

Caracterização anatomopatológica e imunofenotípica de carcinomas de mama em mulheres jovens

Pathological and molecular characterization of breast carcinomas of young women

Lívia Moscardi Bacchi¹, Marcus Corpa², Carlos E. Bacchi³, Filomena M. Carvalho⁴

Apoio: FAPESP processo 2007-03139-9.

¹ Acadêmica do 4º ano de graduação da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP), bolsista de iniciação científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (Fapesp) (Processo 07/07/51613-1).

² Patologista da Consultoria em Patologia, São Paulo (SP).

³ Diretor da Consultoria em Patologia, São Paulo (SP).

⁴ Professora-associada do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da USP.

Endereço para correspondência: Filomena Marino Carvalho. Rua Teodoro Sampaio, 352, cj 154, Pinheiros, 05406-000, São Paulo, SP. Telefone: (11) 3061-2981, e-mail: filomena@usp.br

Recebido em: 1/1/2009. Aceito após modificações em: 2/3/2009

Palavras-chaves

Mulher jovem;
Carcinoma mamário;
Perfil genético;
Perfil molecular;
Imuno-histoquímica.

Keywords

Young woman;
Mammary carcinoma;
Genetic profile;
Molecular profile;
Immunohistochemistry.

RESUMO

Objetivos: Analisar características anatomopatológicas e perfil imuno-histoquímico dos carcinomas de mama em mulheres até os 35 anos. **Método:** Estudo retrospectivo com análise de casos recebidos no período de 1997 a 2007. Foram identificados 909 (6,6%) casos de jovens, dos quais 314 possuíam blocos de parafina disponíveis. Foi selecionado um grupo controle de 81 pacientes acima de 60 anos. Todos os casos foram revisados quanto a características anatomopatológicas. A pesquisa imuno-histoquímica de RE, RP e HER2 foi realizada em 291 casos de mulheres jovens e em 74 acima de 60 anos. Os tumores foram categorizados como luminal (RE e/ou RP positivo), HER2 (RE e RP negativos e HER2 positivo) e triplo-negativo (RE, RP e HER2 negativos). **Resultados:** O tipo histológico ductal invasivo foi o mais frequente nos dois grupos (95,2% em jovens e 83,9% acima de 60 anos). A frequência do tipo lobular foi menor no grupo jovem (2,5% x 12,3%), embora o subtipo pleomórfico tenha sido mais frequente. Pacientes jovens apresentaram mais frequentemente tumores de alto grau (41,7% x 28,4%) e tendência a tumores circunscritos (8,2% x 7,4%) e com necrose (23,2% x 16,0%). O perfil luminal foi mais frequente nos dois grupos, embora com proporção menor nas jovens (64,9% x 81,1%). Estas apresentaram maior frequência do perfil triplo-negativo (27,1% x 17,6%), mais superexpressão de HER2 (16,5% x 5,4%), e maior frequência do perfil HER2 puro (7,9% x 1,3%). **Conclusões:** Os resultados apontam para diferenças intrínsecas nos carcinomas em jovens, caracterizadas por perfis morfológico e imuno-histoquímico mais agressivos.

ABSTRACT

Aims: To analyse pathological features and immunohistochemical profile of breast carcinomas in women 35 years or less. **Methods:** Retrospective study with analysis of the cases received from 1997 to 2007. We identified 909 (6.6%) cases of breast cancer in young women, 314 of them with available paraffin blocks. A control group of 81 patients above age of 60 was selected. All the cases were revised regarding histological features. The immunohistochemical detection of ER, PR and HER2 was carried on 291 cases of young women and 74 in olders. The tumors were categorized as luminal (positive ER and/or PR), HER2 (negative ER and RP, and positive HER2), and triple-negative (negative ER, PR and HER2). **Results:** The ductal histological type was the most frequent one in the two groups (95.2% in young and 83.9% above 60 years). Infiltrative lobular carcinoma was less frequent in the young group (2.5% x

12,3%), although the pleomorphic subtype was more frequent. Young women more often presented with high grade tumors (41.7% x 28.4%) and showed a trend to more circumscribed tumors (8.2% x 7.4%) and necrosis (23.2% x 16.0%). The luminal profile was more frequent in the two groups, although with lower frequency among younger (64.9% x 81.1%). These presented more triple-negative profile (27.1% x 17.6%), more overexpression of HER2 (16.5% x 5.4%), as well as the molecular profile HER2 (7.9% x 1.3%). **Conclusions:** The results point to intrinsic differences in the tumors arising in young women characterized by more aggressive morphological and immunohistochemical profiles.

