

Maria João da Silva Fernandes Leal Carvalho

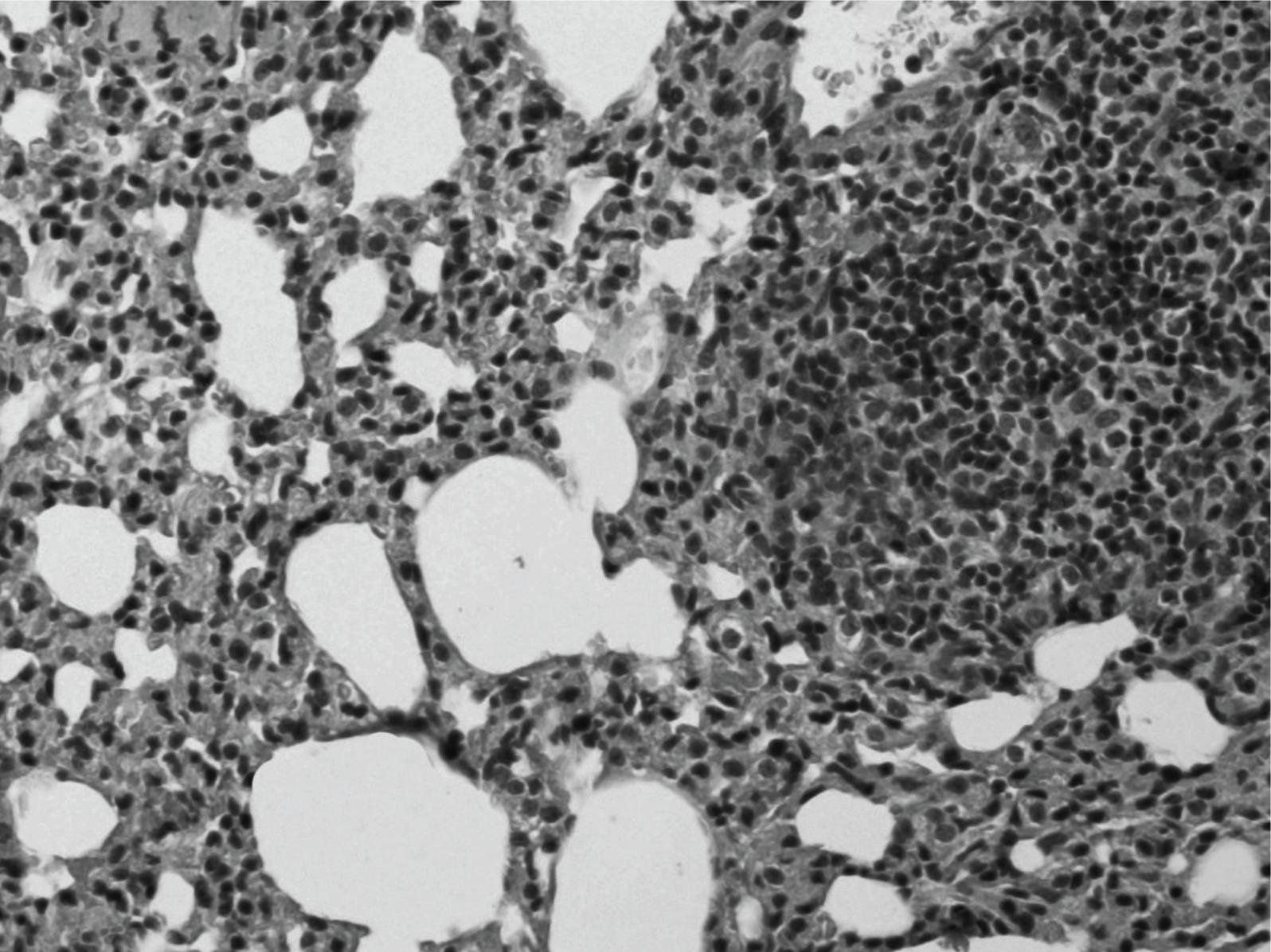
**PADRÃO DE METASTIZAÇÃO DAS CÉLULAS
TUMORAIS DA MAMA**

|

2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA



Maria João da Silva Fernandes Leal Carvalho

**PADRÃO DE METASTIZAÇÃO DAS CÉLULAS
TUMORAIS DA MAMA**

|

2010



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Maria João da Silva Fernandes Leal Carvalho

**PADRÃO DE METASTIZAÇÃO DAS CÉLULAS
TUMORAIS DA MAMA**

Tese de Mestrado em Patologia Experimental

|

**Orientador: Professor Doutor Carlos Freire de Oliveira
Co-orientador: Professor Doutor António Silvério Cabrita**



FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA

	Página
AGRADECIMENTOS	6
RESUMO	10
ABSTRACT	14
ABREVIATURAS	17
CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO	21
1. Cancro da mama – Epidemiologia	22
2. Histologia	25
3. Factores de prognóstico clássicos	27
4. Receptores de estrogénios	29
5. Receptores de progesterona	33
6. Expressão Her-2	35
7. Classificação molecular do cancro da mama	40
8. Tumores triplos negativos e tumores basal- <i>like</i>	43
9. Metastização do cancro da mama	46
10. Vias de metastização	52
11. Locais de metastização	56
CAPÍTULO II – OBJECTIVOS	60
CAPÍTULO III – MATERIAL E MÉTODOS	63
1. Estudos <i>in vitro</i> – Culturas celulares	64
2. Estudos <i>in vivo</i>	65
2.1 Administração de células tumorais MCF-7 e HCC1806	65
2.2 Imagiologia Nucleas – Radiofármacos utilizados	66

	Página
2.2.1 Preparação e Controlo de qualidade do ^{99m}Tc -MIBI	68
2.2.2 Preparação e Controlo de qualidade do ^{99m}Tc -HMDP	70
2.2.3 Imagiologia com os radiofármacos	73
3. Estudos <i>ex vivo</i>	75
3.1 Histologia e morfometrial	75
3.3 Imunohistoquímica	76
4. Análise estatística	77
CAPÍTULO IV – RESULTADOS	78
1. Estudos de imagiológicos	79
2. Estudos <i>ex vivo</i>	82
2.1 Metastização pulmonar	83
2.2 Metastização hepática	94
2.3 Estudo imunohistoquímico	103
CAPÍTULO V – DISCUSSÃO	109
1. Modelo animal	111
2. Estudos imagiológicos	113
3. Locais de metastização	115
4. Análise imunohistoquímica	119
CAPÍTULO VI – CONCLUSÕES	124
CAPÍTULO VII – BIBLIOGRAFIA	127

Este documento representa um estudo de investigação para uma dissertação de Mestrado individual. No entanto, todo o trabalho, desde a ideia inicial, projecto, trabalho experimental e redacção, não seria possível sem o contributo de todos os que colaboraram nestas etapas. Vinca-se aqui este reconhecimento e o mais sincero agradecimento.

Ao Professor Doutor Carlos Freire de Oliveira, pela orientação, estímulo, ensinamentos, paciência, disponibilidade, confiança e partilha do conhecimento científico e visão de investigador clínico.

Ao Professor Doutor António Silvério Cabrita, Coordenador do Mestrado de Patologia Experimental, co-orientador deste trabalho, pelo apoio prestado desde a fase curricular do Mestrado até à elaboração deste Projecto, agradeço toda a disponibilidade e ensinamentos para concluir este estudo.

À Professora Doutora Maria Filomena Botelho, que me abriu as portas à investigação básica, com disponibilidade e apoio incondicional em todas as etapas do trabalho experimental. Todos os conselhos e críticas, fruto de uma visão de Investigadora, foram contributos fundamentais para ultrapassar os obstáculos.

Ao Serviço de Ginecologia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, particularmente à Directora Professora Doutora Isabel Torgal, Professora Regente de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, que sempre me apoiou e foi disponível em todas as etapas da minha formação clínica e académica.

Ao Serviço de Obstetrícia dos Hospitais da Universidade de Coimbra, dirigido pelo Professor Doutor Paulo Moura, que sempre motivou a formação académica. Vinco o apoio incondicional dos meus orientadores de internato Dra. Teresa Sousa Fernandes

e Dr. Francisco Falcão, independentemente das áreas a que me dedico.

Agradeço também aos outros Docentes de Ginecologia da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, Professor Doutor Fernando Mota e Professora Doutora Margarida Dias, que sempre apoiaram a progressão académica dos internos do Serviço.

Ao CIMAGO, Centro de Investigação em Meio Ambiente, Genética e Oncobiologia, que apoiou financeiramente este Projecto desde a sua fase embrionária.

À Mestre Ana Margarida Abrantes, paciente, incansável e disponível em todas as fases deste estudo experimental, amiga e compreensiva, que permitiu que a minha inexperiência não fosse um obstáculo.

À Dra. Mafalda Laranjo, que também incondicionalmente transmitiu ensinamentos de investigação básica, foi permanentemente disponível, companheira e amiga desde o meu primeiro dia no Instituto de Biofísica e Biomatemática.

Agradeço ainda o contributo de outros elementos do Instituto de Biofísica e Biomatemática, IBILI, Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra. À Dra. Joana Rio pela disponibilidade e contributo fundamental nos estudos imagiológicos.

Ao Instituto de Patologia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra, particularmente ao Dr. Rodrigo Farinha, D^a. Margarida Menezes e Sr. Pedro Barreto, que ajudaram decisivamente nos estudos histológicos e imunohistoquímicos.

Aos meus colegas do Internato de Ginecologia e Obstetrícia, pelo companheirismo, amizade e flexibilidade que possibilitou a execução deste projecto.

Aos colegas do Mestrado de Patologia Experimental, companheiros na etapa

curricular e motivadores para a etapa final do estudo experimental.

Ao Miguel, meu companheiro incondicional em todos os momentos dos últimos anos.

Aos meus familiares, particularmente à minha mãe e todos os amigos que estimulam os objectivos a que me proponho.

A todos os que de alguma forma contribuíram para esta dissertação, o meu muito obrigada.

Os tumores triplos negativos (TN) são um grupo de cancros da mama com um comportamento clínico mais grave. A metastização precoce constitui um dos factores que contribui para esta agressividade. Alguns estudos clínicos sugerem uma metastização característica e a preferência pela disseminação hematogénica. Apesar destes dados, a metastização característica de cada tipo celular de cancro da mama não está ainda estabelecida.

O objectivo deste estudo é a caracterização da disseminação metastática *in vivo* das linhas celulares de tumores da mama que expressam receptores hormonais (HR) e a comparação com as células TN, após injeção na veia da cauda. Assim, pretende-se determinar um perfil característico, particularmente considerando a metastização pulmonar e hepática.

Para estudar a disseminação metastática, utilizaram-se ratinhos fêmea *Balb/c nu nu* com 4-6 semanas de idade nos quais se injectou na veia da cauda $1,5 \times 10^6$ células de cada linha celular de cancro da mama (MCF7 e HCC1806), marcadas com ^{99m}Tc -HMPAO. Realizaram-se estudos imagiológicos com ^{99m}Tc -HMDP e ^{99m}Tc -MIBI entre a 7ª e 8ª semana. Os animais foram sacrificados 8 semanas após a injeção e os pulmões, fígado, rins, cérebro e todos os locais com lesões suspeitas foram colhidos para análise histológica. Para o estudo morfométrico foram utilizadas imagens histológicas e o respectivo traçado de *regions of interest* (ROIs), para obter a área das lesões em pixels. O estudo imunohistoquímico (IHQ) analisou a expressão de receptores de estrogénios (RE), receptores de progesterona (RP), HerB-2 e CK5/6, marcador *basal-like*.

A injeção de células tumorais marcadas com ^{99m}Tc -HMPAO mostrou embolização preferencial para os pulmões. Os estudos imagiológicos com ^{99m}Tc -HMDP

e ^{99m}Tc -MIBI revelaram um caso de metastização óssea e outro de metastização pélvica no grupo MCF7. A análise por ROI não revelou alterações significativas de acordo com os diferentes tipos celulares injectados.

Considerando a análise pulmonar, em todos os animais injectados foram descritos focos de metastização no estudo histológico. O número de focos pulmonares não foi significativamente diferente considerando injeção com MCF7 e HCC1806. No entanto, a área média das metástases pulmonares nos casos MCF7 foram significativamente maiores que nos casos HCC1806 ($p=0,023$). O estudo histológico hepático mostrou metastização em 47%. O número de focos metastáticos foi superior no grupo injectado com HCC1806 em relação ao MCF7, atingindo significado estatístico ($p=0,006$). Relativamente à área média das metástases hepáticas não se verificaram diferenças ($p=n.s.$). A regressão logística revelou um modelo potencial de metastização hepática com HCC1806 (odds ratio=16; $p=0,03$). O número e a área dos focos de metastização pulmonar não foram preditivos da metastização hepática.

O estudo da metastização pulmonar mostrou RE positivos em 57,1% no grupo MCF7, comparando com 80% no grupo HCC1806. Os RP mantiveram positividade em 42,9% dos casos MCF7 e negatividade em 60% dos HCC1806. HerB-2 foi positivo num caso HCC1806. Neste grupo foi descrito um caso CK5/6 positivo.

Os ratinhos injectados na veia da cauda com células de cancro da mama RH positivos apresentaram maior área de metastização pulmonar. Os focos de metastização hepática foram mais relevantes nas linhas celulares TN comparativamente com as RH positivos. As células TN parecem potenciar a metastização hepática. A alteração da expressão de RE e RP na metástase não foi significativamente diferente considerando a expressão da célula de origem. O HerB-2 manteve-se maioritariamente negativo. Na

metástase, o fenótipo basal-*like* (CK5/6 positivo) foi descrito num caso originalmente TN.

Triple negative (TN) tumors are a group of breast cancers with a severe clinical behavior. The early metastization is one of the factors that contribute to its aggressiveness. Some clinical studies suggest a differential metastatic spread and a preference for hematogeneous dissemination. Despite this, it is not established a metastatic profile characteristic of each breast cancer type.

The aim of this study is to characterize the metastatic spread *in vivo* of breast cancer cell lines that express hormonal receptors (HR) comparing with TN after injection in the mice tail vein. The objective is to determine a specific metastization profile, particularly considering the lung and the liver.

To study the metastization profile, female *Balb/c nu nu* mice with 4-6 weeks of age were injected with 1.5×10^6 cells of each breast cancer cell line (MCF7 and HCC1806) labeled with ^{99m}Tc -HMPAO. Imagiological studies with ^{99m}Tc -HMDP and ^{99m}Tc -MIBI were performed between 7th and 8th weeks. Animals were sacrificed after 8 weeks of cell injection and the lungs, liver, kidneys, brain and all sites with suspicious lesion were collected for histological analysis. For morphometric studies, a histological image analysis focusing on regions of interest (ROIs) were used, in order to obtain lesion areas in pixels. Immunohistochemical (IHC) studies were focused on estrogens receptors (ER), progesteron receptors (PR), HerbB-2 and CK5/6, a basal-like marker.

Tumor cells injected labeled with ^{99m}Tc -HMPAO showed a preference embolization to the lungs. Imagiological studies with ^{99m}Tc -HMDP and ^{99m}Tc -MIBI revealed a case of bone and other of pelvic metastasis in the MCF7 group. The ROI analysis did not reveal significant differences according with each cell type injection.

Considering lung analysis, in all animals injected were found metastatic foci on the histological study. On one hand, the number of lung foci was not significantly different considering MCF7 and HCC1806 injection. On the other hand, the mean area of lung metastasis in MCF7 cases were significantly higher than in HCC1806 ($p=0.023$). The histological study of liver showed 47% of metastasis. The number of liver foci was higher in the group injected with HCC1806 than MCF7, reaching statistical significance ($p=0.006$). Mean area of liver metastasis was not significantly different ($p=n.s.$). The logistic regression revealed a potentiating model for liver metastasis with HCC1806 (odds ratio=16; $p=0.03$). The number and area of lung metastasis foci were not predictive of liver dissemination.

Lung metastasis study showed ER positive in 57.1% of MCF7 group, compared with 80% of HCC1806 group. PR maintained positivity in 42.9% of MCF7 cases and negativity in 60% of HCC1806. HerB-2 was positive in one case of HCC1806 cells. In this group was described only one case of CK5/6 positivity.

The mice injected with HR positive breast cancer cells in the tail vein were associated with huge lung metastatic areas. Liver metastization foci were more relevant in TN than HR positive cell lines. TN cells seem to potentiate liver metastasis. The alteration of ER and PR expression in metastasis were not significantly different considering the original cell expression. HerB-2 kept mainly negative. In metastasis, basal-like phenotype (CK5/6 positive) was found in one case of primary TN cells.

.AMF - *Autocrine motility factor*

AKT ou PKB - *protein kinase B*

ATCC - *American Type Culture Collection*

BL – tumores basal-like

BRSMS1 - *breast cancer metastasis-suppressor 1*

CCR7 - *C-C chemokine receptor type 7*

CDI - carcinoma ductal invasivo

CDK2 - ciclin-2 dependent kinase protein

CK - citoqueratinas

CLI - carcinoma lobular invasivo

cMET - *cell motility factor receptor*

CMF - ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracilo

CXCL12 - *stromal-derived-factor-1*

CXCR4 - *cytokin receptor specific for stromal-derived-factor-1*

DLD - domínio central de ligação ao DNA

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DNA – *desoxirribonucleic acid*

DNAc - DNA complementar

EIE - ensaio imunoenzimático

EGFR - *epidermal growth factor receptor*

ErbB-2 - receptor da superfamília dos receptores *epidermal growth factor* derivado do oncogene dominante *HER-2*

EUA - Estados Unidos da América

FAK – *focal adhesion kinase*

FDA - *Food and drug administration*

¹⁸F-FDG - ¹⁸F-Fluordesoxiglicose

FGF - *fibroblast growth factor*

FISH - *fluorescence in situ hybridization*

GnRH - *gonadotrophin-releasing hormone*

GS - gânglio sentinela

HER-2 - *human epidermal growth factor receptor-2*

HER2/neu – Gene do *human epidermal growth factor receptor-2*

HIF-1 - *hipoxia inducible factor-1*

HLD - domínio carboxil terminal de ligação hormonal

HMDP- Hidroximetildifosfonato

HMPAO - *Hexamethylpropyleneamine Oxime*

IL-2 - interleucina 2

IGF- *insulin-like growth factor*

IGF-1 - *insulin-like growth factor-1*

IGF-2 - *insulin-like growth factor-2*

IHQ – imunohistoquímica

KAI1 - *Kang-ai 1*

MAPK - mitogen-activated protein kinase

MIBI - Metoxisobutilisonitrilo

MKK4 - *mitogen activated protein kinase kinase 4*

MPPs - *matrix metalloproteases*

Nf- κ B - *nuclear factor kappa B*

Nm23 - *Non-metastatic clone#23*

OMS - Organização Mundial de Saúde

PARP1 – *poli(ADP-ribose) polimerase-1*

PBS - *phosphate-buffered saline*

PDGF- β - *platelet-derived growth factor- β*

- PI3K** - *phosphoinositide 3-kinase*
- pRC** - resposta patológica completa
- PTHrP** - *parathyroid hormone-related protein*
- RANKL** - ligando do receptor activador do NFκB
- RANK** - receptor activador do NFκB
- RKIP** - *Raf kinase inhibitor protein*
- RNA** – *ribonucleic acid*
- RNA_m** - RNA mensageiro
- ROIs** - *regions of interest*
- RPMI-1640** - *Roswell Park Memorial Institute-1640*
- RT-PCR** - *real time-polymerase chain reaction*
- SERDs** - reguladores selectivos dos receptores de estrogénios
- SERMS** - moduladores selectivos dos receptores de estrogénios
- RE** - Receptores de estrogénios
- RH** - receptores hormonais
- RP** - receptores de progesterona
- ^{99m}Tc** - *tecnécio-99 metastável*
- TGF-α** - *transforming growth factor-α*
- TGF-β** - *transforming growth factor-β*
- THM** - terapêutica hormonal da menopausa
- TIMPs** – *tissue inhibitors of metalloproteinases*
- TN** – tumores triplos negativos
- TNF** - *tumor necrosis factor*
- UPA** – *urokinase plasminogen activator*
- VEGF** - *vascular endothelial growth factor*

1. Cancro da mama – Epidemiologia

O cancro da mama tem um impacto considerável no contexto da saúde pública e em particular da mulher. Na Europa, a incidência de cancro da mama representa cerca de 13% de todos os cancros, sendo globalmente o terceiro mais frequente, precedido pelo cancro do pulmão e pelo cancro colorectal¹. Na mulher, são diagnosticados, por ano na Europa, cerca de 370 100 novos casos, o que representa 27,4% de todos os cancros no sexo feminino. Nos Estados Unidos da América (EUA) estima-se que o risco de cancro da mama até aos 85 anos afecte 1 em 8 indivíduos, correspondendo a cerca de 12,5%². Em 2004 morreram 129 900 mulheres na Europa devido ao cancro da mama¹. Em Portugal detectam-se cerca de 4 300 novos casos por ano e morrem anualmente cerca de 1500 mulheres, sendo a principal causa de morte por cancro neste sexo³.

