature, England*, v.415, n.6871, p.530-536, 2002.

VENÂNCIO, AFA; FILHO, AL. FRANCO, M; MONTENEGRO, M; THALES DE BRITO, BACCHI, C; ALMEIDA, P; In: *Patologia Processo Gerais*, p.267-270, 2010.

VENKITARAMAN AR: *Cancer susceptibility and the funcions of BRCA 1 and BRCA 2*. Cell 108:171, 2002.

WEIGELT, B; PETERSE, JL; VAN`T VEER LJ. Breast cancer metastasis: markers and models. *Nature Reviews Cancer*. Aug; 5 (8): 591-602. Review, 2005.

WICKRAMASINGHE, SN. Chapter 31. Bone Marrow. In: *Histology for Pathologists*. Sternberg S. Stephen. p 707-741.1997.

WICKRAMASINGHE, SN; *Human bone marrow*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, 1975.

WISEMAN, BS; WERB, Z: Stromal effects on mammary gland development and breast cancer. *Science* 296: 1046, 2002.

WOLFF, A.C; HAMMOND, M.E; SCHWARTZ, J.N.; et al. 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, p.118-145, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Breast Cancer. *Incidência de Câncer de Mama no Mundo* (Texto na Internet). Fevereiro, 2011. Disponível em <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/>>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Histological Classification of tumors of the Breast*. Consensus Conference, Lyon, France, 2002. Disponível em <<http://www.saap.es/pdfsvarios/WHObreastclassification.pdf>>

ZHU L, LOO WT, CHOW LW. Circulating tumor cells in patients with breast cancer: possible predictor of micro-metastasis in bone marrow but not in sentinel lymph nodes. *Biomed Pharmacother*. 2005 Oct;59 Suppl 2:S355-8. 2005.