Introdução

O câncer de mama tem apresentação bastante heterogênea quanto a evolução e resposta às diferentes opções terapêuticas hoje disponíveis. Fatores prognósticos e preditivos clássicos continuam a nortear a conduta e constituem as bases dos vários sistemas de agrupamento de casos, como o estadiamento TNM (2002, 2003), categorização de St Gallen e Adjuvant¹⁻³. Os principais fatores nesses sistemas incluem idade da paciente, tamanho do tumor, estado linfonodal regional, grau histológico, embolização vascular, expressão de receptores hormonais e amplificação do oncogene HER2¹⁻⁴. Com o desenvolvimento de métodos de avaliação simultânea de múltiplos genes, como a de microarranjos de DNA, foi possível a identificação de diferentes grupos de câncer de mama segundo os perfis de expressão gênica: luminais A e B, HER2, basal-símile e mama normal^{5,6}. Esses perfis puderam ser reproduzidos em diferentes plataformas, atestando sua fidelidade⁷. Posteriormente, esses grupos puderam ser identificados por meio de perfis imuno-histoquímicos alternativos⁸⁻¹². Nos estudos genéticos, os tipos luminais correspondem a 60% a 70% dos casos, enquanto o tipo HER2, a 20% a 25% e os basais-símiles, a 10% a 15%⁶. Estes últimos têm sido relacionados a mulheres mais jovens e à mutação do BRCA1, entretanto não há, até onde pudemos pesquisar, estudos que investiguem os perfis intrínsecos em mulheres jovens, assim como não foi encontrado nenhum estudo em mulheres brasileiras.

Este estudo se propõe a investigar as características anatomopatológicas e o perfil imuno-histoquímico dos carcinomas de mama em mulheres até os 35 anos, comparando-os com aqueles observados em mulheres acima de 60 anos.

Método

O estudo foi retrospectivo com análise dos casos recebidos para consulta no período de 1997 a 2007 no Laboratório Consultoria em Patologia, Botucatu, SP. Foram obtidos 15 mil casos de carcinoma de mama nesse período. A média de

idade foi de 54,41 anos. Desses, 909 casos (6,6%) corresponderam a pacientes com idade ≤ 35 anos, dos quais 314 possuíam blocos de parafina disponíveis para estudo. Foi selecionado um grupo de 81 pacientes acima de 60 anos, com diagnóstico de carcinoma no ano de 2006 no mesmo serviço. Todos os casos foram revisados inicialmente por um patologista experiente em patologia mamária (MC). Casos selecionados por apresentação pouco comum ou discordância com o diagnóstico original foram submetidos a um segundo patologista (FMC). Foram avaliados tipo e grau histológico, grau nuclear, contorno do tumor, presença de necrose tumoral, embolização vascular e associação com carcinoma ductal *in situ*. A pesquisa imuno-histoquímica de receptor de estrogênio (RE), receptor de progesterona (RP) e produto do oncogene HER2 (HER2) foi realizada em 291 casos de mulheres jovens e em 74 de mulheres acima de 60 anos. Segundo esses resultados, os tumores foram categorizados como luminal (RE e/ou RP positivo), HER2 (RE e RP negativos e HER2 positivo) e triplo-negativo (RE, RP e HER2 negativos).

As reações imuno-histoquímicas para RE, RP e HER2 foram realizadas em cortes inteiros do tumor. As especificações técnicas das reações constam na tabela 1. Todos os resultados foram incluídos em banco de dados Access Microsoft 2007. As variáveis categóricas foram comparadas nos dois grupos por meio do teste do qui-quadrado.