A incidência do cancro da mama nos EUA diminuiu 3,5% ao ano entre 2001 e 2004 pela primeira vez desde 1980⁴. Este facto reflecte questões relacionadas com o diagnóstico devido ao maior número de mamografias e diminuição da utilização de terapêutica hormonal de substituição^{5,6}. Esta tendência também foi descrita na Europa⁷. Em Portugal observou-se uma diminuição na taxa de mortalidade desde o início da década de 90, cerca de 2% ao ano³. A detecção precoce no contexto dos programas de rastreio e o acesso a tratamento eficaz parecem justificar esta constatação.

A incidência do cancro da mama é maior nos EUA e Norte da Europa, Austrália e Nova Zelândia. Verifica-se um decréscimo no Sul e Leste da Europa e na América do Sul, com excepção da Argentina, e observam-se taxas menores nos países asiáticos. Esta

diferença estreitou-se desde a década de 70, podendo reflectir uma aproximação ao estilo de vida e padrão reprodutivo da civilização ocidental^{8,9}.

A incidência do cancro da mama aumenta com a idade, sendo incomum em mulheres com menos de 35 anos. Na região Centro de Portugal, o cancro da mama antes dos 35 anos representa 2,9% dos diagnósticos entre 1999 e 2006¹⁰. Nos EUA, entre 1996 a 2000 foram diagnosticados 25 casos por cada 100 000, considerando idades entre 30 e 34 anos¹¹. No mesmo período entre os 45 e 49 anos este número atinge 198 casos por 100 000¹¹. Estes casos ascendem até 476 por 100 000 entre os 70 e 74 anos. Descreve-se uma estabilização entre os 45 e 50 anos, reflectindo o envolvimento hormonal no cancro da mama, sendo que esta constatação não se verifica em tumores não hormono-dependentes¹².

Os factores reprodutivos relacionam-se com risco de cancro da mama, uma vez que as hormonas ováricas têm um papel na iniciação do desenvolvimento mamário. Para além deste facto, o ciclo menstrual também regula a proliferação mamária. A menarca representa o início de todo este processo maturativo. A idade precoce da menarca tem sido associada ao aumento do risco de cancro da mama e esta relação observa-se tanto na pré-menopausa como na pós-menopausa¹³. Uma menarca precoce condiciona uma maior precocidade de maturidade do eixo hipotálamo-hipófise-ovário, relacionando-se com uma exposição mais precoce às hormonas endógenas.

A duração do ciclo menstrual não tem uma associação consistente entre os diferentes estudos. Porém, ciclos curtos na idade reprodutiva reflectem maior número de

ciclos, logo maior tempo global de exposição a estrogénios e progesterona na fase luteal. Este contexto pode justificar o aumento do risco em mulheres com ciclos curtos comparando com ciclos longos¹⁴.

A nuliparidade apresenta risco aumentado de cancro da mama, sendo um factor mais relevante após os 40 a 45 anos. A idade precoce de uma gestação a termo associa-se a um menor risco de cancro da mama¹³. A primeira gravidez abaixo dos 25 anos reduz o risco de cancro da mama em 36%¹⁵.

A menopausa em idade precoce também se associa a menor risco de cancro da mama, conforme constatado em ooforectomizadas¹⁶. Estima-se que este risco aumente 3% por cada ano de atraso na menopausa¹⁶.

A utilização de contraceptivos hormonais tem sido tema fastidiosamente abordado em diversos estudos, no entanto não foram delineados efeitos diferencialmente relevantes. O risco apontado tem sido baixo, mesmo em mulheres que utilizam este tipo de contracepção durante mais de 10 anos^{17,18}. O risco poderá ser maior se a utilização de contracepção hormonal tiver sido iniciada em idades jovens¹⁸. As mulheres jovens (menos de 45 anos) que reportam toma actual de contraceptivos hormonais apresentam um risco ligeiramente aumentado, no entanto este número de casos contribuiu para um escasso aumento dos cancros da mama em termos absolutos.

Na década de 70 a terapêutica hormonal da menopausa (THM) atingiu níveis de prescrição consideráveis, particularmente nos EUA. Posteriormente as formulações e formas de administração mostraram uma modificação substancial. Os estudos

demonstraram, consistentemente, um aumento do risco entre utilizadoras de THM *versus* não utilizadoras^{19,20}. O risco parece particularmente importante se a THM persistir por longos períodos e no momento do diagnóstico de cancro²¹. A terapêutica combinada (estroprogestativa) apresenta risco maior que a terapêutica estrogénica isolada, que não aumenta o risco²¹.

2. Histologia

O cancro da mama corresponde a um grupo heterogéneo de lesões que diferem grandemente na sua apresentação clínica, padrão radiológico, características patológicas e comportamento biológico.

A distribuição dos tipos histológicos varia de acordo com os estudos publicados. Aparentemente este facto deve-se a diversos factores como a população estudada e variabilidade nos critérios de diferenciação histológica. Actualmente a classificação do cancro da mama invasivo baseia-se nos critérios da Organização Mundial de Saúde (OMS)²².

O exame histopatológico de rotina é, na actualidade, muito mais que a simples determinação do tipo histológico. Apesar desta determinação só por si ter implicações prognósticas importantes, outras alterações morfológicas também podem reflectir diferentes comportamentos.

Muitos cancros invasivos estão associados à presença de um componente *in situ* cuja extensão é variável. Esta perspectiva salienta a origem dos tumores invasivos a

partir dos carcinomas *in situ*²³ tendo, inclusivamente, sido já reportadas alterações fenotípicas e genéticas semelhantes²⁴.

O carcinoma ductal invasivo (CDI) é o grupo mais representativo de cancros invasivos da mama. Em cerca de 30 % dos CDI são reportados tipos histológicos mistos²². As células tumorais arranjam-se em estruturas glandulares com o formato de ninhos, cordões ou trabéculas de diferentes tamanhos nos quais, por vezes ocorrem focos de necrose. Do ponto de vista citológico a célula pode ser morfológicamente semelhante à célula epitelial mamária normal ou exibir pleomorfismo marcado e atipia nuclear. O grau de atipia citonuclear foi estabelecido por *Bloom* e *Richardson*, que distinguiram 3 tipos, grau 1, bem diferenciados, grau 2, moderadamente diferenciados e grau 3, pouco diferenciados. Mais tarde *Elston* e *Ellis* modificaram esta escala de acordo com a formação de túbulos, pleomorfismo nuclear e actividade mitótica²⁵.

O carcinoma lobular invasivo (CLI) representa 5-15% dos cancros da mama²⁶. A morfologia clássica reflecte-se em conjunto de células tumorais pequenas e uniformes, com núcleos esféricos crescendo em sentido linear individualizado e de forma concêntrica²⁶. Ao longo dos anos foram descritas variantes, como alveolares, sólidos, túbulo-lobulares, pleomórficos e mistos²⁷. O CLI tem demonstrado uma propensão à recidiva local e maior incidência de doença multicêntrica e contralateral^{28,29}.

Do ponto de vista histológico existem outros tipos menos frequentes como o carcinoma tubular, mucinoso, medular, cribiforme invasivo, papilar invasivo, micropapilar invasivo, metaplásico e secretor.

3. Factores de prognóstico clássicos

A metastização ganglionar axilar é considerada o factor de prognóstico isolado mais importante em doentes com cancro da mama^{30, 31}. O estadiamento axilar é determinado após exame histológico de pelo menos 10 gânglios removidos cirurgicamente³². O esvaziamento axilar foi considerado uma intervenção terapêutica para eliminar a doença regional³³. Tornou-se mais tarde um procedimento de estadiamento cirúrgico³⁴. Com o advento da técnica do gânglio sentinela (GS) nos cancros da mama iniciais (T0-T2, N0), pode obter-se a mesma informação, evitando-se grande parte da morbilidade associada ao esvaziamento axilar³⁵. O exame histopatológico do GS é mais detalhado do que a análise tradicional de gânglios axilares^{30,31}. A cirurgia axilar adicional depende do *status* do GS. O GS é sujeito a múltiplos cortes histológicos e estudos imuno-histoquímicos (IHQ) com identificação das diferentes isoformas das citoqueratinas. Esta metodologia levou a um aumento na detecção do envolvimento ganglionar mínimo, classificada como micrometástases (0,2-2mm; pN1mi) e células tumorais isoladas (ITC) (<0,2 mm; pN0 (i+))^{30,36}.

O tamanho do tumor é outro factor de prognóstico consensual entre diversos trabalhos, correlacionado com a metastização axilar e com o comportamento clínico. O tamanho do tumor tem implicações prognósticas independentes da metastização axilar e tem particular valor nos casos de ausência de metastização ganglionar^{37,38}. A sobrevivência livre de doença em mulheres com gânglios negativos varia de acordo com a dimensão tumoral. Tumores com menos de 1 cm apresentam sobrevivência livre de

doença de 88% aos 20 anos, enquanto se verifica apenas 72% em tumores de 1,1 a 2 cm³⁹. De um modo global considera-se que os tumores com dimensões menores que 1 cm têm prognóstico bastante favorável, reportando-se intervalos livres de doença de mais de 90% aos 5-10 anos⁴⁰. Um problema controverso na dimensão tumoral é a presença de vários focos de carcinoma invasivo. A maior probabilidade de metastização axilar em tumores multifocais foi relatada nos tipos lobulares e tubulolobulares⁴¹.

A diferenciação do grau citonuclear também é um factor considerado na estratificação prognóstica. Genericamente verifica-se que os tumores pouco diferenciados apresentam maior incidência de doença metastática e pior sobrevivência⁴². Alguns estudos referem-se sobretudo a uma implicação do grau de diferenciação no período de recorrência, em detrimento de uma implicação directa na taxa de recorrência⁴³. O grau de diferenciação também é um factor preditivo de resposta à terapêutica sistémica. Assim, tumores de alto grau respondem melhor à quimioterapia que tumores de baixo grau⁴⁴.

A invasão linfovascular representa outro factor prognóstico independente. A sua maior importância reporta-se aos casos com gânglios negativos que possam ter maior risco de invasão axilar⁴⁵. A invasão linfovascular estratifica um grupo de doentes com gânglios negativos que apresentam um maior risco de metastização.

4. Receptores de estrogénios

A existência dos receptores de estrogénios (RE) foi pela primeira vez tida em conta no início da década de 60, quando se detectou elevada concentração de estrogénios em órgãos alvo e cancros da mama humanos. Esta constatação tornou clara a dependência de estrogénios no crescimento do cancro da mama.

Os RE pertencem a uma superfamília de receptores hormonais nucleares, que engloba também os receptores de progesterona (RP), hormonas tiroideas, vitamina D e ácido retinóico. Funcionalmente representam factores de transcrição quando activados pelo respectivo ligando. Os RE clássicos (RE α) contêm 595 aminoácidos e o seu gene foi identificado no cromossoma 6. Outro tipo de receptores foi mais recentemente descrito, RE β , constituído por 530 a 548 aminoácidos, codificado no cromossoma 14⁴⁶. Globalmente, a homologia entre RE α e RE β é de cerca de 47%. Os RE contêm um domínio central de ligação ao DNA (DLD) ao qual se segue uma região funcional C que tem 95% de homologia entre os dois tipos de receptores⁴⁷. Noutra extremidade identifica-se um domínio carboxil terminal de ligação hormonal (HLD). Existe ainda um domínio de ligação do ligando que apresenta uma homologia de 53% entre os RE α e RE β ⁴⁸. Os RE β têm dimensões inferiores aos RE α .

Os estrogénios ligados aos RE homodimerizam ou heterodimerizam e ligam-se ao DNA pelo DLD. A ligação ao DNA promove activação de genes que respondem aos estrogénios.

As diferenças de homologia e de dimensões dos dois tipos de RE reflectem uma fisiologia e afinidade selectiva distinta para os ligandos. A expressão de RE β foi associada a um comportamento biológico tumoral mais agressivo⁴⁹. Os RE β poderão assim constituir uma ferramenta na prática clínica como marcador prognóstico, no entanto ainda existe controvérsia no seu contributo para a progressão tumoral.

Com a identificação do DNA complementar (DNAc), foram publicados alguns trabalhos acerca da alteração da estrutura genómica dos RE relacionada com o cancro da mama. Uma situação pertinente neste contexto é a presença de deleções ou rearranjos em tumores que não expressam RE. No entanto esta hipótese não foi confirmada pelos estudos posteriores^{50,51}. A ausência dos RE parece dever-se a alterações da transcrição⁵². A justificação para a falta de expressão de RE pode assentar em fenómenos de metilação do gene^{53,54}.

A transcrição de RE regula componentes de vias transductoras de sinal que promovem a proliferação e sobrevivência das células tumorais da mama. Os RE ligados a estrogénios promovem a expressão de factores de crescimento como o *transforming growth factor- α* (TGF- α) e o *insulin-like growth factor-2* (IGF-2), receptores de factores de crescimento tirosina cinase (como IGF-1) e outros intermediários da sinalização celular como o receptor do substrato insulínico-1^{55,56}, assim como parecem inibir elementos negativos das vias de transdução de sinal, como *transforming growth factor- β* (TGF- β) e fosfatases da tirosina cinase⁵⁵.

Existe uma diversidade de métodos utilizados para a avaliação e quantificação dos receptores hormonais. As técnicas baseadas na utilização de anticorpos monoclonais são

as metodologias actualmente aplicadas na rotina. A estratégia de análise pode ser a IHQ e o ensaio imunoenzimático (EIE). A IHQ pode ser realizada em secções tumorais fixadas em formol, incluídas em blocos de parafina ou criofixadas. Esta metodologia também é aplicada em material de citopunção, biopsias e células provenientes de fluidos corporais. Dependendo do epitopo considerado, é possível distinguir diferentes receptores, como é o caso de RE α e RE β . A aplicação de análise computadorizada veio tentar colmatar alguma subjectividade na quantificação dos resultados. No EIE a identificação de receptores hormonais (RH) depende da análise espectrofotométrica da amostra com o anticorpo incubado. Esta técnica parece ter maior objectividade e quantificação específica, no entanto requer tumores de maiores dimensões e tecido criofixado.

Na prática clínica, foram introduzidos fármacos que interagem com os RE, concretamente os moduladores selectivos dos receptores de estrogénios (SERMS), inibidores da aromatase, reguladores selectivos dos receptores de estrogénios (SERDs) e análogos da *gonadotrophin-releasing hormone* (GnRH). O tamoxifeno e o raloxifeno pertencem à classe dos SERMS. O primeiro e porventura o modulador mais estudado é a terapêutica dirigida com mais impacto na abordagem terapêutica. Os inibidores da aromatase reduzem os níveis de estrogénios circulantes, são classificados em inibidores esteróides irreversíveis, como é o caso do exemestano e em inibidores não esteróides, como o letrozol e anastrozol.

Os estudos clínicos mostram que cerca de 30 a 40% dos doentes com cancro da mama metastizado respondem à hormonoterapia^{57,58}. Outra fracção substancial permanece estável clinicamente sob terapêutica adjuvante. Apesar de uma melhor taxa

de resposta à quimioterapia clássica (50-60%), a terapêutica hormonal é relativamente pouco tóxica e o efeito supressor pode ser duradouro⁵⁹. A avaliação sistemática da expressão de RH (RE e RP) tem a grande vantagem da selecção dos doentes que beneficiam de hormonoterapia adjuvante assim como aqueles que beneficiam de outro tipo de estratégias.

O benefício da hormonoterapia em doentes com cancro da mama RE positivos é de cerca de 50-60%, comparando com apenas 10% nos casos sem expressão de RE^{57,60}. Na doença metastática a resposta vai depender da manutenção destes receptores em relação ao tumor primitivo. Num estudo com o objectivo de avaliar esta problemática, constatou-se que 10 a 20 % dos tumores primitivos que expressam RE apresentam RE negativos nas metástases⁶¹. Deste modo a taxa de resposta à terapêutica endócrina nestes casos foi de 12% comparada com 74% quando a expressão de RE se mantém na metastização. A intensidade da positividade de RE também se correlaciona com uma melhor resposta terapêutica^{57,62}. A presença de RP associada aos RE também potencia esta resposta⁶³.

A aplicação da hormonoterapia após terapêutica cirúrgica primária visa estabilizar a doença, impedindo o aparecimento de recidivas e disseminação da doença. Foi inequívoca a demonstração de que a hormonoterapia adjuvante (tamoxifeno) reduz o risco de recorrência em doentes com RE. Por outro lado, verifica-se que os tumores sem RE beneficiam mais dos citostáticos, com uma redução do risco de 35% comparado com 20% nos casos RE positivos⁶⁴.

5. Receptores de progesterona

A acção das hormonas esteróides implica a presença de receptores específicos de ligação nas células alvo. Os receptores esteróides activam moléculas citoplasmáticas transductoras de sinal e conseqüentemente regulam a expressão genética. As moléculas citoplasmáticas activadas por esteróides na maior parte dos casos migram para o núcleo e ligam-se aos promotores dos genes regulados. Alguns mecanismos de regulação genética ainda não foram totalmente esclarecidos. Os RP são transcritos por um único gene com três locais independentes de transcrição. Esta diferenciação resulta em três isoformas, os RP-A, os RP-B e os RP-C⁶⁵. A isoforma C é uma proteína específica do útero, enquanto que na mama coexistem as isoformas A e B⁶⁶. Os RP activam proteína cinases funcionais como a via *mitogen-activated protein kinase* (MAPK), a caseína cinase II e a *ciclin-2 dependent kinase protein* (CDK2)^{67,68}. O mecanismo de interacção proposto envolve RP com componentes das MAPK ou MAPK regulados pela CDK que sensibiliza os RP após estímulos hormonais provenientes da superfície da célula⁶⁶.

A progesterona influencia o desenvolvimento de diversos tecidos, incluindo a glândula mamária. Os metabolitos da progesterona parecem ser independentemente activados como hormonas funcionais, promovendo o cancro e inibindo agentes reguladores⁶⁹. A existência de um aumento da relação 5 α -pregnano e 4-pregneno parece influenciar a transformação neoplásica da célula mamária. Existem estudos que sugerem que a proliferação e adesão se devem a metabolitos da 5 α -redutase e não à progesterona propriamente dita⁶⁹.

A detecção de RP envolve uma metodologia mais complexa que a detecção de RE, reportando-se prováveis casos catalogados erroneamente no passado. Os estudos revelam implicações prognósticas e terapêuticas dos RP, uma vez que a resposta à hormonoterapia adjuvante dos tumores RE e RP positivos apresenta um acréscimo de cerca de um terço em comparação com tumores RE positivos e RP negativos⁷⁰. Um estudo sobre o comportamento metastático dos RP demonstrou perda da sua expressão na metástase em 40% dos casos, o que implicaria um prognóstico mais desfavorável^{63,70}. Os tumores RE e RP positivos também foram associados a menor risco de recidiva e morte comparando com casos RE positivos e RP negativos⁷¹.