ANEXOS

~~~~~

ANEXO I – Aprovação do Comitê de Ética

**DECLARAÇÃO**

Declaramos que o projeto de Pesquisa nº 48/2011 (CAAE: 0037.0.447.172-11) intitulado: **“A IMPORTÂNCIA DA AVALIAÇÃO DE MEDULA ÓSSEA NO ESTADIAMENTO DO CÂNCER DE MAMA ”**, apresentado pela pesquisadora responsável **Juliana Arôxa Pereira Barbosa**, foi aprovado nesta data, pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer - SPCC / Hospital de Câncer de Pernambuco - HCP.

Os autores deverão remeter cópia do artigo publicado para arquivo na Biblioteca da SPCC / HCP e terão que mencionar nas publicações a Instituição onde o trabalho foi realizado.

Recife, 13 de março de 2012.

Dr. Glauber Leitão
Coordenador

Comitê de Ética em Pesquisa
Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer
Hospital de Câncer de Pernambuco

ANEXO II – Autorização Do Hospital Universitário Professor Alberto Antunes



SERVIÇO PÚBLICO FEDERAL
MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALAGOAS
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO PROF. ALBERTO ANTUNES

AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL PARA PESQUISA NO HUPAA/UFAL

Autorizo ao (a) estudante Juliana Arôxa Pereira Barbosa do Curso de Pós Graduação em Patologia da UFPE ter acesso ao Hospital Universitário Prof. Alberto Antunes da Universidade Federal de Alagoas HUPAA/UFAL, objetivando trabalho de pesquisa, com título **“ A Importância da Avaliação da Medula Óssea no Estadiamento do Câncer de Mama”** para fins de conclusão de Dissertação de Mestrado, devendo o(a) mesmo(a) comprometer-se a seguir as normas e rotinas do Serviço. Deverá manter sigilo da identificação do (a) paciente, e só divulgar os resultados obtidos, em reuniões e publicações científicas e/ou junto ao grupo de estudo relacionado a pesquisa.

Maceió, 15 de Agosto de 2011.

Prof. Fernando A. M. Guimarães
Diretor de Ensino, Pesquisa e
Extensão - HUPAA/UFAL


Fernando Antonio M. Guimarães
Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão/HUPAA/UFAL

ANEXO III– Modelo Do Termo De Consentimento Livre e Esclarecido

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu.....RG.....
 abaixo assinado, dou o meu consentimento livre e esclarecido para participação no projeto de pesquisa intitulado: A importância da avaliação da medula óssea no estadiamento do câncer de mama. A pesquisa é coordenada por Juliana Arôxa Pereira Barbosa, a quem poderei contactar / consultar a qualquer momento que julgar necessário através do telefone nº (82) 99913321 ou e-mail juaroxa@hotmail.com.

1. O objetivo da pesquisa é avaliar a frequência da presença de células (metástases) do câncer de mama na medula óssea (local onde o sangue é produzido e que se localiza no interior dos ossos), bem como comparar as características destas metástases com as características presentes nas células do tumor da mama – através de um exame laboratorial chamado estudo imuno-histoquímico.
2. A coleta do material para estudo segue os seguintes passos: (a) No momento da cirurgia para o tratamento do câncer de mama indicado pelo médico responsável, será feita uma injeção no osso da pelve (crista ilíaca posterior) para coletar material da medula óssea. Durante este procedimento o indivíduo estará anestesiado; (b) Após esta coleta o material será encaminhado para o laboratório e analisado quanto a presença ou não de células cancerosa através de técnicas específicas (exame histopatológico e estudo imuno-histoquímico); (c) O resultado do exame será entregue ao médico responsável para que este lhe informe, assim como uma cópia do resultado também estará disponível ao participante do estudo e poderá ser requerida ao médico responsável; (d) Após análise de vários casos, esperamos ter informação sobre a frequência da ocorrência de células cancerosas do tumor de mama na população que se submete a cirurgia para tratamento inicial desta doença, e assim contribuir com medidas para a melhor abordagem diagnóstica.
3. Afirmando que aceitei participar por minha própria vontade, sem receber qualquer incentivo financeiro e com a finalidade exclusiva de colaborar para o sucesso da pesquisa, assim como fui informado(a) dos objetivos estritamente acadêmicos deste estudo. As informações colhidas durante o estudo terão caráter confidencial e informações pessoais não serão divulgadas.
4. Estou livre para interromper o estudo e retirar o consentimento de minha participação a qualquer momento durante a pesquisa, se assim desejar, por qualquer motivo, estando ciente de que tal fato não irá alterar a qualidade nem meus direitos quanto ao atendimento e tratamento necessário;
5. Fui também esclarecido(a) de que o uso das informações por mim oferecidas estão submetidos as normas éticas destinadas à pesquisa envolvendo seres humanos, da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Conselho Nacional de Saúde (CNS), do Ministério da Saúde (MS). Compreendo que minha identidade será mantida em sigilo e

que os resultados da pesquisa poderão ser apresentados em eventos e publicações científicas.

6. Riscos e Benefícios

Riscos: Ocorrência de dor durante ou até 24h após o procedimento, e eventual sangramento no local da injeção para coleta do material. As coletas serão realizadas durante o ato cirúrgico para o tratamento do câncer, imediatamente após a realização da anestesia geral, o que irá minimizar ou mesmo anular a dor do procedimento. Analgésicos são normalmente prescritos pelo médico responsável após a cirurgia, o que também evitará a dor pós procedimento. Quanto ao risco de sangramento, será minimizado pela análise dos exames pré operatórios obrigatórios solicitados pelo médico responsável pelo tratamento.

Benefícios: Possibilidade do diagnóstico precoce de metástases do câncer de mama na medula óssea (detecção de células cancerosas do tumor da mama na medula óssea).

7. Estou ciente de que, caso eu tenha dúvidas ou me sinta prejudicado(a), poderei entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Sociedade Pernambucana de Combate ao Câncer / Hospital de Câncer de Pernambuco, situado na Av. Cruz Cabugá, 1597 – Santo Amaro/Recife – (081) 32178197, para apresentar recursos ou reclamações em relação à pesquisa, o qual tomará as medidas cabíveis.

8. O pesquisador principal da pesquisa me ofertou uma cópia assinada deste *Termo de Consentimento Livre e Esclarecido*, conforme recomendações da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP).

Maceió, _____ de _____ de 2012.

Participante: _____

Testemunha: _____

Testemunha: _____

Assinatura do(a) pesquisador(a): _____

ANEXO IV – Normatização Adotada

Normatização AdotadaUniversidade Federal de PernambucoCentro de Ciências da Saúde

Programa de Pós Graduação do Centro de Ciências da Saúde

Av. Professor Moraes Rego s/n – Cidade Universitária – CEP: 50670-901 – Recife-PE

I - REGULAMENTAÇÃO DA DEFESA

O aluno do Programa da Pós-Graduação /CCS/UFPE deve:

- 2 Apresentar a dissertação em formato de artigos*, dos quais pelo menos um artigo deve ser enviado para publicação em revista indexada no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que serão submetidos. A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão a ser submetido à publicação.
- 3 Apresentar a tese em formato de artigos, dos quais pelo menos dois artigos devem estar submetidos à publicação em revistas indexadas no mínimo como Qualis Nacional A da CAPES. O formato de apresentação dos artigos segue as normas de “instruções aos autores” das Revistas que são submetidos (apresentar comprovantes para a defesa de tese). A revisão da literatura pode ser apresentada sob a forma de artigo de revisão também submetido à publicação.

II – NORMAS DA APRESENTAÇÃO¹

Estrutura	Ordem dos Elementos
1. Pré- textuais Elementos que antecedem o texto com informações que ajudam na identificação e utilização do trabalho	1.1 Capa
	1.2 Lombada
	1.3 Folha de rosto
	1.4 Errata (opcional, se for o caso)
	1.5 Folha de aprovação
	1.6 Dedicatória(s)
	1.7 Agradecimento(s)
	1.8 Epígrafe (opcional)
	1.9 Resumo na língua vernácula
	1.10 Resumo em língua estrangeira
	1.11 Lista de ilustrações
	1.12 Lista de tabelas
	1.13 Lista de abreviaturas e siglas
	1.14 Lista de símbolos
	1.15 Sumário
2. Textuais	2.1 Apresentação
	2.2 Revisão da literatura (ou artigo de revisão)
	2.3 Métodos
3. Pós-textuais	2.4 Resultados - Artigo (s) original (ais)
	2.5 Considerações finais
	3.1 Referências
	3.2 Apêndice (s)
	3.3 Anexo (s)
Elementos que complementam o trabalho	

²Adaptadas segundo as recomendações da ABNT NBR 14724, 2005

(NBR 14724: informação e documentação: trabalhos acadêmicos: apresentação. Rio de Janeiro, 2005).