Resultados

O tipo histológico ductal invasivo foi o mais frequente nos dois grupos (95,2% em jovens e 83,9% nas mulheres com mais 60 anos). A frequência do tipo lobular foi menor no grupo jovem (2,5% x 12,3%, $p = 0,00006$), embora o subtipo pleomórfico tenha sido mais frequente nas jovens (3 casos x 1 caso). Pacientes jovens apresentaram mais frequentemente tumores de alto grau histológico (41,7% x 28,4%, $p = 0,028$), alto grau nuclear (47,4% x 33,3%, $p = 0,022$) e tendência a tumores circunscritos (8,2% x 7,4%) e com necrose (23,2% x 16,0%) (Figura 1). O perfil imuno-histoquímico mais frequente nos dois grupos foi o luminal (Figura 2), embora sua

ARTIGO ORIGINAL

Caracterização anatomopatológica e imunofenotípica de carcinomas de mama em mulheres jovens
Bacchi LM *et al.*

Tabela 1. Especificações dos reagentes utilizados, metodologias de recuperação de epitopos e sistemas de detecção nas reações imuno-histoquímicas

Método de recuperação de epitopos	Anticorpo primário	Origem do anticorpo primário/ Clone ou designação/ Fonte comercial/Diluição	Sistema de detecção
Incubação em panela de pressão (Tender Cooker, Nordic Wave, EUA), em solução de ácido cítrico pH 6,00 durante 9 minutos	Receptor de estrogênio	Anticorpo monoclonal de coelho; Clone SP1/Neomarkers (EUA)/1:500	Sistema de detecção Dako Advance*
Incubação em panela de pressão (Tender Cooker, Nordic Wave, EUA), em solução de ácido cítrico pH 6,00 durante 9 minutos	Receptor de progesterona	Anticorpo monoclonal de camundongo; Clone PgR636 Dako (EUA)/1:1.000	Sistema de detecção Dako Advance*
Incubação em forno de micro-ondas (Eletrolux, 900W), em solução de ácido cítrico pH 6,0 por 15 minutos	Produto proteico do oncogene HER-2	Anticorpo policlonal de coelho; Dako (EUA)/1:100	Sistema de detecção Dako Advance*

* *Envision™ Mouse ou Rabbit Dako (EUA): 45 minutos à temperatura ambiente, de acordo com orientação do fabricante. No sistema Envision™, anticorpo secundário (anticamundongo ou coelho) e sistema de detecção são incubados em um só passo da reação imuno-histoquímica por 45 minutos.*

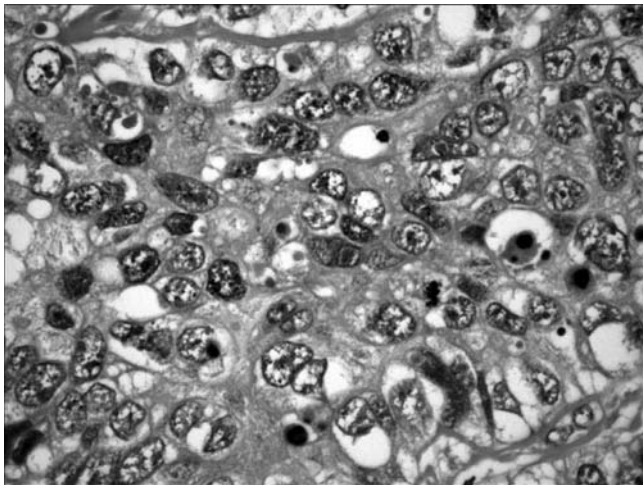


Figura 1. Carcinoma ductal invasivo com alto grau histológico, alto grau nuclear, alta atividade proliferativa e que se mostrou triplo-negativo ao exame imuno-histoquímico.