A expressão dos RP é maior nas mulheres jovens e pré-menopáusicas, provavelmente à custa da presença de estrogénios. Apesar da utilidade dos RP como factor prognóstico não estar ainda bem delineada, as implicações prognósticas são à partida menores que as dos RE. Esta constatação ainda não permitiu uma correlação clínica sólida.

6. Expressão HER-2

O *human epidermal growth factor receptor-2* (HER-2) é na actualidade um dos principais marcadores de cancro da mama, cuja importância poderá vir a igualar a dos RE. A sobreexpressão HER-2 foi claramente estabelecido o agravamento prognóstico no cancro da mama e envolvimento na sua etiologia. A grande vantagem da avaliação sistemática da sua expressão na prática clínica é a elegibilidade de doentes para a terapêutica com trastuzumab (Herceptin®). Em 2002/2003 a *American Cancer Society* recomendou a detecção de HER-2 em todos os diagnósticos de carcinoma invasivo da mama. A amplificação HER-2 estará presente em 10 a 34% dos cancros da mama^{72,73}.

O oncogene *HER2/neu* é codificado no cromossoma 17 e as células normais apresentam uma única cópia deste gene⁷⁴. A expressão deste gene na célula epitelial mamária normal origina uma proteína transmembranar de 185-kDa com actividade tirosina cinase que regula o crescimento celular⁷⁵. Em 25% dos cancros da mama o HER2 está amplificado 2 a 20 vezes em cada núcleo celular⁷⁴. Esta amplificação origina aumento do número de receptores *ErbB-2* (receptor da superfamília dos receptores *epidermal growth factor* derivado do oncogene dominante *HER-2*) na superfície da célula tumoral e promove activação de receptores desencadeando excessiva divisão celular e génese tumoral⁷⁶. Deste modo são activadas múltiplas moléculas reguladoras como tirosina cinase, MAPK e AKT ou *protein kinase B* (PKB)^{74,77}.

A família de receptores do factor de crescimento epidérmico, inclui quatro tipos de receptores tirosina cinase, o ErbB-1 (EGFR), o ErbB-2 (HER2), o ErbB-3 e o ErbB-

4⁷⁸. Cada uma destas proteínas apresenta um domínio extracelular ao qual se pode ligar um ligando, um domínio transmembranar hidrofóbico e um domínio citoplasmático contendo actividade tirosina cinase⁷⁹. Os receptores da família ErbB são activados pela ligação de factores de crescimento que induzem a dimerização dos receptores. A formação de dímeros tem como consequência a activação do domínio intracelular com actividade cinásica, ocorrendo auto ou trans-fosforilação de resíduos de tirosina⁷⁹.

Os tumores ErbB-2 positivos têm um comportamento biológico mais agressivo que os tumores ErbB-2 negativos e apresentam uma maior taxa de recidiva e uma menor sobrevivência⁸⁰. O pior prognóstico foi associado a características patológicas mais desfavoráveis, como o tamanho do tumor, o maior índice proliferativo e o elevado grau citonuclear^{81,82}.

A correlação entre a expressão ErbB-2 do tumor primitivo e a metastização axilar não é exactamente concordante. Descreve-se 77% de concordância em casos ErbB-2 positivos e 95% nos casos ErbB-2 negativos⁶³. A expressão de ErbB-2 nas metástases à distância poderá ter uma concordância maior (98%), apesar do número de casos ser pouco representativo e as localizações serem diferentes⁸³.

A sobreexpressão HER-2 é o factor preditivo de resposta ao trastuzumab, o anticorpo monoclonal humano anti-ErbB-2. Em 1998 este fármaco foi aprovado pela *Food and drug administration* (FDA) para o tratamento de doença metastática em primeira linha, combinado com paclitaxel ou em monoterapia em doentes submetidos anteriormente a quimioterapia⁷⁴. A introdução do trastuzumab como quimioterapia de primeira linha melhorou significativamente a taxa de resposta, o tempo de progressão e

a sobrevivência global, comparando com quimioterapia isolada em doentes ErbB-2 positivos com cancro da mama metastizado^{84,85}. Os ensaios clínicos em quimioterapia adjuvante demonstraram uma clara melhoria do intervalo livre de doença e sobrevivência global neste grupo de doentes^{86,87}. Estes trabalhos (NSABP B-31 e NCCRG N9831) demonstraram uma melhoria no intervalo livre de doença de 52% comparando com a quimioterapia isolada. Na sequência destes resultados, o trastuzumab foi aprovado em 2006 para tratamento adjuvante em combinação com quimioterapia para casos ErbB-2 positivos com metastização axilar⁷⁴.

O lapatinib é um fármaco de administração oral, com inibição tirosina cinase para o EGFR e ErbB2. Em fases pré-clínicas, o lapatinib inibiu o crescimento de diversos tumores humanos que sobreexpressam EGFR e ErbB-2, incluindo o cancro da mama⁸⁸. Dada a capacidade de ligação aos receptores desprovidos de domínio extracelular, o lapatinib foi aplicado aos casos resistentes ao trastuzumab⁸⁹. Os estudos clínicos que se sucederam vieram mostrar que o benefício do lapatinib era limitado aos doentes ErbB-2 positivos com cancro da mama metastizado. Este fármaco em monoterapia mostrou resultados favoráveis na taxa de recidiva e nos casos refractários de carcinoma inflamatório da mama ErbB-2 positivos, com uma taxa de resposta de 62%⁹⁰. A utilidade do lapatinib numa fase mais precoce da história natural do cancro da mama não foi ainda definida. Estão em curso alguns estudos como ALLTO e Neo ALLTO que estão a avaliar a eficácia do lapatinib isolado em comparação com trastuzumab como tratamento adjuvante e neoadjuvante.

A expressão ErbB-2 também parece ter implicações na resposta à quimioterapia e à hormonoterapia. Os tumores ErbB-2 positivos com menor expressão de RE e alto grau

citonuclear associam-se inevitavelmente a menores respostas à hormonoterapia^{91,92}. Em terapêutica adjuvante com ciclofosfamida, metotrexato e 5-fluorouracilo (CMF), não parecem existir diferenças no intervalo livre de doença e sobrevivência global em doentes ErbB-2 positivos vs. ErbB-2 negativos⁹³. Por outro lado, a desregulação da topoisomerase II α associada à sobreexpressão ErbB-2 melhora a resposta terapêutica às antraciclinas⁹⁴.

Neste contexto, é portanto fundamental uma catalogação precisa da expressão ErbB-2. A FDA aprovou dois testes laboratoriais para a sua avaliação: a IHQ e *fluorescence in situ hybridization* (FISH). Estas metodologias são morfológicamente dirigidas, o que permite uma avaliação directa da célula tumoral, assim como a correlação com o aspecto morfológico e a possibilidade de se aplicar a amostras pequenas como as obtidas por biópsias.

A avaliação por IHQ foi inicialmente aplicada nos ensaios clínicos com trastuzumab para determinação da expressão proteica CerbB2. A análise dos ensaios clínicos incluía os anticorpos monoclonais 4D5 (precursor murino do trastuzumab) e CB11, que são específicos de diferentes porções da proteína ErbB-2⁷⁴. A relevância clínica do ErbB-2 é subjectivamente classificada de forma semiquantitativa entre valores de 0 a 3+, que reflectem o aumento da expressão da proteína CerbB2. Os ensaios demonstraram que a maior expressão ErbB-2 (3+) apresentava uma melhor taxa de resposta ao trastuzumab que a expressão 2+⁹⁵. Assim, o nível de expressão 2+ é considerado ambíguo, pelo que necessita de confirmação subsequente. Actualmente a FDA aprovou 2 métodos por IHQ para avaliar o ErbB-2, o *DAKO HercepTest assay* que

utiliza anticorpos policlonais de coelho e o *Ventana PATHWAY assay* que utiliza anticorpos monoclonais de rato.

O teste por FISH está aprovado na prática clínica como alternativa à IHQ na análise da expressão ErbB-2. A utilização de moléculas de DNA marcadas permite a quantificação das cópias ErbB-2 no núcleo das células tumorais. O teste aprovado pela FDA (*PathVyson assay*) apresenta 2 colorações fluorescentes para analisar o número de sinalizações do gene HER-2 e o número de cópias do cromossoma 17 (CEP17) no núcleo celular⁷⁴. A relação HER-2/CEP17 permite avaliar a distribuição da amplificação do gene e distingue das pseudoamplificações devidas a múltiplas cópias do cromossoma 17 (polissomias).

Os casos catalogados por IHQ com 3+ apresentam forte concordância com a amplificação por FISH, sendo candidatos directos à terapêutica com trastuzumab. As situações em que a IHQ fornece informação do ErbB-2 de 0 ou 1+ correlacionam-se com a ausência de amplificação HER-2. Os casos dúbios (2+) por IHQ devem ser estudados adicionalmente por FISH⁹⁶.

7. Classificação molecular do cancro da mama

O cancro da mama representa um grupo heterogéneo de tumores. Na prática clínica os doentes com cancro da mama são estratificados em três grupos principais: os tumores com RH positivos, que respondem a terapêuticas dirigidas aos receptores de estrogénios e quimioterapia; os tumores ErbB-2 positivos, candidatos à terapêutica dirigida com trastuzumab; e os tumores triplos negativos (TN), RH e ErbB-2 negativos, cuja única terapêutica sistémica disponível é a quimioterapia clássica.

No entanto, esta estratificação prognóstica e os factores preditivos não são exactamente lineares em todos os doentes, reconhecendo-se que alguns doentes são tratados excessivamente e outros, por outro lado, serão subtratados.

Estudos com caracterização da expressão a nível pós-transcricional, iniciados por Stanford e colaboradores⁹⁷⁻⁹⁹, demonstraram uma variação sistemática no perfil de expressão. Assim, classificaram os tumores da mama em cinco grupos principais, dois em que existe expressão de RE, o luminal A e o luminal B e três que não expressam RE, o normal *mama-like*, o ErbB-2 e *basal-like*^{97,98,100,101}. Os estudos subsequentes constataram que o grupo *basal-like* (BL) é constituído por tumores sem RH e sem ErbB-2 mas expressam citoqueratinas (CKs) de alto peso molecular¹⁰²⁻¹⁰⁴. O perfil de expressão génica dos tumores BL assemelha-se ao habitualmente presente nas células basais e mioepiteliais da mama normal.

Estes subtipos moleculares parecem correlacionar-se consistentemente com o tumor primitivo e o aparecimento de lesões metastáticas anos depois¹⁰⁵. A evolução clínica destes subtipos também difere, verificando-se uma maior sobrevivência no grupo dos luminal A, enquanto que os piores resultados foram relatados nos BL e nos ErbB-2 positivos. Os tumores luminal B têm uma sobrevivência intermédia⁹⁸. Os tumores que expressam RE corresponderam a luminal A ou B em 73%, 11% aos tumores ErbB-2 positivos, 5% aos tumores BL e 12% aos tumores normal mama *like*. Por outro lado os tumores RE negativos representam os luminal A ou B em 11%, os tumores ErbB-2 positivos em 32%, 50% os tumores BL e 7% os tumores normal mama-*like*¹⁰⁶. Neste estudo, o subtipo tumoral teve impacto no intervalo de recorrência após tratamento, bem como na previsão da resposta patológica completa (pRC) após quimioterapia neoadjuvante. Alguns resultados discrepantes reforçam a importância de estabelecer um sistema de classificação que oriente adequadamente a terapêutica.

O *mamaprint* é um array de RNA que avalia um perfil de expressão de 70 genes associados com o prognóstico de cancro da mama com gânglios axilares negativos. Esta metodologia provou ser um indicador prognóstico para intervalo livre de doença e sobrevivência global neste grupo de doentes¹⁰⁷. Mais recentemente foi tentada a sua aplicação na previsão do benefício da quimioterapia. Os casos de pior prognóstico no perfil dos 70 genes estão associados a vantagem no tratamento sistémico¹⁰⁸. O *mamaprint* necessita de extrair RNA mensageiro (RNAm) para análise, logo é necessário a congelação do fragmento tumoral ou preservação do mesmo em meio apropriado.

O *76-gene array* corresponde a 60 genes de doentes com tumores RE positivos e 16 genes de tumores RE negativos¹⁰⁹. Esta assinatura genética identificou em doentes sem metastização axilar o risco de metastização à distância com uma sensibilidade de 93% e uma especificidade de 48%¹⁰⁹. A sensibilidade e especificidade para o intervalo livre de doença aos 5 anos foram de 90 e 50% respectivamente¹¹⁰. Também necessita de extracção de RNAm, com as contingências já mencionadas.

O *HOXB 13:IL17BR Array* avalia 2 genes, o HOXB13 e o receptor da interleucina 17B (IL17BR) que podem ser considerados preditivos do intervalo livre de doença¹¹¹. A expressão destes receptores também foi associada a menor resposta ao tamoxifeno e metastização axilar^{112,113}. Tem a vantagem de poder ser aplicado em peças fixadas com formol e em fragmentos em blocos de parafina.

O *oncotype DX*, que utiliza a *real time-polimerase chain reaction* (RT-PCR) para um total de 21 genes, tem sido testado no contexto de avaliação prognóstica e como preditivo da resposta terapêutica¹⁰⁸. Também podem ser utilizadas peças fixadas ou fragmentos em blocos de parafina. Na actualidade é o método mais utilizado na prática clínica, particularmente no contexto de prever o risco de recorrência, benefícios do tamoxifeno e quimioterapia com CMF em doentes sem metastização axilar e com tumores RE positivos¹¹⁴. As grandes limitações deste marcador são a orientação dos casos de risco intermédio, limitação a casos que expressam RE e os custos adicionais a um procedimento de rotina.

8. Tumores triplos negativos e tumores basal-like

Os tumores TN representam 10 a 17% de todos os câncros da mama^{115,116}. Estes tumores são os tumores mais frequentes em mulheres jovens (menos de 50 anos), manifestam-se no intervalo entre os rastreios (tumores de intervalo), apresentam um comportamento clínico mais agressivo e pior prognóstico apesar de responderem à quimioterapia convencional^{103,104,117,118}. O interesse no estudo dos tumores TN começou por assentar na falta de terapêuticas alvo e a sobreposição com o perfil dos tumores BL. Também se destaca o intervalo estreito para o aparecimento da primeira metástase em relação aos outros subtipos¹¹⁶.

Do ponto de vista anatomo-patológico, os tumores TN são predominantemente carcinomas ductais invasivos de alto grau, carcinomas metaplásicos ou medulares^{116,117,119}. A presença de gânglios axilares positivos no momento do diagnóstico não é concordante entre os diversos trabalhos^{116,117,120}. No entanto foi descrito que o tamanho do tumor primitivo não se correlaciona com a metastização axilar, ao contrário do que sucede noutra tipo de tumores¹¹⁶.

Os tumores BL representam 15% dos câncros da mama¹²¹ e expressam genes semelhantes às células da camada basal/mioepitelial do tecido mamário normal e CK de alto peso molecular como a CK5/6, a CK14 e a CK7, a vimentina, a p-caderina, a $\alpha\beta$ cristalina, a fascina e as caveolina 1 e 2¹²²⁻¹²⁴.

Estes tumores frequentemente não expressam RH nem ErbB-2 e são associados à expressão da p53, a genes de proliferação celular e ao EGFR em cerca de 60% dos casos^{97,98,125}. Morfologicamente, os tumores BL são caracterizados por alto grau citonuclear, elevado índice mitótico, presença de necrose central e infiltrado linfocitário^{126,127}. Cerca de 90% dos carcinomas metaplásicos e a maioria dos carcinomas medulares são tumores com fenótipo BL¹²⁵. Os tumores BL apresentam um comportamento clínico agressivo^{129,130}. A metastização preferencial deste subtipo parece ser a via hematogénica, pois apresentam menos frequentemente metastização ganglionar e óssea e desenvolvem mais frequentemente metastização cerebral e pulmonar¹³¹.

Os carcinomas BL são preferencialmente RE, RP e ErbB-2 negativos¹¹⁶. Apesar desta sobreposição, não são inteiramente sinónimos. Os estudos com *microarrays* vieram salientar que entre 15 a 54% dos tumores BL expressam pelo menos um dos receptores, RE, RP ou ErbB-2⁹⁹. Também se constatou que parte dos tumores TN engloba os tumores normal *mama-like*¹³⁰. Este último grupo tem um melhor prognóstico que os tumores BL e não responde à quimioterapia neoadjuvante da mesma forma^{130,132}. O subgrupo que expressa o fenótipo BL apresenta pior intervalo livre de doença. Por outro lado, os tumores TN respondem melhor à quimioterapia neoadjuvante com taxanos e antraciclinas¹¹⁵. Mais recentemente foi ainda sugerida semelhança entre tumores BRCA1 e os tumores TN e BL^{133,134}. Os tumores com mutação BRCA1 apresentam paralelismo morfológico com os tumores BL e do ponto de vista IHQ apresentam características dos tumores TN e BL^{99,135}.

Deste modo reconhece-se que o grupo dos TN é heterogéneo. Os estudos actuais não permitem assumir os tumores TN e BL como sinónimos. O grande desafio nestes tumores assenta numa perspectiva terapêutica mais efectiva. Assim, existem estudos que os consideram com particular sensibilidade aos derivados do platínio e aos inibidores *poli(ADP-ribose) polimerase-1* (PARP1) que actualmente estão a ser enquadrados em ensaios clínicos^{136,137}. A PARP1 está envolvida na manutenção da integridade do genoma, actuando na reparação de quebras da molécula de DNA de cadeia única^{138,139}. A inactivação desta reparação pela inibição PARP1 durante a fase S do ciclo celular, induz falhas na dupla cadeia de DNA. Este mecanismo pode conferir letalidade a células com defeitos de homologia da dupla cadeia.

9. Metastização do cancro da mama

As metástases definem-se como implantes tumorais descontínuos em relação ao tumor primitivo. As metástases são premissa de malignidade, uma vez que as neoplasias benignas não metastizam. O carácter invasivo das neoplasias malignas condiciona a penetração nos vasos sanguíneos, linfáticos e cavidades corporais, originando deste modo a disseminação.

Quanto mais agressiva, de crescimento rápido e maior for a neoplasia primitiva, maior a probabilidade de sofrer metastização ou até de já se encontrar metastizada. No entanto esta regra não é linear, existem neoplasias pequenas e bem diferenciadas já metastizadas e, por outro lado, existem neoplasias de crescimento rápido e que permanecem localizadas durante anos. Assim, não é possível estabelecer uma relação linear entre a probabilidade de metastização e o exame histológico dos tumores.

A metastização é um processo em cascata que envolve várias etapas sequenciais, múltiplos factores e interacções do hospedeiro. A disseminação do cancro da mama envolve uma série de processos, desde um estágio inicial *in situ*, progredindo para lesão invasiva e podendo assim adquirir potencial de metastização.

No momento do diagnóstico de cancro da mama, estima-se que um terço dos doentes apresente já doença metastática¹⁴⁰. O cancro da mama metastiza para diversos órgãos, constituindo o microambiente de cada órgão sede de metastização um factor atractivo para o surgimento de metástases. No entanto, ainda não está esclarecido, do

ponto de vista molecular quais os factores determinantes e específicos de cada localização¹⁴¹. Por outro lado, a célula tumoral pode possuir mutações precoces que levem inevitavelmente à metastização ou, este processo, pode ser desencadeado por fenómenos de selecção natural no processo de progressão tumoral^{142,143}. Esta dicotomia permanece em debate.

Estima-se que cerca de 1 milhão de células por grama de tumor primitivo entra na circulação diariamente¹⁴⁴. À custa de múltiplos processos incluindo perda de adesão e o crescimento desregulado, as células tumorais que se libertam do tumor primário, migram através da membrana basal e matriz extracelular, intravasam e circulam pelos vasos linfáticos e/ou sanguíneos¹⁴¹. Nos locais à distância, as células extravasam, tornam-se aderentes, formando-se um novo foco com neovascularização, conforme esquematizado na figura 1. O processo de metastização resulta da activação de várias moléculas, como *matrix metalloproteases* (MPPs), oncogenes e moléculas de adesão celular. Sendo a metastização um conjunto de acontecimentos sequenciais, o bloqueio de um simples passo na cascata pode prevenir a metastização¹⁴⁵.

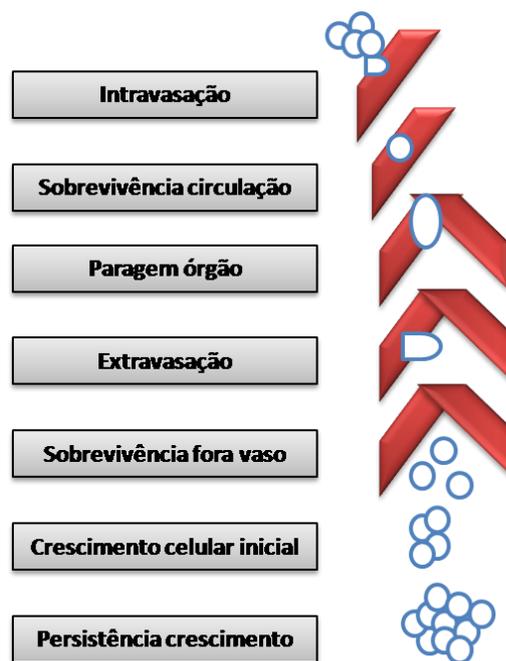


Fig. 1 – Esquema representativo do processo de disseminação circulatória para órgãos à distância.

As vias transdutoras de sinal envolvidas no processo de metastização são complexas. Os receptores tirosina cinase medeiam grande parte do processo de metastização, bem como a promoção da proliferação e são considerados alvos terapêuticos^{146,147}. Os receptores tirosina cinase são activados na membrana celular com a ligação de um ligando, dimerizam e fosforilam um resíduo tirosina no domínio citoplasmático¹⁴⁸. Os receptores mais estudados neste contexto são os da família EGFR (EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4). Como consequência, resulta a activação da $\beta 1$ integrina, *phosphoinositide 3-kinase* (PI3K) e da MAPK¹⁴⁹. A sobre-regulação *vascular endothelial growth factor* (VEGF), a desregulação da MPP-9 e da heregulina também parecem relevantes nesta sinalização celular¹⁵⁰. O IGF e as suas isoformas IGF-1 e IGF-

2, foram também descritos neste processo complexo, tendo-se reportado a sua activação e sobreexpressão no cancro da mama¹⁵¹. A interacção da célula tumoral com a matriz extracelular é mediada por integrinas (α e β). Alguns mediadores actuam do exterior para o interior como *focal adhesion kinase* (FAK) e do interior para o exterior como a AKT e as cinases que se ligam a integrinas¹⁵². A osteopontina é uma proteína específica que se liga a integrinas, é produzida pelas células tumorais no osso e facilita esta metastização específica¹⁵³. Existem ainda moléculas de adesão, como as caderinas, que contribuem para a metastização. Dentro destas, a E-caderina parece estar envolvida na adesão das células tumorais ao endotélio¹⁵⁴. Esta molécula interage também com as cateninas, a actinina e a vimentina do citosqueleto, fortificando a adesão celular. A classe das proteases é outro grupo que interage nas vias de metastização, concretamente *urokinase plasminogen activator* (uPA) que activa as MMPs, contribuindo desta forma para a invasão. Foram já descritos alguns inibidores deste processo como *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) e a maspina (inibidora da serina protease)¹⁵⁵. Finalmente destaca-se o contributo de cascatas reguladoras da transcrição, das quais a mais estudada é a família Nf- κ B, que influencia a invasão, a metastização e a angiogénese¹⁵⁶.

A angiogénese é um fenómeno necessário à metastização. Para além do VEGF e *fibroblast growth factor* (FGF) que estão implicados neste processo, muitas outras moléculas desempenham um papel importante. O *hipoxia inducible factor-1* (HIF-1) parece estar directamente associado à activação do VEGF e outros indutores angiogénicos¹⁵⁷. Porém, a hipoxia aumenta o potencial de invasão tumoral

independentemente da angiogénese, é também capaz de limitar a acção de drogas antiangiogénicas.

As citocinas são proteínas segregadas pelas células no contexto de processos inflamatórios. Estas moléculas ligam-se a uma família de sete receptores transmembranares acoplados a proteínas G assim como a glicosaminoglicanos, componentes de proteoglicanos. O seu papel no processo de metastização pode ser a nível do controlo do infiltrado leucocitário, da manipulação da resposta imune do hospedeiro, da regulação da angiogénese, dos efeitos autócrino e parácrino do crescimento tumoral e da estimulação da motilidade celular. Foi descrita a desregulação da expressão dos receptores de citocinas como *cytokin receptor specific for stromal-derived-factor-1* (CXCR4) e *C-C chemokine receptor type 7* (CCR7) em carcinomas invasivos da mama^{158,159}. O ligando do CXCR4 e *stromal-derived-factor-1* (CXCL12) está aumentado em diversas metástases de cancro da mama. A figura 2 enquadra de forma sistemática o fenómeno de metastização e as moléculas envolvidas em cada etapa.

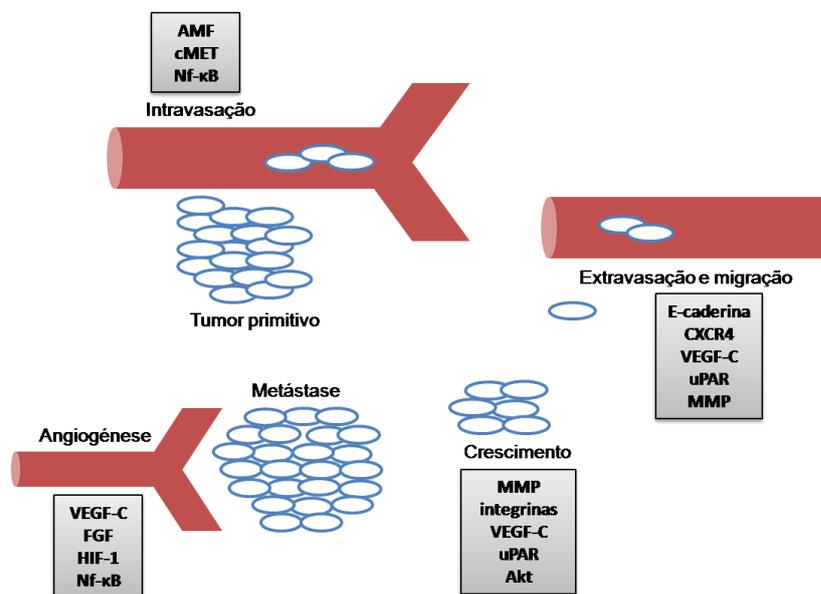


Fig. 2 – Esquema representativo do processo de metastização e as moléculas que intervêm nas diversas etapas. *Autocrine motility factor* (AMF); *cell motility factor receptor* (cMET); *nuclear factor kappa B* (NF-κB); *cytokin receptor specific for stromal-derived-factor-1* (CXCR4); *vascular endotelial growth factor-C* (VEGF-C); *urokinase plasminogen activator receptor* (uPAR); *matrix metalloproteases* (MMP); *protein kinase B* (PKB ou AKT); *fibroblast growth factor* (FGF); *hipoxia inducible factor-1* (HIF-1).

Este processo parece pois muito complexo a nível celular e molecular, com diversos passos que se podem tornar alvo de supressão. Porém, para além de todas as moléculas referidas com capacidade de estimulação metastática, foram também descritas moléculas com a capacidade de supressão metastática. O *breast cancer metastasis-suppressor 1* (BRMS1) é um gene supressor metastático presente no cromossoma 11¹⁶⁰. A expressão deste gene influencia diversos passos da metastização, como a expressão PI3K, AKT e está inversamente relacionado com a expressão do ErbB-2¹⁶¹. O *Kang-ai 1* (KAI1 ou CD82/CD33/TIP30) foi associado a uma menor metastização de diversos cancros, incluindo o cancro da mama¹⁴⁴. Parece estar

primordialmente envolvido na interacção com o endotélio vascular e nas células tumorais circulantes. O KISS1 é outro gene localizado no cromossoma 6 que parece inibir a progressão metastática¹⁴⁴. A *mitogen activated protein kinase kinase 4* (MKK4), o *Non-metastatic clone#23* (Nm23), o *Raf kinase inhibitor protein* (RKIP) são outros exemplos de supressores metastáticos¹⁴⁴.

10. Vias de metastização

A metastização ganglionar tem sido o grande factor de valorização no estadiamento e também no prognóstico. Os gânglios linfáticos são locais onde são detectadas células tumorais e são frequentemente o primeiro local de disseminação metastática¹⁴¹. O GS é o primeiro gânglio linfático a receber células do tumor primário e o esvaziamento axilar apenas será executado nos casos de metastização do GS, evitando as morbidades inerentes a procedimentos mais invasivos. Contudo, existem casos em que a metastização axilar é detectada antes do tumor primitivo¹⁶². Mesmo com gânglios negativos, 20% das doentes vão apresentar doença metastática, pois em cerca de 20% dos casos existe um desvio da circulação linfática¹⁴¹. Os vasos linfáticos são semelhantes aos vasos sanguíneos uma vez que são constituídos por endotélio e rodeados por músculo liso, porém os vasos linfáticos têm descontinuidades ou fenestras da membrana basal e não possuem *tight junctions*. O fluído que percorre a rede linfática tem uma velocidade de circulação menor que os vasos sanguíneos e não tem sistema de coagulação, pelo que a rede linfática é menos complexa do que a sanguínea. Contudo, a linfangiogénese parece ter um papel importante no desenvolvimento de metástases no

cancro da mama. O aumento da linfangiogénese do GS foi associada a invasão ganglionar adicional, o que pode traduzir um fenómeno de linfangiogénese entre gânglios linfáticos¹⁶³. As citocinas VEGF-C e VEGF-D activam o VEGFR-3 nas células endoteliais linfáticas, desencadeando a linfangiogénese e metastização linfática. O VEGF-C no cancro da mama teve a capacidade de induzir linfangiogénese, crescimento tumoral e disseminação ganglionar regional e pulmonar¹⁶⁴. Moléculas como o CD44 e integrinas estão implicadas na migração transendotelial e os receptores de citocinas como o CXCR4 e o CCR7 são associados à permanência das células tumorais nos vasos linfáticos¹⁴¹. As interacções que provocam a quimiotaxia para os gânglios, a retenção local, a sobrevivência e a proliferação, são fenómenos ainda por esclarecer. Neste contexto, seria desejável o estabelecimento de uma assinatura molecular da metastização linfática.

O sangue periférico é uma das amostras mais importantes para o diagnóstico de diversas alterações. Os marcadores tumorais em circulação são avaliados no soro há vários anos, com o objectivo de se tornarem indicadores de cancro da mama metastizado e em progressão. Estes marcadores serológicos podem ser bons indicadores da carga tumoral, no entanto não dão informação quanto a doença residual. Apesar desta limitação, o sangue periférico parece a fonte ideal para monitorizar células tumorais em circulação. A obtenção da amostra é cómoda, minimamente invasiva e pode ser repetida em diferentes fases da doença.

Reconhece-se a possibilidade de metastização em doentes com gânglios negativos. Alguns autores reportaram presença de células tumorais em circulação em sangue periférico de doentes em estádios iniciais e sem metastização conhecida¹⁶⁵⁻¹⁶⁷. A disseminação hematogénica desempenha um papel preponderante na distribuição de células tumorais que serão núcleos de metástases. Esta via oferece uma potencial fonte de células tumorais em circulação e as amostras de sangue podem ser colhidas repetidamente. Assim, seria vantajoso desenvolver um método não doloroso, rápido, reprodutível e sensível para detectar células tumorais metastáticas. Apesar de muitas células tumorais circulantes serem apoptóticas¹⁶⁸, uma fracção destas células circulantes tem capacidade de crescimento *in vitro*¹⁶⁹.

Os estudos com o objectivo de detectar células tumorais circulantes utilizam, de um modo geral dois tipos de técnicas, as baseadas na utilização de anticorpos e as técnicas que detectam ácidos nucleicos^{170,171}. As análises baseadas em utilização de anticorpos mostraram a presença de células com características sugestivas de células tumorais em 0-100% dos doentes com tumores operáveis e em 3-100% dos doentes com doença disseminada¹⁷². As técnicas com ácidos nucleicos mostraram capacidade de detecção entre 0-88% dos tumores operáveis e 0-100% dos tumores metastizados¹⁷³. Este largo espectro de resultados deriva de drásticas variações metodológicas. Alguns dos aspectos que contribuem neste sentido são: a heterogeneidade da população estudada, a preparação e o manuseamento da amostra, os critérios e o limiar de positividade, as técnicas analíticas e pré-analíticas e o número de marcadores^{170,174}. As células tumorais em circulação podem ter implicações prognósticas, ser preditiva e monitorizar a eficácia da terapêutica sistémica.

A medula óssea é o local isolado mais comum de metastização em doentes com cancro da mama¹⁷⁵. A detecção de células tumorais na medula óssea por IHQ tem adquirido importância progressiva como marcador independente de doença recorrente ou sobrevivência dos doentes^{176,177}. As células tumorais isoladas da medula óssea mostraram capacidade de crescimento clonal *in vitro*, indicando que estas células podem participar no recrudescimento do tumor e no desenvolvimento de doença metastática *in vivo*¹⁶⁹. O estudo da medula óssea pode ser útil no diagnóstico de cancro da mama disseminado e na definição de um grupo de doentes com alto risco de recorrência. Os estudos preliminares de evidência IHQ de doença na medula óssea não detectaram cerca de 15% de doentes com recorrência, para além de ser um método doloroso e dispendioso¹⁷⁷.

Actualmente está por definir se a medula óssea é um reservatório de células tumorais disseminadas que posteriormente se disseminam em outros órgãos ou se a presença de células tumorais pode reflectir a tendência das células se disseminarem e sobreviverem noutros órgãos e não apenas na medula óssea. A presença de células epiteliais (citoqueratinas positivas) no sangue periférico em doentes com doença metastática à distância sugere que podem ser libertadas células tumorais de metástases ósseas, que entram de novo na circulação e disseminam para tecidos secundários¹⁷⁸.

11. Locais de metastização

O primeiro local de metastização à distância dos tumores da mama é o osso, representando 46% dos casos. As metástases viscerais correspondem a 41% e cerca de 3% são situações de metastização óssea e visceral simultânea¹⁷⁹. A metastização óssea tem um prognóstico mais favorável em termos de sobrevivência que a metastização visceral^{179,180}.

A metastização óssea tem habitualmente tradução clínica, raramente permanece de forma silenciosa. A morbidade do esqueleto no cancro da mama foi já reportada desde finais do século XIX, reconhecendo-se que o envolvimento ósseo no cancro da mama não poderia ser apenas explicado pela embolização¹⁸¹. Assim, propõe-se a teoria “*seed and soil*” em analogia à sobrevivência das plantas, onde, o microambiente de um órgão serve de “solo fértil” para as células tumorais que aí se “semeiam”. No osso normal a actividade de reabsorção exercida pelos osteoclastos mantém um equilíbrio dinâmico com a formação óssea assegurada pelos osteoblastos. Na metastização também existe actividade osteolítica provocada pela produção de *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP) pelas células tumorais^{182,183}. Sabe-se que cerca de 50 a 60% dos cancros da mama humanos expressam PTHrP. Por outro lado a actividade osteoblástica deriva de factores da célula tumoral que estimulam a formação óssea, como a endotelina, o TGF β , o FGF e o *platelet-derived growth factor- β* (PDGF- β). Nas metástases ósseas do cancro da mama, cerca de 73% apresentam lesões mistas, osteoblásticas e osteoclásticas, com predomínio desta última e em 23% são lesões

exclusivamente osteoclásticas¹⁸⁴. O TGF β está presente no microambiente ósseo como consequência da reabsorção óssea, levando ao aumento da produção de PTHrP pelas células tumorais¹⁸⁵⁻¹⁸⁷. Estes processos são mediados pela via de sinalização Smad. O ligando do receptor activador do NF κ B (RANKL) é libertado pelas células tumorais, osteoblastos e osteoclastos em resposta à presença de PTHrP, sendo uma molécula da família do *tumor necrosis factor* (TNF). Os osteoclastos possuem receptores RANK que pode ser inactivado pela osteoprotegerina, um inibidor do RANKL¹⁸⁸. Assim, o mecanismo osteoclástico das metástases ósseas começa com a secreção tumoral de PTHrP que estimula os osteoclastos através da libertação de RANKL. O TGF- β e o IGF estimulam maior produção de PTHrP e assim estabelece-se um ciclo vicioso¹⁸¹, esquematizado na figura 3.

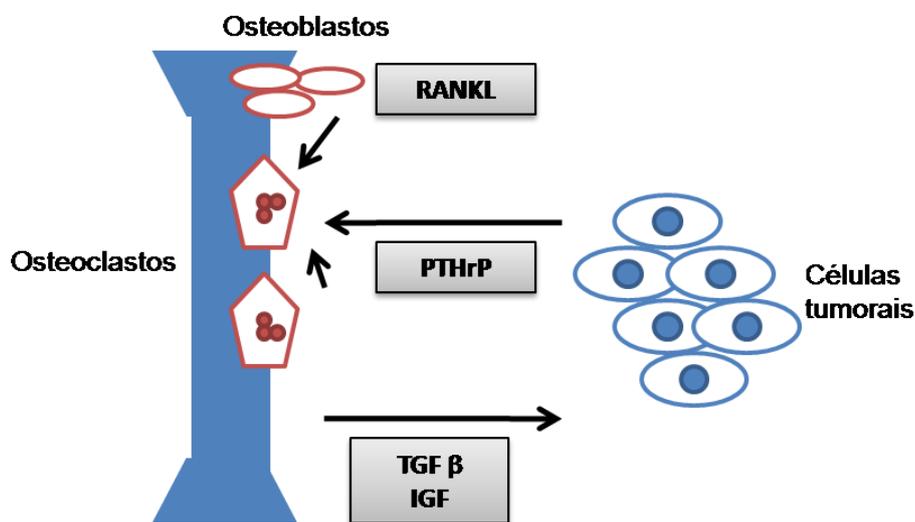


Fig.3 – Mecanismo de actividade osteolítica nas metástases. Receptor activador do NF κ B (RANK), *parathyroid hormone-related protein* (PTHrP), *transforming growth factor β* (TGF β), *insulin-like growth factor* (IGF)

A metastização pulmonar tem sido outro desafio, quer na orientação clínica, quer nos trabalhos de investigação sobre os processos em causa, particularmente moleculares. Foi proposta uma assinatura genética da metástase pulmonar, incluindo 18 genes responsáveis pelo crescimento tumoral e pela metastização pulmonar *in vivo*¹⁸⁹. Torna-se particularmente relevante esta análise no contexto dos tumores RE negativos, que têm um maior risco de recidiva pulmonar^{190,191}. A maioria destes genes codifica proteínas de superfície e outras responsáveis pela interacção entre a célula tumoral e o microambiente. Estes genes suportam a angiogénese, entrada da célula tumoral em circulação e saída da célula tumoral dos capilares pulmonares e a sua entrada no parênquima pulmonar¹⁹². Algumas das moléculas envolvidas são o EGFR, ligando da epirregulina, a ciclooxigenase 2 e as MMP 1 e 2.