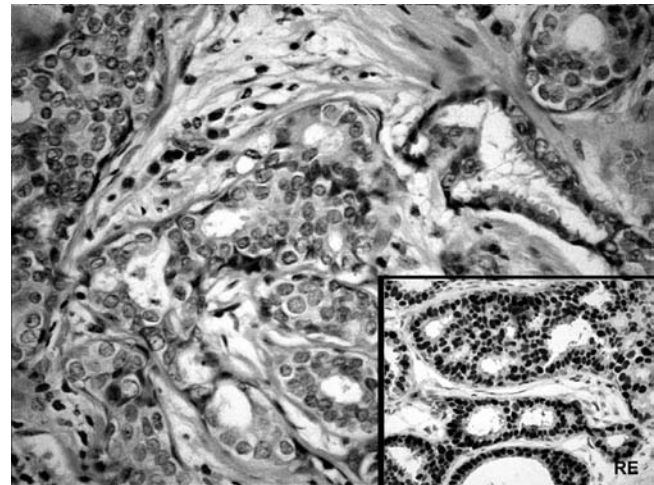


Figura 2. Carcinoma ductal invasivo, com forte e difusa expressão de receptor de estrogênio (no detalhe).

proporção seja menor entre os tumores de mulheres jovens (64,9% x 81,1%, $p = 0,007$). Houve tendência de o perfil imuno-histoquímico triplo-negativo ser mais frequente nas jovens (27,1% x 17,6%, $p = 0,090$) (Figura 2). A superexpressão de HER2 foi mais frequente nas jovens (16,5% x 5,4%, $p = 0,014$), assim como o perfil HER2, com negatividade de receptores hormonais (7,9% x 1,3%, $p = 0,042$). A sùmula dos resultados referentes às características anatomopatológicas encontra-se na tabela 2.

Os casos foram classificados segundo o perfil imuno-histoquímico alternativo baseado na expressão de RE, RP e HER2. Esses resultados, nos dois grupos, encontram-se na tabela 3.

Nossos resultados apontam para diferenças intrínsecas nos tumores na faixa etária mais jovem, caracterizadas por perfis morfológico e imuno-histoquímico mais agressivos.

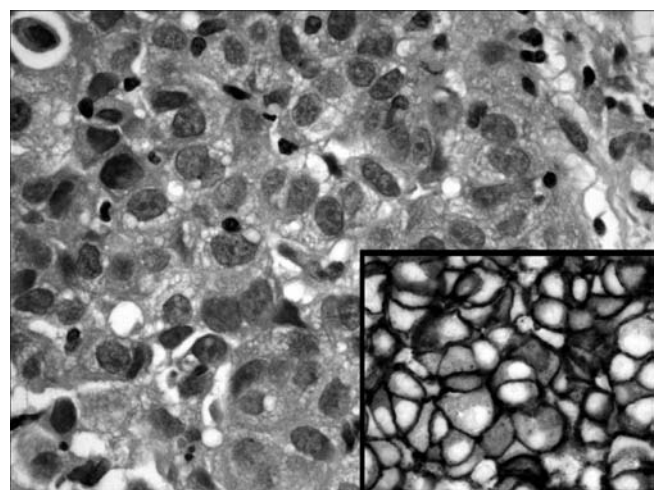


Figura 3. Carcinoma ductal invasivo com alto grau histológico e expressão de HER2 forte, padrão difuso em membranas.

Discussão

Os estudos de avaliação de expressão gênica, geralmente utilizando técnicas como o microarranjo de DNA e RT-PCR, têm permitido a melhor compreensão do comportamento biológico

Tabela 2. Caracterização dos carcinomas de mama em dois grupos etários: resultados após revisão histológica