Após a metastização hepática a sobrevivência das doentes sofre um declínio marcado, cerca de 14 meses. A resposta à terapêutica sistémica ronda os 57%¹⁹³. O maior desafio terapêutico futuro, neste caso, pode ser a imunomodulação dado que o fígado é um órgão do sistema reticuloendotelial¹⁹⁴. A infusão regional de interleucina 2 (IL-2) e de TNF α através da artéria hepática ou veia porta mostraram melhores resultados quando associados à quimioterapia do que a quimioterapia isolada¹⁹⁵.

A metastização cerebral representa 15% das doentes com cancro da mama metastático e é reportada uma sobrevivência média de 16 meses¹⁹⁶. A barreira hematoencefálica é constituída por capilares com células endoteliais não fenestradas e com

tight junctions contínuas. Esta anatomia funciona como uma barreira física para a passagem de células tumorais, mas também um santuário para as terapêuticas sistêmicas. Deste modo, os mecanismos envolvidos na metastização central estão ainda por esclarecer. O VEGF parece modular a migração de células tumorais mamárias e regular a permeabilidade da microcirculação cerebral¹⁹⁷. Um estudo que avaliou metástases cerebrais e correlacionou a sua expressão em tumores primitivos sugere que as MMP9 e a p53 estão sobreexpressadas em carcinomas que metastizam para o cérebro e que este fenótipo se mantém na metástase. Globalmente parece existir um desequilíbrio entre as MMP9 e a TIMP1 na metástase. A expressão de E-caderina não se perde o que evoca a necessidade de adesão nos estádios avançados da metastização¹⁹⁸.

A estratificação dos cancros da mama permite diferenciar três grupos de doentes: as portadoras de cancros da mama que expressam RH, os que são positivos para o HER2 positivos e os que não apresentam nenhuma das características referidas, sendo referenciados como cancros da mama TN. O comportamento destes três grupos ainda não está claramente definido, mas inclui diferenças na resposta à terapêutica, no risco de recidivas e na sobrevida global das doentes. Adicionalmente, o processo de metastização tem um enorme impacto na história natural do cancro. Neste contexto parece importante delinear a caracterização do comportamento metastático de diferentes tipos de células tumorais da mama.

Este projecto de investigação pretende avaliar a metastização *in vivo* das células tumorais da mama triplas negativas (HCC1806) comparando com células tumorais que expressam receptores hormonais e Her2 negativas (MCF7).

Pretende-se determinar os locais de embolização inicial das células tumorais *in vivo*, assim como a presença de metástases após a injeção celular. No modelo *in vivo* realizam-se estudos de imagem molecular com recurso à medicina nuclear através da administração de radiotraçadores derivados dos dísonatos, capazes de diagnosticar metástases ósseas e derivados dos isonitrilos, moléculas que permitem avaliar o metabolismo tumoral.

Posteriormente, objectiva-se a caracterização anatomo-patológica da metastização, particularmente do fígado, do pulmão e do cérebro, bem como todos os órgão com metastização macroscópica. A caracterização morfométrica das metástases tem o intuito de quantificar a metastização diferencial dos dois tipos celulares.

Finalmente, pretende-se avaliar o fenótipo das lesões secundárias e estabelecer comparação de acordo com a célula inoculada, concretamente considerando os RE, os RP e o HER2, assim como a expressão na metastização de CK basais (5/6), implicadas na diferenciação dos tumores BL.

A disseminação hematogénica do cancro da mama pode repercutir-se numa grande diversidade de locais de metastização. A saída da circulação e eleição de um determinado tecido onde, após embolização, tenham a capacidade de crescer tem justificações ainda desconhecidas. Para aprofundar o conhecimento sobre o comportamento das células tumorais da mama na circulação e caracterizar a metastização dos órgãos alvo, procedeu-se a um conjunto de metodologias que se sistematizam de seguida.

1. Estudos *in vitro* – Culturas celulares

Para a realização deste trabalho escolheram-se duas linhas celulares de cancro da mama humano com diferentes características relativamente à expressão de receptores hormonais e à expressão do HER2. Assim, foram adquiridas duas linhas celulares, uma linha de adenocarcinoma da mama, designada por MCF-7, que expressa RE e RP e outra linha de carcinoma da mama de células escamosas designada por HCC1806, que não expressa RE, RP nem ErbB-2. Ambas as linhas foram obtidas na *American Type Culture Collection* (ATCC). Após recepção, as linhas celulares foram descongeladas e propagadas em meios de cultura apropriados, à temperatura de 37°C e em atmosfera com 5% de CO₂ (HeraCell 150). Para a linha celular MCF-7 utilizou-se o meio *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) (Sigma D-5648) suplementado com 100 µM de piruvato de sódio (Gibco-11360), e para a linha HCC1806 o meio *Roswell Park Memorial Institute-1640* (RPMI-1640). Ambos os meios de cultura foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (Gibco 2010-09) e 1% de antibiótico (100

U/ml de penicilina e 10 µg/ml estreptomicina (Gibco 15140-122)).

Para a realização dos estudos *in vivo*, as linhas celulares foram propagadas com o objectivo de serem injectadas na veia da cauda de ratinhos *Balb/c nu nu* fêmeas. Assim, as culturas celulares após lavagem com uma solução tampão, *phosphate-buffered saline* (PBS), foram incubadas com 3 ml de uma solução de tripsina-EDTA a 0,25% (Gibco 25200) durante três minutos para que ocorra a separação celular. De seguida, adicionaram-se cerca de 8 ml de meio de cultura para inactivar a tripsina e centrifugou-se a suspensão celular a 1000 rpm durante 5 minutos (Heraeus Multifuge 1L-R; raio do rotor 18,7cm). Após a centrifugação, as células foram contadas recorrendo ao método do azul de tripano e ressuspensas em soro fisiológico, para serem injectadas nos animais¹⁹⁹.

2. Estudos *in vivo*

2.1 Administração das células tumorais MCF-7 e HCC1806

Para a realização dos estudos *in vivo*, foram utilizados 40 ratinhos *Balb-c nu/nu* fêmeas com idade entre as 4 e 6 semanas e com massas totais que variaram entre as 18 g e as 22g. A escolha destes animais justifica-se pelo facto de serem animais atímicos e deficientes em células T, pelo que não rejeitam células humanas, o que permite o desenvolvimento de tumores humanos após a implantação de células tumorais heterólogas.

Para o estudo experimental foram considerados 3 grupos, um deles constituído por animais injectados na veia da cauda com células MCF7 (n=17), outro injectado também na veia da cauda com células HCC1806 (n=13) e um grupo controlo (n=10) sem

qualquer injeção celular. As células, após a preparação descrita, foram marcadas com ^{99m}Tc -HMPAO (*Hexamethylpropyleneamine Oxime*) de acordo com Bassa *et al.*²⁰⁰ com o objectivo de, após a sua administração, avaliar qual ou quais os locais de distribuição e fixação. Para isso, a administração das células marcadas foi realizada com os animais colocados em decúbito ventral sobre o detector de uma câmara de raios gama (GE 400AC, Milwaukee, USA) acoplada a um colimador de orifícios paralelos de alta resolução e de baixa energia, ao mesmo tempo que foi adquirida uma sequência dinâmica de imagens, para matrizes de 128x128 elementos de resolução, o que permitiu perceber a trajectória das células até ao ou aos locais de embolização. Este procedimento foi realizado para as duas linhas celulares referidas e o número de células injectadas foi da ordem de $1,5 \times 10^6$ células.

A aquisição dinâmica foi realizada para o computador GenieAcq que controla a câmara de raios gama e foi constituída por 60 imagens de duração individual de 10 segundos, com matriz de 128x128 pixels com um *zoom* de 2. As imagens depois de adquiridas foram transferidas para uma estação de trabalho XELERIS, onde foram processadas.

Para a administração das células e aquisição das imagens os ratinhos *Balb/c nu/nu* normais, foram anestesiados com uma solução de ketamina (77%) e clorpromazina (23%) administrada por via subcutânea.

2.2 Imagiologia Nuclear – Radiofármacos utilizados

Sete a oito semanas após a injeção das linhas celulares e com o objectivo de avaliar e caracterizar a existência de metástases foram realizadas imagens com dois

radiofármacos, o ^{99m}Tc -MIBI (^{99m}Tc - Metoxisobutilisonitrilo) e o ^{99m}Tc -HMDP (^{99m}Tc - Hidroximetildifosfonato).

A medicina nuclear, através da administração de radiofármacos com diferentes afinidades bioquímicas, permite a avaliação de diferentes vias metabólicas *in vivo*. Associadamente, como as concentrações molares usadas são muito baixas, da ordem dos 10^{-9} a 10^{-12} M, não se verificam efeitos farmacológicos, pelo que a informação obtida é sobre o estado fisiológico do órgão alvo.

A maioria dos radiofármacos resulta da combinação de um radionuclídeo com um componente biologicamente activo. O radionuclídeo mais utilizado em imagiologia nuclear é o tecnécio-99 metastável (^{99m}Tc), obtido através de um gerador de molibdénio-99 (^{99}Mo)/ ^{99m}Tc , sistema que contém um radionuclídeo pai com um período de semi-desintegração ($T_{1/2}$) longo (^{99}Mo , $T_{1/2} = 66$ horas) e que dá origem a um radionuclídeo filho com período de semi-desintegração curto (^{99m}Tc , $T_{1/2} = 6$ horas).

O Sestamibi, derivado dos isonitrilos, está comercialmente disponível, o 2-metoxibutilo-isonitrilo (MIBI– Cardiolite®, Bristol-Myers and Squibb) Esta formulação farmacêutica é composta por 1 mg de 2-metoxibutilo-isonitrilo, 0,075 mg de $\text{SnCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e 1 mg de cloridrato de cisteína monohidratado ($\text{C}_3\text{H}_7\text{NO}_2\text{S} \cdot \text{HCl} \cdot \text{H}_2\text{O}$) e foi marcada com ^{99m}Tc , formando-se o complexo ^{99m}Tc -Sestamibi. Este traçador é um cátion monovalente e lipofílico cuja captação é realizada por difusão passiva, assim como pela diferença de potencial eléctrico através da membrana mitocondrial. Tendo por base estes mecanismos, a sua captação é maior nos tecidos ou órgãos ricos em mitocôndrias, pelo que está indicado para a detecção de patologia proliferativa, nomeadamente oncológica.

O hidroximetildifosfonato marcado com o ^{99m}Tc (^{99m}Tc -HMDP) é um derivado

dos difosfonatos, que após injeção endovenosa é extraído rapidamente da corrente sanguínea para se fixar no compartimento ósseo, onde se acumula nas zonas osteogeneticamente activas, apresentando como principais características a baixa ligação às proteínas, o que favorece a excreção renal, assim como uma ligação eritrocitária desprezável, tornando-se um dos radiotraçadores de eleição para a detecção de metástases ósseas.

A formulação farmacêutica comercialmente disponível é o Medronate II Agent (Ge Healthcare, Buckinghamshire, United Kingdom) e é constituída por 6,25 mg de medronato de sódio, 0,34 mg de fluoreto estanhoso e 2 mg de p-aminobenzonato de sódio.

2.2.1 – Preparação e Controlo de qualidade do ^{99m}Tc -MIBI

Para a obtenção do radiofármaco ^{99m}Tc -MIBI, adicionaram-se cerca de 1850 MBq de ^{99m}Tc em 4 mL de uma solução isotónica de NaCl 9‰ à formulação farmacêutica, de acordo com as indicações do fabricante. Imediatamente após a dissolução, a solução foi aquecida à temperatura de 100°C durante 10 minutos para que se dê a marcação.

Após o procedimento de marcação, o radiofármaco obtido foi sujeito a testes de controlo de qualidade que incluíram a determinação do pH pelo método de comparação de cores (pH-Fix 4.5-10.0, Machenerey-Nagel) e determinação da pureza radioquímica recorrendo à microcromatografia ascendente em camada fina. No caso das marcações com ^{99m}Tc as principais impurezas radioquímicas são o pertecnetato livre e as formas coloidais resultantes da hidrólise do pertecnetato, que se constituem em complexos de tecnécio reduzido-hidrolizado não ligado. Deste modo, a pureza radioquímica de um

complexo de ^{99m}Tc é expressa em percentagem de actividade presente na forma química desejada relativamente à radioactividade total. No caso presente, para o ^{99m}Tc -MIBI, havia a possibilidade de existirem duas espécies contaminantes para além do radiofármaco pretendido. Assim para a determinação das duas fracções, utilizámos um sistema de microcromatografia. Este sistema utiliza para fase estacionária tiras de 7,5 cm de comprimento e 2,5 cm de largura de óxido de alumínio sobre plástico da Baker-Flex #1 B-F, e para fase móvel o etanol 100% p.a. Merck. Neste sistema de microcromatografia o ^{99m}Tc -MIBI migra com a frente de solvente enquanto que o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e o ^{99m}Tc -reduzido-hidrolizado não ligado permanecem na origem, de acordo com a Figura 4.

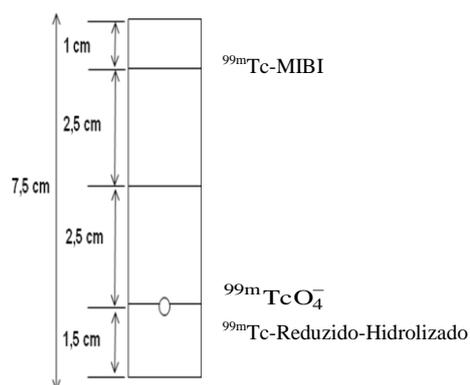


Fig.4 – Sistema microcromatográfico para o ^{99m}Tc -MIBI que possui para fase estacionária o óxido de alumínio sobre plástico e para fase móvel o etanol 100% p.a..

Antes da realização da microcromatografia para a quantificação do radiofármaco e dos contaminantes acima referidos, a tira é referenciada com finos traços a lápis a 1,5 cm, 4 cm e 6,5 cm, da base para o topo. Estes traços marcam a origem ($R_f=0$), o ponto médio ($R_f=0,5$) e a frente do solvente ($R_f=1$), respectivamente. Desta maneira a tira fica dividida em duas porções. Um centímetro cúbico de solvente é colocado num frasco de vidro de 10 cm^3 de volume com uma abertura de 1,2 cm de diâmetro. Sobre o primeiro

traço transversal, a 1,5 cm da extremidade inferior da tira e que referencia a origem colocou-se previamente 2 µl de etanol 100% p.a. Merck e de seguida 2 µl do complexo ^{99m}Tc-MIBI. A tira, depois de seca, foi então colocada dentro do frasco de vidro, em posição vertical, tendo em atenção que, o traço que marca a origem deve estar acima do nível do solvente. Após a frente do solvente atingir o traço de referência que se encontra a 1 cm da extremidade superior, retirou-se a tira, secou-se, cortou-se pelas marcas e separaram-se as partes, inferior e superior, para tubos devidamente identificados. Estes tubos, com as porções das tiras, foram contados num contador de poço (DPC Gamma C12). Para este radiofármaco, a quantidade percentual de cada fracção é dada pelas CPM (contagens por minuto) da metade da tira considerada em relação às CPM da tira toda. Assim, a percentagem (%) de ^{99m}Tc-MIBI consiste em:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc-Sestamibi} = \frac{\text{CPM}_{\text{metade superior da tira}}}{\text{CPM}_{\text{tira toda}}}$$

2.2.2 – Preparação e Controlo de qualidade do ^{99m}Tc-HMDP

Para a obtenção do radiofármaco ^{99m}Tc-HMDP, adicionaram-se cerca de 11840 MBq de ^{99m}Tc em 8 ml de uma solução isotónica de NaCl 9‰ à formulação farmacêutica, de acordo com as indicações do fabricante. Após a dissolução, a solução necessitou de um período de 20 minutos de incubação para que se desse a reacção de marcação.

Posteriormente ao procedimento de marcação, o radiofármaco obtido foi, do mesmo modo, sujeito a testes de controlo de qualidade com procedimentos semelhantes aos descritos anteriormente para o ^{99m}Tc-MIBI.

Igualmente neste caso e de acordo com o fabricante existem duas espécies

contaminantes, o pertecnetato livre e o tecnécio reduzido-hidrolizado não ligado. Para a determinação destas duas espécies contaminantes, para além do radiofármaco pretendido, utilizámos dois sistemas independentes de microcromatografia, como recomendado pelo fabricante. Para a determinação do tecnécio livre utilizámos para fase estacionária, tiras de 20 cm de comprimento e 2,5 cm de largura de Instant Thin Layer Chromatography Sílica Gel (ITLC-SG, Pall Corporation) e como fase móvel metiletilcetona (MEK p.a., Merck). Para quantificar o tecnécio reduzido-hidrolizado não ligado utilizámos a mesma fase estacionária, com as mesmas dimensões, e fase móvel uma solução de acetato de sódio numa concentração de 1 M.

No primeiro sistema cromatográfico acima referido, o ^{99m}Tc -reduzido-hidrolizado não ligado e o ^{99m}Tc -MDP permanecem na origem, enquanto que o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ migra com a frente do solvente. No segundo sistema o ^{99m}Tc -reduzido-hidrolizado não ligado separa-se dos restantes componentes permanecendo na origem enquanto que, o $^{99m}\text{TcO}_4^-$ e o ^{99m}Tc -MDP migram com a frente do solvente, de acordo com o representado figura 5.

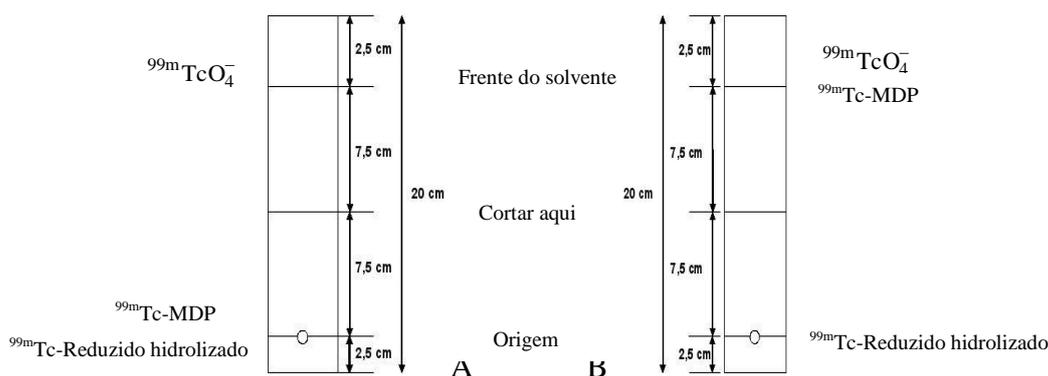


Fig.5 - A – Sistema 1 que possui como fase estacionária papel ITLC-SG e como fase móvel metiletilcetona. B – Sistema 2 que possui como fase estacionária ITLC-SG e como fase móvel acetato de sódio 1M.

Antes da realização da microcromatografia para a quantificação do radiofármaco e

dos contaminantes acima referidos, a tira é referenciada com finos traços a lápis a 2,5 cm, 10 cm e 17,5 cm, da base para o topo. Estes traços marcam a origem ($R_f=0$), o ponto médio ($R_f=0,5$) e a frente do solvente ($R_f=1$), respectivamente. Desta maneira, a tira fica dividida em duas porções. Um centímetro de altura de solvente é colocado num frasco de vidro apropriado para cromatografia ascendente. Sobre o primeiro traço transversal, a 2,5 cm da extremidade inferior da tira e que referencia a origem colocaram-se 2 μ l do complexo $^{99m}\text{Tc-MDP}$. A tira, de seguida, foi então colocada dentro do frasco de vidro, em posição vertical, tendo em atenção que, o traço que marca a origem deve estar acima do nível do solvente. Após a frente do solvente atingir o traço de referência que se encontra a 2,5 cm da extremidade superior, retirou-se a tira, secou-se, cortou-se pelas marcas e separaram-se as partes, inferior e superior, para tubos devidamente identificados. Estes tubos, com as porções das tiras, foram contados num contador de poço (DPC Gamma C12) com detector de Iodeto de sódio activado com tálio [NaI(Tl)], obtendo-se para cada porção as contagens por minuto (CPM), que correspondem ao número de interações com o cristal detector presente no contador de poço. O número de interações no cristal é proporcional à actividade presente em cada porção da tira, o que torna possível a quantificação de cada composto da mistura.

A quantidade percentual de cada componente é dada pelas CPM do componente isolado em relação às CPM da respectiva tira. Assim, a percentagem (%) de $^{99m}\text{TcO}_4^-$ em:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- = \frac{\text{CPM}_{\text{parte superior do 1}^\circ \text{ sistema}}}{\text{CPM}_{\text{tira todo do 1}^\circ \text{ sistema}}} \times 100$$

A % de consiste em ^{99m}Tc -reduzido-hidrolizado não ligado consiste:

$$\% \text{ } ^{99m}\text{Tc} - \text{Red} - \text{Hid} = \frac{CPM_{\text{parte inferior da tira 2}^\circ\text{ sistema}}}{CPM_{\text{tira total}^\circ\text{ sistema}}} \times 100$$

A pureza radioquímica do radiofármaco ^{99m}Tc -MDP traduz-se:

$$100 - \left(\% \text{ } ^{99m}\text{TcO}_4^- + \% \text{ } ^{99m}\text{Tc} - \text{Red} - \text{Hid} \right)$$

2.2.3 Imagiologia com os radiofármacos

Para os estudos de imagiologia nuclear utilizaram-se ratinhos *Balb/c nu/nu* fêmeas após anestesia, segundo o protocolo atrás referido. As imagens com ^{99m}Tc -HMDP foram obtidas 6 semanas após a injeção das células. Após a anestesia e imediatamente após a injeção de $17,6 \pm 13,3$ MBq de ^{99m}Tc -HMDP na veia dorsal da cauda, iniciou-se a aquisição dinâmica utilizando a câmara-gama (GE 400 AC), com um colimador de orifícios paralelos de alta resolução e baixa energia, acoplada a um computador de aquisição GenieAcq, que a controla. Esta aquisição dinâmica foi realizada para matriz de 128×128 pixels, com um zoom de 2, durante 10 minutos, 30 segundos cada frame. Seguidamente, adquiriram-se imagens estáticas para matrizes de 256×256 elementos de resolução, com duração individual de 2 minutos, e igualmente com zoom 2, aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do ^{99m}Tc -HMDP. As imagens depois de adquiridas foram transferidas para uma estação de trabalho XELERIS, onde foram processadas.

O processamento consistiu no desenho de *regions of interest* (ROIs) sobre as

projeções tumorais de modo a obter curvas actividade/tempo que traduzem o comportamento do radiofármaco ao longo do tempo. Com esta curva é possível calcular parâmetros característicos que permitiram inferir acerca da dinâmica do ^{99m}Tc -HMDP nas áreas tumorais.

Sete dias após a administração de ^{99m}Tc -HMDP, procedeu-se à injeção de $17,6 \pm 13,3$ MBq de ^{99m}Tc -MIBIna veia dorsal da cauda. Realizou-se um protocolo imagiológico semelhante ao descrito anteriormente, com uma aquisição dinâmica inicial com a duração de 10 minutos, 30 segundos cada frame, com uma matriz de 128×128 pixels e zoom 2, seguida de imagens estáticas com matriz de 256×256 elementos de resolução de imagem, com duração individual de 2 minutos, e igualmente com zoom 2, aos 30, 60, 90 e 120 minutos após a administração do ^{99m}Tc -Sestamibi. As imagens então adquiridas foram transferidas para uma estação de trabalho XELERIS, onde foram processadas.

O processamento consistiu em desenho de ROIs sobre as projeções tumorais, a obtenção de curvas actividade/tempo e cálculo de parâmetros característicos que permitiram inferir acerca da dinâmica da captação do radiofármaco pelas áreas tumorais.

3. Estudos *ex vivo*

O sacrifício dos animais decorreu 8 semanas após a injeção das células tumorais, por deslocamento cervical, de acordo com a legislação em vigor. Foi realizada a autópsia com colheita de órgãos tais como pulmão, fígado, cérebro, rins, baço, útero e ovários, bem como todas as localizações macroscopicamente suspeitas de desenvolvimento de metástases.

Após a colheita, cada órgão de interesse foi medido e pesado. Relativamente ao pulmão, foi feita a separação dos diferentes lobos, considerando-se do pulmão direito um fragmento do lobo cranial, médio, caudal e acessório e do lobo esquerdo um fragmento médio e outro inferior. O fígado foi também dividido em lobo esquerdo lateral, esquerdo médio, direito médio e direito lateral. O cérebro foi separado em cérebro anterior e posterior. Os fragmentos dos órgãos foram imediatamente preservados em formol tamponado.

3.1 Histologia e morfometria

Cada fragmento de órgão fixado foi submetido a inclusão em parafina, corte aleatório e colocação sobre lâminas. Posteriormente foram submetidos à técnica de coloração base com hematoxilina e eosina (H&E).

Em cada secção de fragmento pulmonar e hepático foi avaliada a presença de metástases. Todas as lâminas com imagens sugestivas de localizações secundárias foram fotografadas. Posteriormente as imagens foram analisadas através do desenho de ROIs, o que permitiu obter parâmetros relativos à área total de pixels.

3.3 Imunohistoquímica

A análise por IHQ foi realizada em secções de tecidos fixadas em formol tamponado e posteriormente incluídas em parafina. Foram seleccionados 9 casos do grupo MCF7 e 8 casos do grupo HCC1806, de acordo com a representatividade da metástase. Foi avaliada a marcação de RE (RE α referência N1575 Dako[®]), RP (RP.AB2, referência RP-MS-192-TO Neomarkers[®]), C-erb/HER-2/neu (referência RB-9040-R7 Thermo[®]) e CK5/6 (referência IR780 Dako[®]).

Para os RE, RP e CK5/6 foi atribuído um *score* semi-quantitativo baseado na intensidade e proporção de células tumorais marcadas (0, +, ++, +++). O valor de *cut-off* de positividade foi 10% de marcação.

Para o HerB-2 foram utilizados os critérios da FDA, considerando-se 0 sem marcação, 1+ marcação fraca em menos de 30% das células, 2+ marcação completa da membrana em menos de 10% das células, 3+ marcação intensa e uniforme da membrana em pelo menos 30% das células. Considerada marcação relevante para a sobreexpressão HerB-2 a intensidade 3+ (46).

4. Análise estatística

Para estudar o significado estatístico dos dados da histologia e morfometria e após avaliação e confirmação da normalidade das distribuições relativas às variáveis quantitativas, através do teste de Kolmogorov-Smirnov, compararam-se os valores médios obtidos em cada parâmetro através da ANOVA com comparações múltiplas *post-hoc* pelo teste de *Tukey* sempre que se justificasse.

Utilizou-se a análise de regressão logística iterativa, por blocos, e análise de regressão logística pelo método *enter* para identificar possíveis preditivos de metastização hepática (a confirmar futuramente dada a reduzida dimensão da amostra para este tipo de técnica estatística), escolhendo-se o método que mostrar melhor ajuste aos dados através do teste de *Hosmer-Lemeshow*. Os resultados foram confirmados recorrendo a análise de componentes principais categórica.

Na análise dos dados referentes à marcação por IHQ foi utilizado o teste de *McNemar*.

Todos os resultados foram avaliados ao nível de significância de 0.05, e obtidos recorrendo à aplicação SPSS, versão 17.0.

CAPÍTULO IV
RESULTADOS

Os métodos descritos anteriormente foram aplicados com o intuito de distinguir a disseminação hematogénica *in vivo* característica de cada tipo celular de cancro da mama, concretamente de células que expressam RH e as triplas negativas.

Estruturaram-se os resultados de acordo com os estudos imagiológicos e análise *ex vivo*, incluindo estudo morfométrico e IHQ.

A figura 6 representa os três grupos considerados. Diferenciam-se os animais sujeitos a estudos de medicina nuclear.

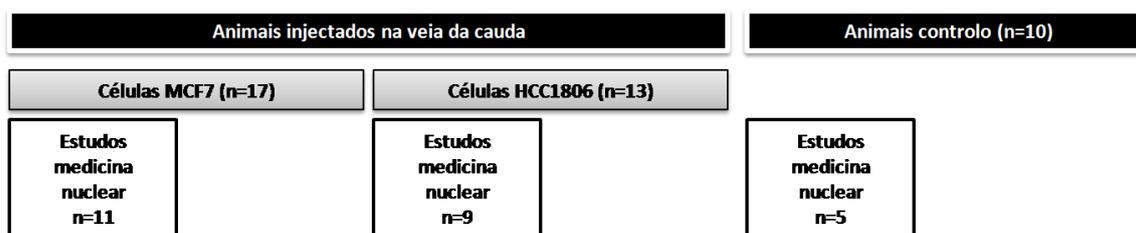


Figura 6 - Esquema representativo dos grupos de ratinhos *balbc nu nu* sujeitos aos estudos experimentais.

1. Estudos imagiológicos

Após a propagação das células em cultura e de acordo com o procedimento já descrito, estas foram marcadas com ^{99m}Tc -HMPAO e injectadas na veia da cauda dos ratinhos *Balb/c nu nu*. Após a injeção das células e a realização de imagens dinâmicas observou-se um padrão de embolização, verificando-se marcação predominante em localização pulmonar, como se pode observar na figura 7. Ao longo de duas horas,

durante o qual foram obtidas imagens, não se verificou movimentação das células para outros órgãos.

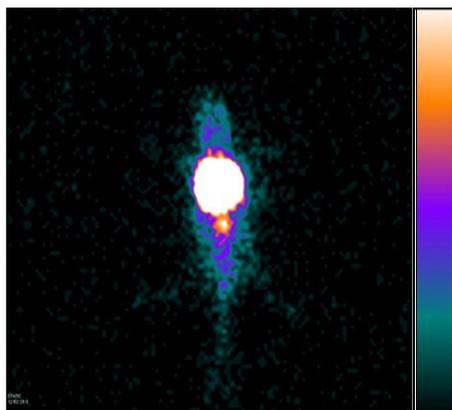


Figura 7 - Imagem representativa da embolização pulmonar com ^{99m}Tc-HMPAO.

Para detectar focos de metastização foram realizadas imagens estáticas utilizando como radiofármacos o ^{99m}Tc-MIBI e o ^{99m}Tc-HMDP 7 a 8 semanas após a injeção de células tumorais.

Como as metástases mais frequentes do cancro da mama têm localização óssea, utilizou-se um derivado de fosfonatos, o ^{99m}Tc-HMDP, para avaliar a existência de eventuais metástases. Por outro lado, a utilização de um derivado dos isonitrilos, o ^{99m}Tc-MIBI, justifica-se pois a sua captação está relacionada com a lipofilia, a qual influencia a entrada por difusão passiva na célula ao mesmo tempo que a carga positiva faz com que sofra uma forte atracção electrostática pela membrana interna da mitocôndria carregada negativamente. De facto, dadas estas características, 90% do

^{99m}Tc -MIBI concentra-se na mitocôndria sendo pois um radiofármaco que dá informação acerca da localização de tumores.

Após o desenho de ROIs sobre as projecções dos órgãos alvo nas imagens adquiridas com os diferentes radiofármacos verificou-se que não existiam diferenças significativas entre as contagens obtidas nas ROIs dos animais controlo e dos animais injectados com as duas linhas celulares de tumores da mama. No entanto, com os radiofármacos utilizados foram detectadas possíveis focos de metastização.

Num animal injectado com células MCF-7 foi possível visualizar com administração de ^{99m}Tc -HMDP a existência de uma hiperfixação de radiofármaco em diferentes zonas representativo de possíveis focos de metastização óssea (figura 8). Para além disso em outro animal injectado com a mesma linha celular foi possível observar que após a administração de ^{99m}Tc -MIBI verificou-se um aumento da captação a nível pulmonar e na região pélvica, indicativo de possíveis focos de metastização, como representado na figura 8.

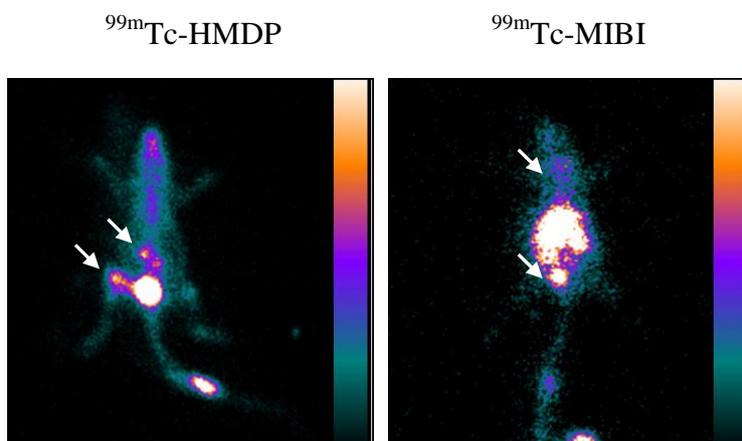


Figura 8 - a) Imagem estática obtida após a administração de ^{99m}Tc -HMDP. Imagem estática obtida após a administração de ^{99m}Tc -MIBI.

2. Estudos *ex vivo*

Os animais injectados com células tumorais foram sacrificados 8 semanas após a injeção de cerca de $1,5 \times 10^6$ células tumorais na veia da cauda. Na tabela I descrevem-se as dimensões dos animais bem como da massa de acordo com o grupo considerado. Verificou-se que os grupos de ratinhos, consoante as células injectadas, eram homogéneos relativamente a estas características (respectivamente $p = 0,161$, $p = 0,531$ e $p = 0,975$ para cada dimensão considerada).

Tabela I – Massa e dimensões dos animais de cada grupo

	Células Injectadas	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Peso (g)	MCF7	17	22,7	2,6	17,2	28,7
	HCC1806	13	23,1	2,5	19,3	26,8
	Controlo	10	21,2	1,6	19,3	24,2
	Total	40	22,5	2,4	17,2	28,7
p=0,161						
Comprimento focinho-cauda (cm)	MCF7	17	17,7	0,9	16	20
	HCC1806	13	17,7	1,0	17	20
	Controlo	10	17,3	0,8	16	18
	Total	40	17,6	0,9	16	20
p=0,531						
Comprimento focinho-ânus (cm)	MCF7	17	8,6	0,7	7	10
	HCC1806	13	8,6	0,7	8	11
	Controlo	10	8,5	0,5	8	9
	Total	40	8,6	0,7	7	11
p=0,975						

No grupo de animais injectados com células MCF7 identificaram-se dois casos com metástases macroscópicas extra pulmonares ou hepáticas. Num dos casos descreve-

se uma neoformação com origem no fémur esquerdo, com cerca de 15x16x14 mm, infiltrando os tecidos adjacentes, arredondada, de limites irregulares, dura e de coloração esbranquiçada. O outro caso correspondeu a uma metástase pélvica, aderente ao retroperitoneu e desviando o útero para a esquerda, medindo cerca de 10 mm de maior eixo. Apresentava forma ovalada, superfície irregular e coloração amarelada. A secção revelou macroscopicamente necrose central.

2.1 – Metastização pulmonar

Todos os animais injectados com células tumorais (n=30) apresentaram focos de metastização pulmonar no estudo histológico. A tabela II sistematiza a distribuição da metastização pelos lobos pulmonares.

Tabela II – Distribuição da metastização pelos lobos pulmonares.

Lobo pulmonar	Sim	Não
Direito cranial	28 (70,0%)	12 (30,0%)
Direito medial	27 (67,5%)	13 (32,5%)
Direito caudal	24 (60,0%)	16 (40,0%)
Direito acessório	25 (62,5%)	15 (37,5%)
Esquerdo médio	26 (65,0%)	14 (35,0%)
Esquerdo inferior	24 (60,0%)	16 (40,0%)

Na tabela III descreve-se a massa de cada pulmão, esquerdo e direito, em cada grupo de ratinhos aquando do estudo necróptico.

Tabela III – Massa pulmonar de cada grupo de animais.

	Células injectadas	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Pulmão direito (g) (p = 0,252)	MCF7	16	0,17	0,07	0,10	0,33
	HCC1806	13	0,15	0,06	0,07	0,34
	Controlo	10	0,13	0,04	0,09	0,19
	Total	39	0,15	0,06	0,07	0,34
Pulmão esquerdo (g) (p = 0,058)	MCF7	16	0,10	0,06	0,04	0,19
	HCC1806	13	0,08	0,06	0,04	0,28
	Controlo	10	0,05	0,02	0,04	0,09
	Total	39	0,08	0,05	0,04	0,28

Assim, de acordo com os resultados, foi possível verificar que não existe diferença estatisticamente significativa na massa média do pulmão direito consoante o tipo de células injectadas (p = 0,252). No pulmão esquerdo a diferença é tendencialmente significativa (p = 0,058) no sentido de que a massa média é superior na presença de MCF7 ($0,10 \pm 0,01$) relativamente ao grupo controlo ($0,05 \pm 0,01$) com p = 0,045, representado na figura 9.

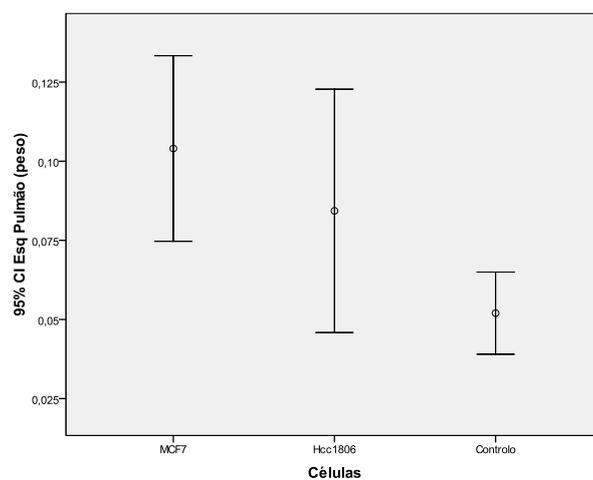


Figura 9 - Gráfico descritivo da variação da massa dos três grupos de animais.

O número de focos de metastização pulmonar não foi significativamente diferente entre os ratinhos injectados com células MCF7 e HCC1806, conforme a tabela IV.

Tabela IV – Número de focos de metastização pulmonar.

Nº focos	Células injectadas	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Total (p = 0,906)	MCF7	17	43	27,8	1	96
	HCC1806	13	45	36,9	10	123
	Total	30	44	31,5	1	123
Lobo direito cranial (p = 0,574)	MCF7	16	7	5,2	1	19
	HCC1806	12	9	6,8	1	25
	Total	28	8	5,9	1	25
Lobo direito médio (p = 0,692)	MCF7	16	9	6,8	1	27
	HCC1806	11	8	7,9	1	25
	Total	27	8	7,2	1	27
Lobo direito caudal (p = 0,615)	MCF7	13	8	4,4	2	15
	HCC1806	11	9	7,2	2	22
	Total	24	9	5,8	2	22
Lobo direito acessório (p = 0,162)	MCF7	14	6	3,9	1	14
	HCC1806	12	10	9,9	3	34
	Total	26	8	7,5	1	34
Lobo esquerdo médio (p = 0,229)	MCF7	15	10	5,2	2	20
	HCC1806	11	8	5,3	2	17
	Total	26	9	5,3	2	20
Lobo esquerdo inferior (p = 0,650)	MCF7	14	10	6,9	2	31
	HCC1806	10	8	5,1	1	15
	Total	24	9	6,2	1	31

Analisando a área média de cada foco metastático por lobo pulmonar, os ratinhos injectados com células MCF7 apresentam valores médios significativamente superiores aos injectados com HCC1806 (p = 0,023). A zona média do pulmão esquerdo apresentou área média significativamente superior para este tipo de células (p = 0,040), conforme descrito na tabela V.