Característica histológica	≤ 35 anos	> 60 anos
Tipo histológico		
Ductal invasivo	299 (95,2%)	68 (83,9%)
Lobular infiltrativo	8 (2,5%)	10 (12,3%)
Medular	1 (0,3%)	0
Secretor	1 (0,3%)	0
Mucinoso	1 (0,3%)	0
Metaplásico	2 (0,6%)	0
Apócrino	2 (0,6%)	0
Grau histológico		
I	36 (11,5%)	15 (18,5%)
II	147 (46,8%)	43 (53,0%)
III	131 (41,7%)	23 (28,4%)
Grau nuclear		
I	18 (5,7%)	12 (14,8%)
II	147 (46,8%)	42 (51,8%)
III	149 (47,4%)	27 (33,3%)
Contornos do tumor		
Circunscrito	26 (8,2%)	6 (7,4%)
Espiculado	232 (73,9%)	66 (81,5%)
NA	56 (17,8%)	9 (11,1%)
Embolização vascular		
Não identificado	251 (79,9%)	73 (90,1%)
Presente	55 (17,5%)	8 (9,8%)
NA	8 (2,5%)	0
Componente <i>in situ</i> presente	131 (41,7%)	42 (51,8%)
Necrose tumoral	73 (23,2%)	13 (16,0%)
Total	314	81

NA = não avaliável.

Tabela 3. Perfis moleculares básicos em carcinomas mamários nos grupos de pacientes abaixo de 35 anos e acima de 60 anos

	Caracterização imuno-histoquímica	≤ 35 anos	> 60 anos	P*
Luminal	RE e/ou RP (+)	189 (64,9%)	60 (81,1%)	0,007
HER2	RE e RP (-) e HER2(+)	23 (7,9%)	1(1,3%)	0,090
Triplo-negativos	RE (-), RP (-), HER2 (-)	79 (27,1%)	13 (17,6%)	0,042
Total de casos avaliados		291	74	

*Valor de "p" após aplicação do teste do qui-quadrado.

co dos tumores^{5-7,11}. Os diferentes padrões de expressão gênica associam-se a fenótipos morfológicos e perfis moleculares distintos passíveis de reconhecimento na prática diária. Um dos grupos que tem sido mais estudado nesse sentido é o dos carcinomas basais-símiles. Esses tumores se apresentam, em geral, com contornos macroscópicos circunscritos, alto grau histológico, necrose extensa, alta atividade proliferativa e intenso infiltrado linfocitário^{8,12}. O perfil imuno-histoquímico triplo-negativo com expressão de citoqueratinas basais e/ou expressão do receptor de fator de crescimento epidérmico (HER1) tem especificidade de 100% e sensibilidade de 76% na previsão do perfil genético basal-símile^{8,12}. Para a caracterização imuno-histoquímica dos diferentes tipos genéticos são basicamente utilizados expressão imuno-histoquímica dos receptores hormonais, HER2, citoqueratinas basais e EGFR⁸. Embora não haja consenso quanto aos critérios de classificação imuno-histoquímica, sobretudo na estratificação dos luminais A e B, é possível admitir que os luminais expressam pelo menos uma das proteínas receptoras (RE ou RP), os HER se caracterizam por amplificação do oncogene HER2 e os basais são negativos para RE, RP e HER2 e expressam citoqueratinas basais e/ou EGFR⁸⁻¹⁰. Um dos pontos mais controversos nessa classificação alternativa imuno-histoquímica se refere à exata caracterização dos casos luminais B. Enquanto alguns incluem nesse grupo os casos com coexpressão de receptores e HER2⁹, outros definem todos os casos HER2 positivos como pertencentes ao grupo HER2, independentemente da expressão de receptores⁸. Por outro lado, não há dúvida de que os luminais A diferem dos B por causa de maior atividade proliferativa, em geral relacionada à coexpressão de HER2 ou à ativação da via não genômica do RE¹¹. Neste estudo a preferência é pela abordagem de Carey *et al.*⁹, que define os luminais pela expressão de pelo menos uma proteína receptora de esteroide. Outro grupo com controvérsias crescentes é o dos carcinomas triplo-negativos, pois é bastante heterogêneo e não equivale ao grupo dos carcinomas basais-símiles¹³, mas inclui esses tumores, caracterizados pela expressão de citoqueratinas basais e/ou EGFR⁸⁻¹⁰. Mais recentemente os carcinomas triplo-negativos têm sido estratificados em tipos mioepitelial e basal, com significativa implicação prognóstica¹⁴. De fato, a diferenciação mioepitelial em carcinomas mamários já vinha intrigando os estudiosos^{8,15}.