As imagens histológicas representadas nas figuras 10, 11, 12 correspondem a metastização pulmonar de animais injectados com MCF7 e nas figuras 13, 14 e 15 os

casos injectados com HCC1806. Este dado histológico aponta para a maior extensão das lesões pulmonares no grupo injectado com MCF7 em comparação com HCC 1806.

Tabela V – Área média (pixels) dos focos de metastização por cada lobo pulmonar.

Área média (pixels)	Células injectadas	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Foco / lobo (p = 0,023)	MCF7	17	58192,1	49387,2	10839,5	199163,3
	HCC1806	13	24263,5	12369,9	8816,4	56895,8
	Total	30	43489,7	41248,5	8816,4	199163,3
Foco / lobo direito cranial (p = 0,171)	MCF7	16	53983,6	64046,9	8854	254841
	HCC1806	12	26646,2	22526,2	6163	74619
	Total	28	42267,5	51724,5	6163	254841
Foco / lobo direito medial (p = 0,723)	MCF7	16	37088,2	25456,9	8449	109706
	HCC1806	11	33553,6	24624,7	8898	90849
	Total	27	35648,2	24702,9	8449	109706
Foco / lobo direito caudal (p = 0,059)	MCF7	13	69315,3	78741,2	5726	260222
	HCC1806	11	21373,9	12188,4	6912	45599
	Total	24	47342,2	62408,9	5726	260222
Foco / lobo direito acessório (p = 0,106)	MCF7	13	97271,2	152167,4	7564	569825
	HCC1806	12	22935,8	15516,4	6955	59555
	Total	25	61590,2	114562,2	6955	569825
Foco / lobo esquerdo médio (p = 0,040)	MCF7	15	50386,8	41533,7	11015	136705
	HCC1806	11	22213,8	11655,1	7462	40996
	Total	26	38467,5	34954,9	7462	136705
Foco / lobo esquerdo inferior (p = 0,368)	MCF7	14	35904,3	32183,8	12518	119062
	HCC1806	10	24916,6	23251,5	5051	84738
	Total	24	31326,1	28768,4	5051	119062

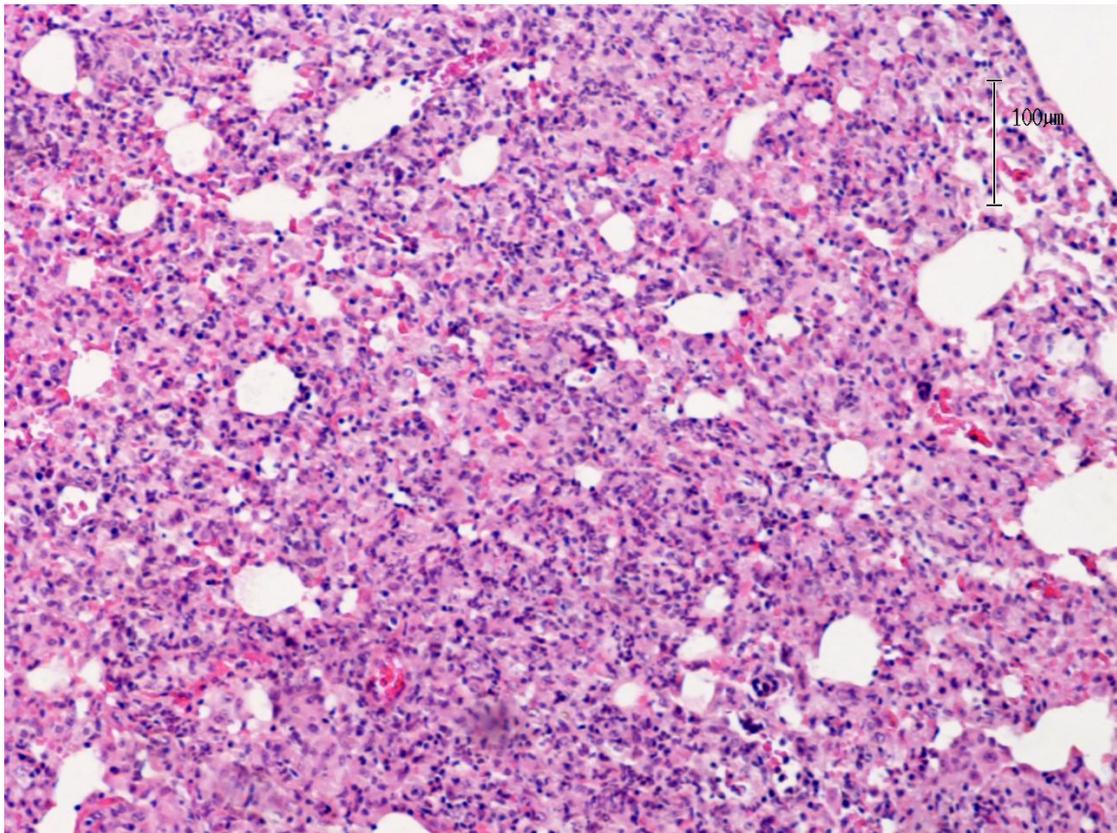


Figura 10 – Imagem histológica de focos de metastização pulmonar de animais injectados com MCF7.

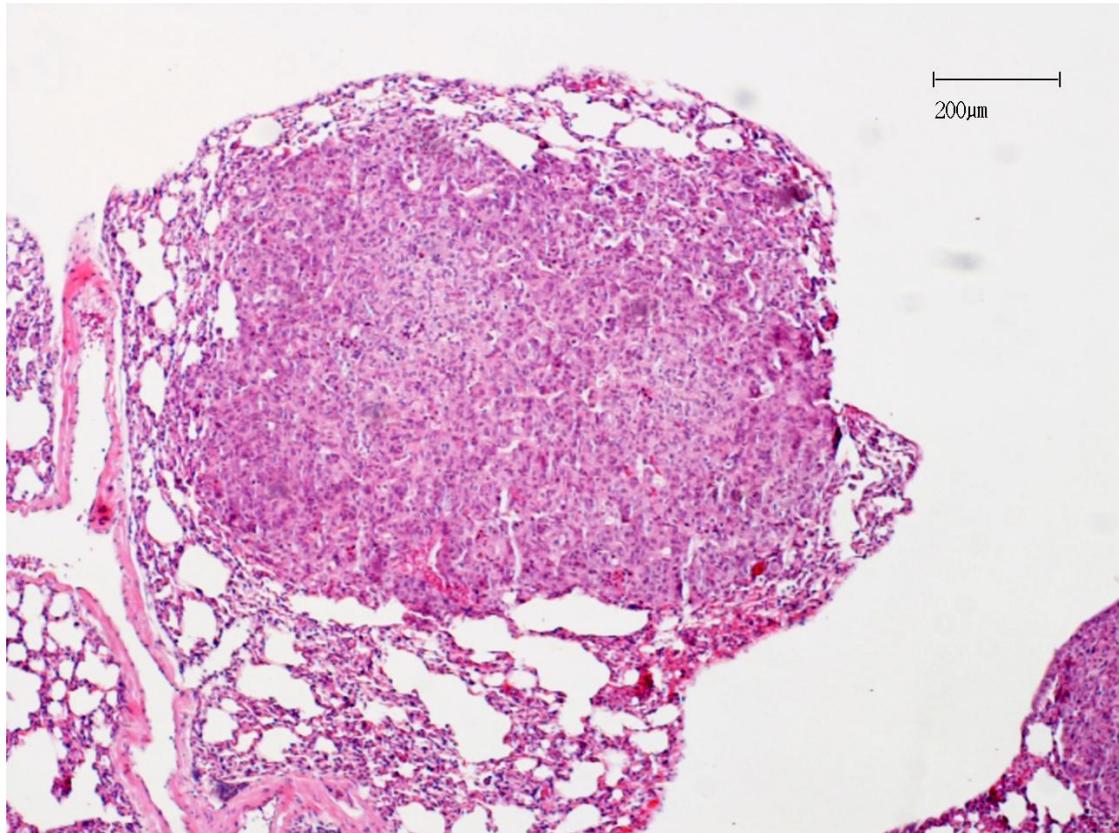


Figura 11 – Imagens histológicas de focos de metastização pulmonar de animais injectados com MCF7.

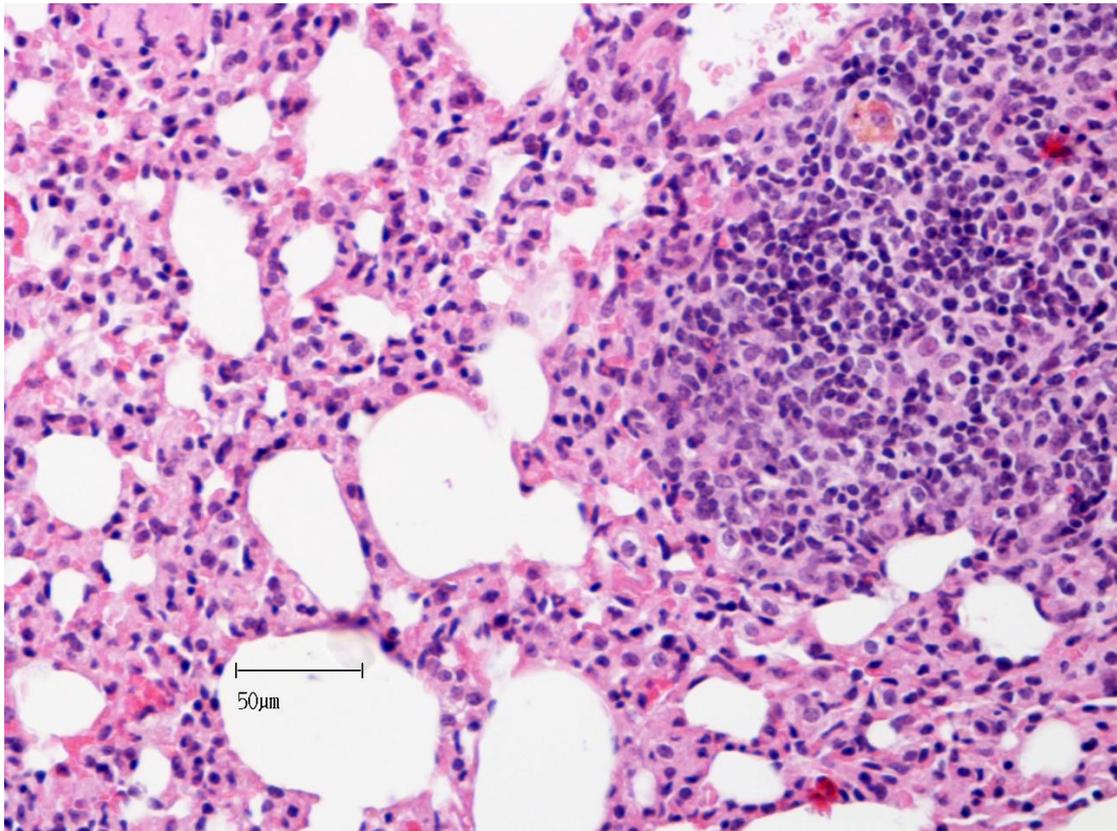


Figura 12 – Imagens histológicas de focos de metastização pulmonar de animais injectados com MCF7.

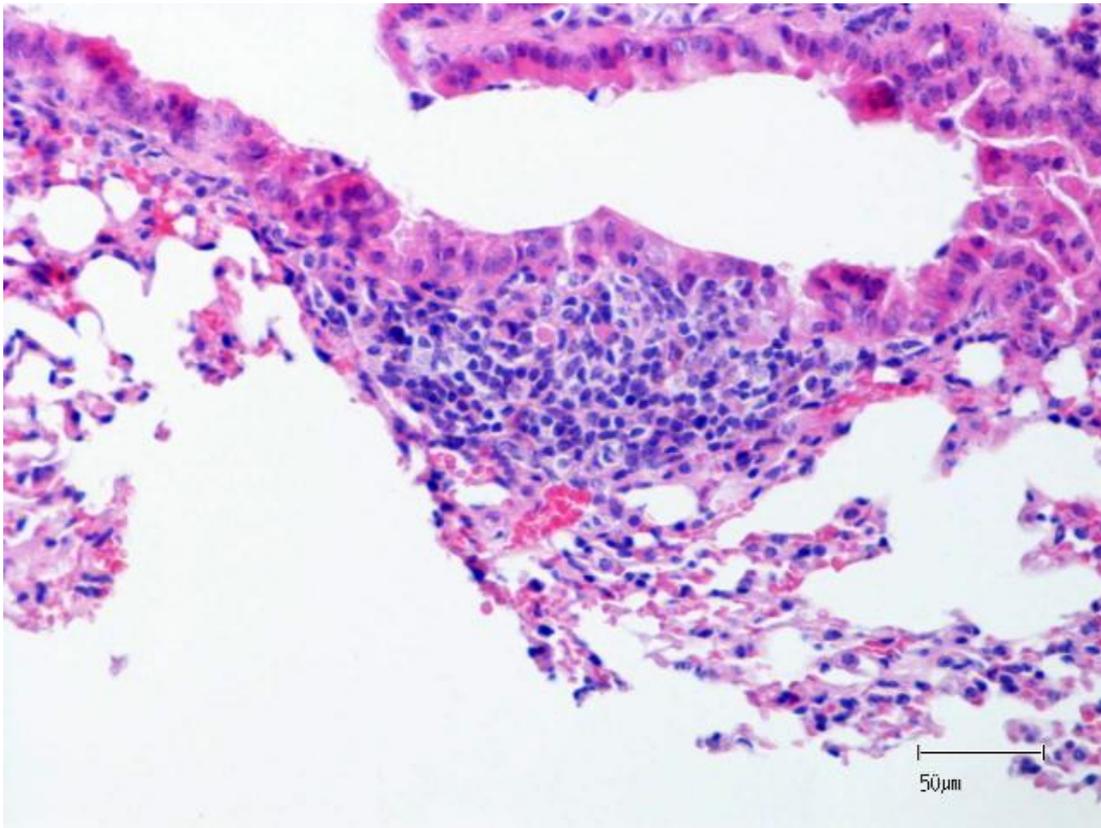


Figura 13 – Imagens histológicas de focos de metastização pulmonar de animais injectados com HCC1806.

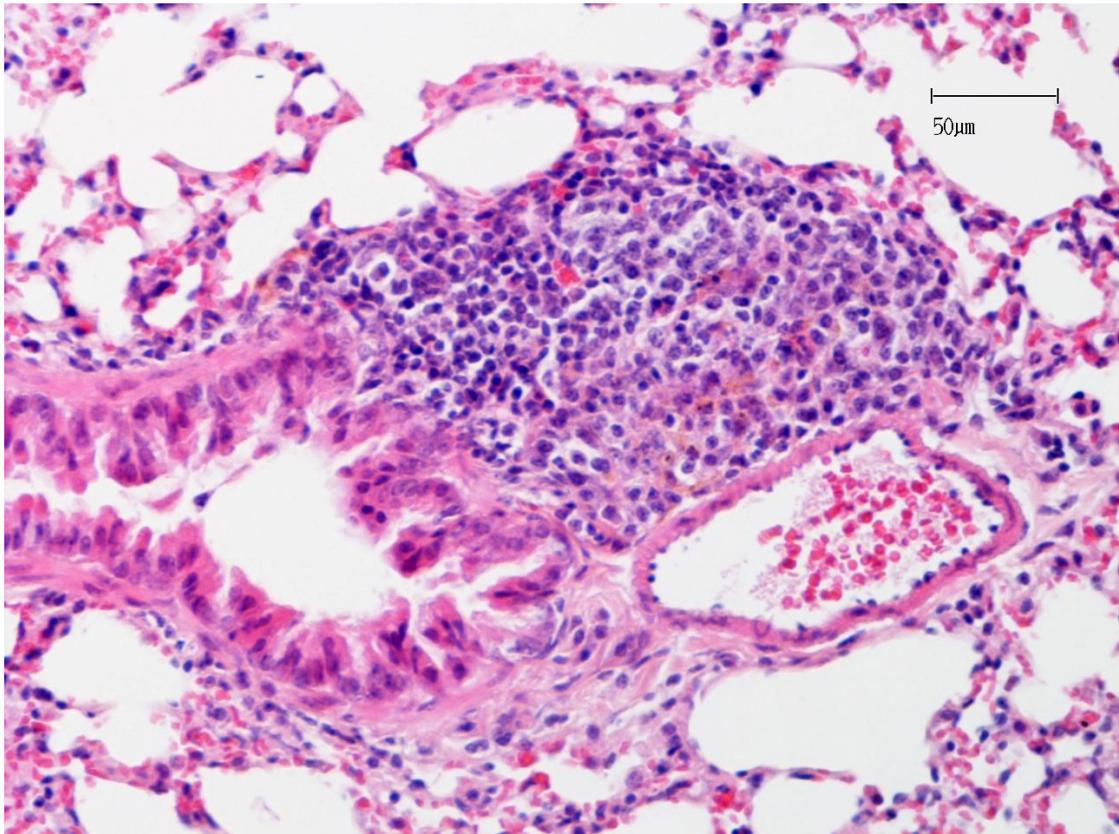


Figura 14 – Imagens histológicas de focos de metastização pulmonar de animais injectados com HCC1806.

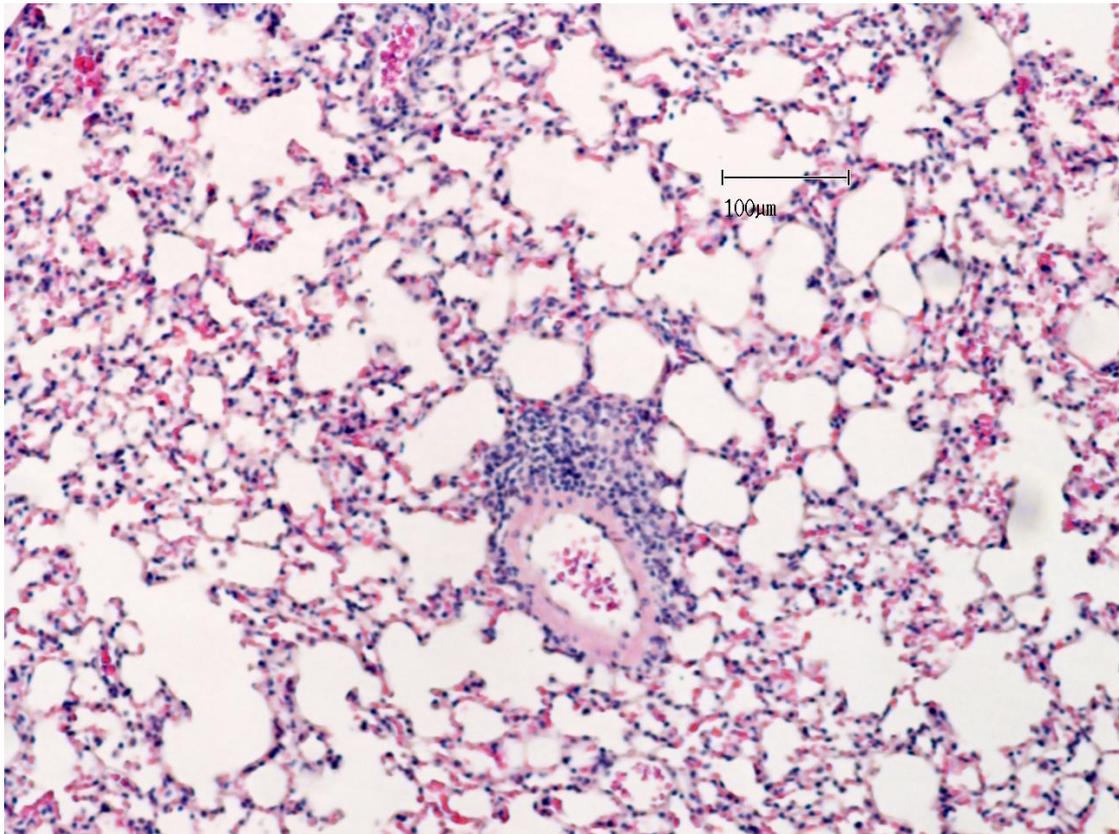


Figura 15 – Imagens histológicas de focos de metastização pulmonar de animais injectados com HCC1806.