ARTIGO ORIGINAL

Caracterização anatomopatológica e imunofenotípica de carcinomas de mama em mulheres jovens

Bacchi LM *et al.*

Ela é característica dos carcinomas metaplásicos, um grupo histológico bastante agressivo¹⁵. Por outro lado, diferenciação mioepitelial é também característica do carcinoma adeno-cístico, tipo histológico de prognóstico favorável¹⁶. Foi nesse cenário, em que grupos genéticos distintos se traduzem por fenótipos morfológico e imuno-histoquímico próprios, que este estudo se propôs a analisar a apresentação anatomopatológica dos carcinomas mamários em mulheres jovens, comumente relacionados a pior prognóstico^{16,17}. Os resultados deste estudo comprovam diferenças morfológicas e imunofenotípicas significativas nos dois grupos, possivelmente relacionadas a maior agressividade. Nas mulheres jovens, embora o tipo molecular luminal seja ainda o mais frequente, a fração dos tumores não hormônio-sensíveis, tanto o grupo HER2 quanto o triplo-negativo, é maior. Os carcinomas em jovens são mais frequentemente pouco diferenciados e apresentam maiores taxas de embolização vascular. Esses resultados estão de acordo com o que começa a ser descrito na literatura. Em estudo que comparou carcinomas mamários em mulheres até 45 anos e com 65 anos ou mais, o primeiro grupo apresentou tumores maiores, maior positividade de linfonodos, menores níveis de expressão imuno-histoquímica de receptor de estrogênio e HER2 e mais tumores de alto grau¹⁸. Essas diferenças têm base genética, como demonstra este mesmo estudo. O próximo passo é identificar subgrupos biologicamente distintos dentro dos diferentes perfis moleculares clássicos, particularmente no grupo de carcinomas triplo-negativos, um dos maiores desafios na atualidade.

Referências

1. Greene FL, Page DL, Fleming ID, Fritz A, Balch CM, Haller DG, et al. AJCC Cancer Staging Manual. 6th ed. New York, NY: Springer-Verlag; 2002.
2. Goldrirsch A, Wood, WC, Gelber RD, Coates AS, Thürlimann B, Senn HJ; 10th St. Gallen conference et al. Progress and promise: highlights of the international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2007. *Ann Oncol.* 2007;18:1133-44.
3. Adjuvant! Online – Decision making tools for health care professionals [Online]. 2008. Disponível em: <http://www.adjuvantonline.com>
4. Fitzgibbons PL, Page DL, Weaver D, Thor AD, Allred DC, Clark GM, et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. *Arch Pathol Lab Med.* 2000;124:966-78.
5. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, Van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2000;406(6797):747-52.
6. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2001;98:10869-74.
7. Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, Børresen-Dale AL. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics.* 2006;26(7):127.
8. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5367-74.
9. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA.* 2006;295:2492-502.
10. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res.* 2008;14:1368-76.
11. Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, Pusztai L, Hortobágyi GN. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *The Oncologist.* 2008;13:477-93.
12. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, Perou CM. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006;19:264-71.
13. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. *J Clin Pathol.* 2008;61:553-60.
14. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol.* 2006;208:495-506.
15. Leibl S, Gogg-Kammerer M, Sommersacher A, Denk H, Moinfar F. Metaplastic breast carcinomas: are they of myoepithelial differentiation? Immunohistochemical profile of the sarcomatoid subtype using novel myoepithelial markers. *Am J Surg Pathol.* 2005;29:347-53.
16. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol.* 2008;216:141-50.
17. El Saghir NS, Seoud M, Khalil MK, Charafeddine M, Salem ZK, Geara FB, et al. Effects of young age at presentation on survival in breast cancer. *BMC Cancer.* 2006;6:194.
18. Anders CK, Hsu DS, Broadwater G, Acharya CR, Foekens JA, Zhang Y, et al. Young age at diagnosis correlates with worse prognosis and defines a subset of breast cancers with shared patterns of gene expression. *J Clin Oncol.* 2008;26:3324-30.