2.2 – Metastização hepática

Considerando os 30 animais injectados com MCF7 e HCC 1806, verificou-se a presença histológica de metastização hepática em 14 casos (47%). A distribuição por cada lobo hepático está sistematizada na Tabela VI.

Tabela VI – Metastização hepática de acordo com diferentes lobos.

Lobo	Sim	Não
Esquerdo lateral	7 (23%)	23 (77%)
Esquerdo médio	10 (33%)	20 (67%)
Direito médio	10 (33%)	20 (67%)
Direito lateral	7 (23%)	23 (77%)

A massa média do fígado é idêntica entre os dois grupos de animais submetidos a injeção de células MCF7 e HCC1806 e grupo controlo ($p = 0,091$), sem diferença estatisticamente significativa, conforme a tabela VII.

Tabela VII – Massa do fígado nos diferentes grupos de animais.

	Células Injectadas	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Massa (g) ($p = 0,091$)	MCF7	17	1,39	0,31	0,9	2,2
	HCC1806	13	1,40	0,29	1,0	2,0
	Controlo	10	1,17	0,12	1,0	1,4
	Total	40	1,34	0,28	0,9	2,2

Considerando o grupo injectado com MCF7, verificou-se metastização hepática em 29% (n=5). Por outro lado, nos animais injectados com HCC1806 foi detectada presença de lesão secundária com esta localização em 69% (n=9). O número de focos metastáticos no fígado é significativamente superior ($p = 0,006$) quando se analisa o grupo injectado com HCC1806 (em média, 1,81 a 9,73), relativamente ao injectado com MCF7 (em média 0,13 a 2,22), descrito na figura 16.

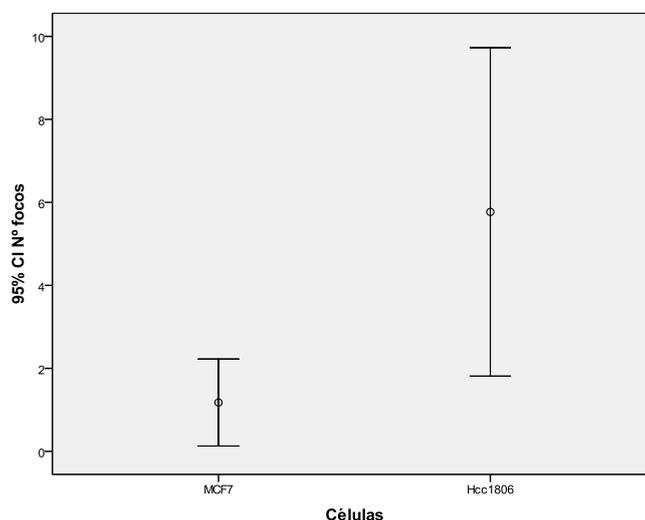


Figura 16 - Representação do número médio de focos metastáticos no fígado dos animais injectados com MCF7 e HCC1806.

No entanto, não se encontra diferença estatisticamente significativa entre os grupos considerando a metastização nos diferentes lobos hepáticos, representado na tabela VIII. De notar que a variabilidade encontrada no grupo HCC1806 é cerca de 3 vezes superior à variabilidade encontrada em MCF7.

Tabela VIII - Número de focos de metastização hepática.

Nº focos	Células injectadas	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Total (p = 0,011)	MCF7	17	1,2	2,04	0	6
	HCC1806	13	5,8	6,55	0	22
	Total	30	3,2	5,04	0	22
Lobo esquerdo lateral (p = 0,149)	MCF7	4	1,8	0,96	1	3
	HCC1806	3	3,3	1,53	2	5
	Total	7	2,4	1,39	1	5
Lobo esquerdo médio (p = 0,214)	MCF7	4	1,3	0,50	1	2
	HCC1806	7	4,0	4,00	1	11
	Total	11	3,0	3,41	1	11
Lobo direito médio (p = 0,257)	MCF7	3	2,3	1,53	1	4
	HCC1806	6	4,7	3,01	1	10
	Total	9	3,9	2,76	1	10
Lobo direito lateral (p = 0,604)	MCF7	1	1,0	.	1	1
	HCC1806	6	1,5	0,84	1	3
	Total	7	1,4	0,78	1	3

Na figura 17, 18 e 19, 20, representam-se imagens histológicas da metastização pulmonar de animais injectados com MCF7 e HCC1806, respectivamente. As imagens ilustram um maior número de focos pulmonares no grupo injectado com HCC 1806 em relação ao grupo MCF7.

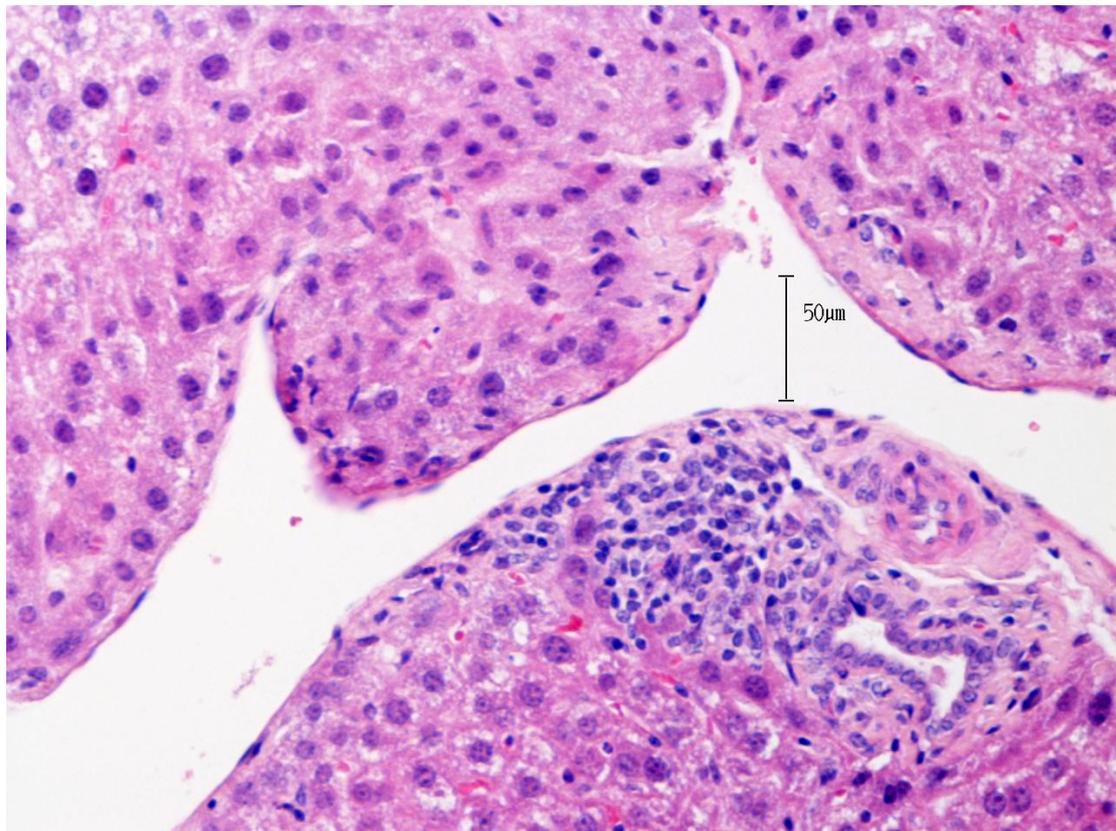


Figura 17 – Imagens histológicas de focos de metastização hepática de animais injectados com MCF7.

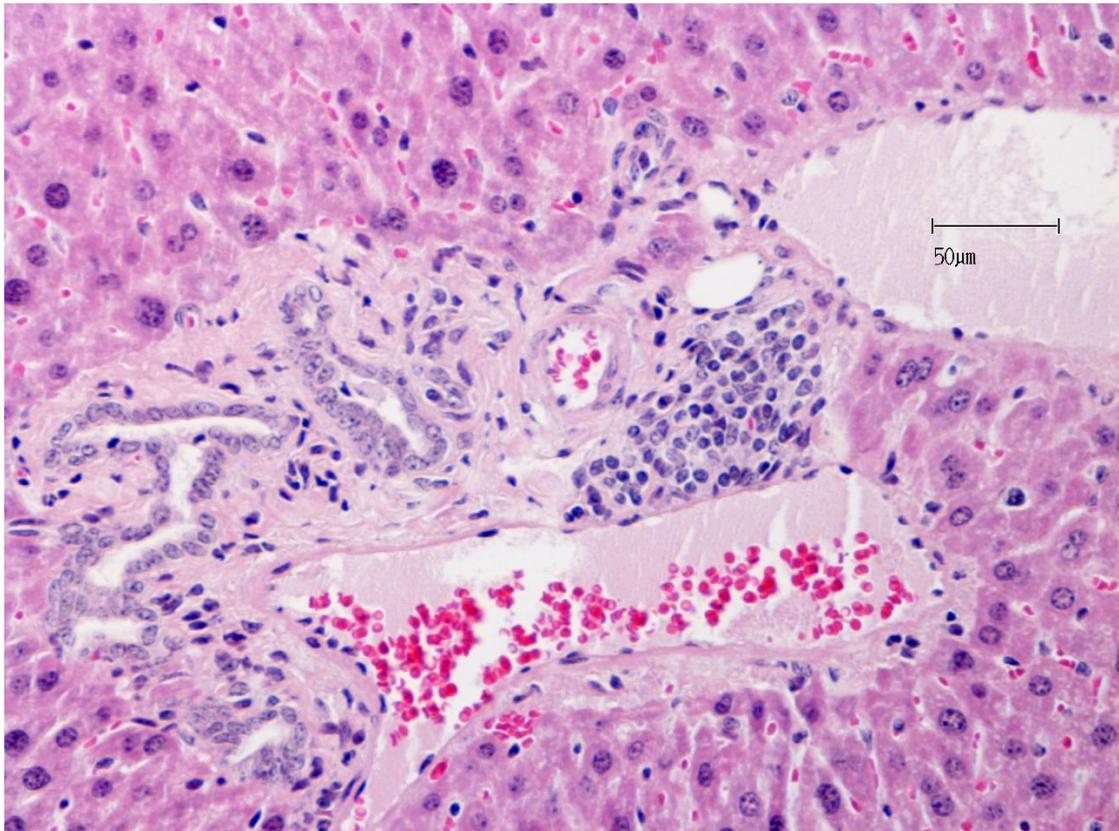


Figura 18 – Imagens histológicas de focos de metastização hepática de animais injectados com MCF7.

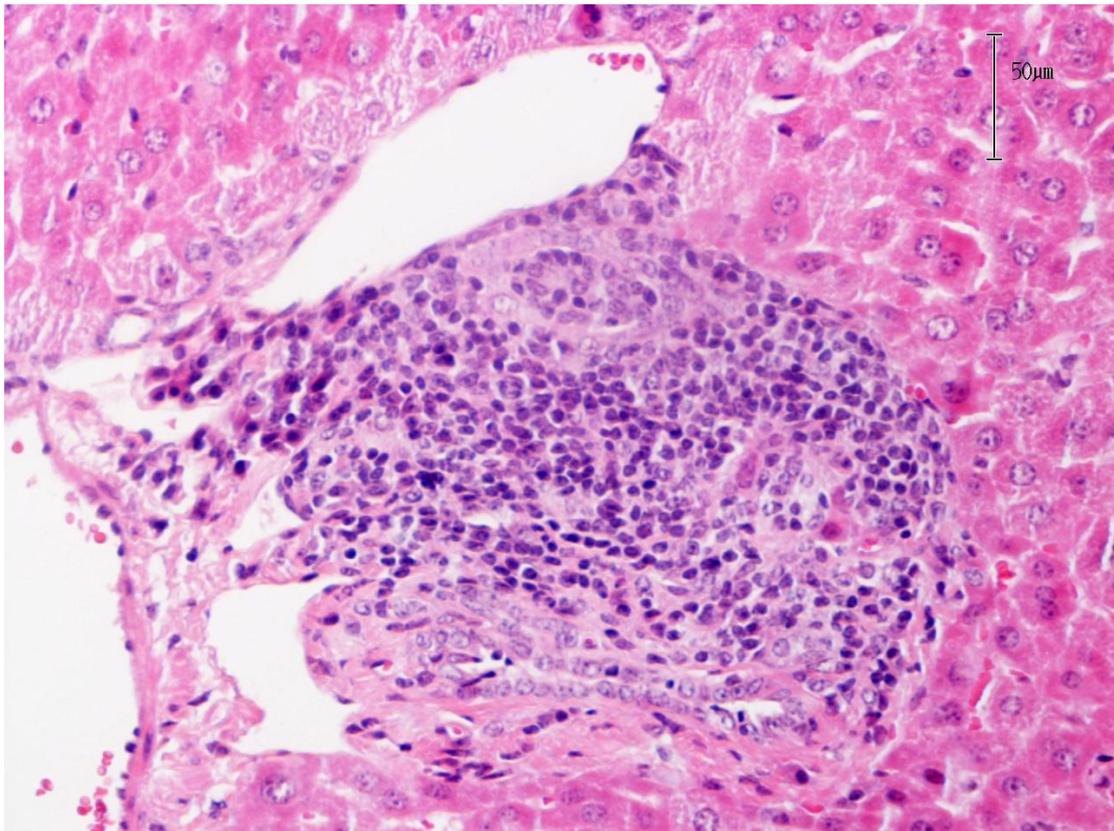


Figura 19 – Imagens histológicas de focos de metastização hepática de animais injectados com HCC1806.

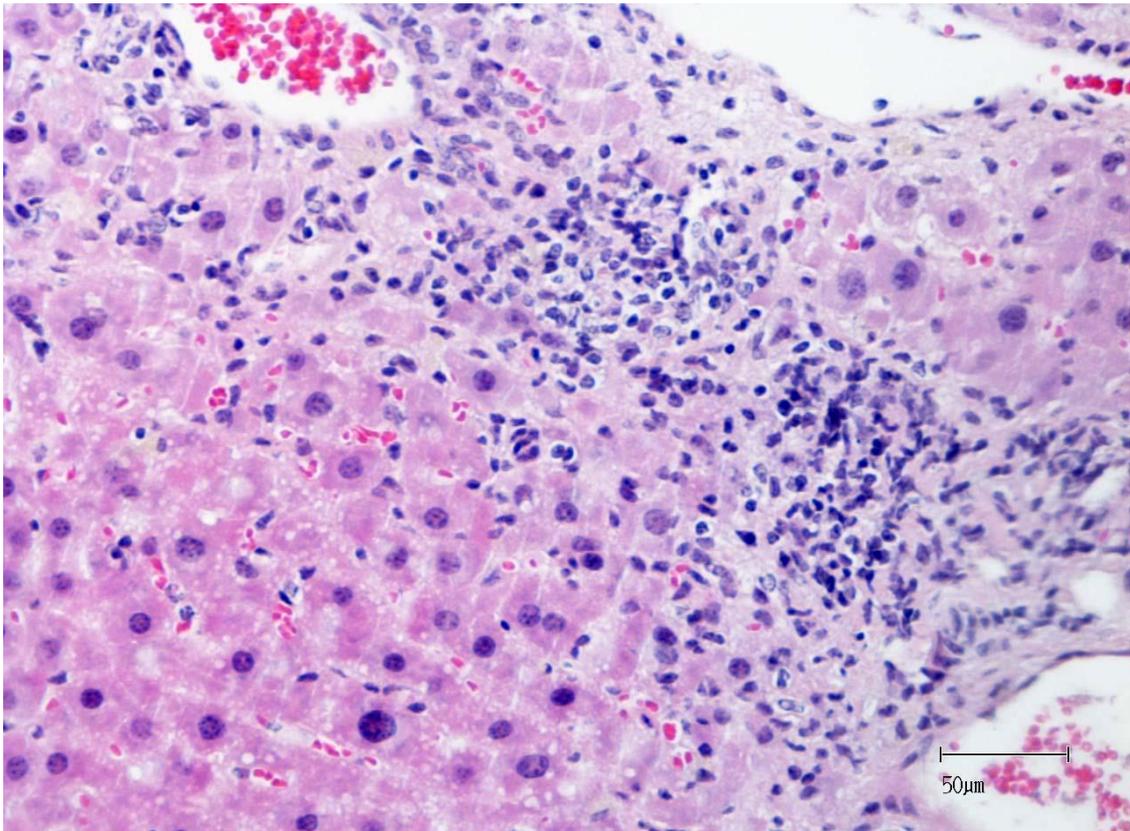


Figura 20 – Imagens histológicas de focos de metastização hepática de animais injectados com HCC1806.

A área média, em pixels, dos focos de metastização por cada lobo hepático e a área média em cada região não parece ter alterações consoante o grupo injectado com MCF7 ou HCC1806, observado na tabela IX.

Tabela IX – Área média (pixels) dos focos de metastização por cada lobo hepático.

Área média (pixels)	Células injectadas	N	Média	Desvio padrão	Mínimo	Máximo
Foco / lobo (p = 0,485)	MCF7	5	6989,3	3331,1	3109	9943
	HCC1806	9	5852,3	2543,9	2928	9457
	Total	14	6258,4	2777,8	2928	9943
Foco / lobo esquerdo lateral (p = 0,565)	MCF7	4	6744,5	4579,2	3588	13533
	HCC1806	3	9091,3	5561,6	3122	14127
	Total	7	7750,3	4729,5	3122	14127
Foco / lobo esquerdo médio (p = 0,769)	MCF7	4	6958,3	7153,9	2676	17609
	HCC1806	7	5923,0	4350,0	3173	15099
	Total	11	6299,5	5194,2	2676	17609
Foco / lobo direito médio (p = 0,751)	MCF7	3	4758,0	2062,2	2824	6928
	HCC1806	6	4427,0	1054,8	2928	5687
	Total	9	4537,3	1336,4	2824	6928
Foco / lobo direito lateral (p = 0,581)	MCF7	1	13860,0	.	13860	13860
	HCC1806	6	9086,5	7503,4	2914	23029
	Total	7	9768,4	7083,3	2914	23029

A regressão logística mostra que a injeção de células HCC1806 potencia o desenvolvimento de metástases hepáticas (*odds ratio* = 16; p = 0,030), apresentando este modelo de previsão uma sensibilidade de 88,9%, especificidade de 66,7%, e uma exactidão final de 77,8%. O número de focos, área média ou soma das áreas por lobo pulmonar não são preditivos da metastização no fígado.

Um segundo modelo de previsão foi encontrado, ainda que com menor exactidão (70%). Verificou-se que a presença de células MCF7 associa-se a menor risco e ao facto de não ser

potenciador da metastização hepática. Esta diminuição do risco de desenvolver metastização hepática com as células MCF7 estima-se que seja cerca de 5,4 vezes superior ($p = 0.36$). Este modelo apresenta uma sensibilidade de 75% e especificidade de 64,3%. Considerando a análise gráfica, a figura 21 representa os componentes principais. A análise deste gráfico permite inferir que a metastização no fígado é independente do número de focos encontrados no pulmão. Por outro lado o aumento de metastização no fígado está relacionado com a presença de células HCC1806 e a ausência de células MCF7, embora a 1ª associação seja mais forte. Eventualmente poderá existir uma associação entre metastização no fígado e menor área média de pixels no pulmão, ou soma da área/lobo no pulmão (vectores com ângulo de cerca de 180°), embora estas variáveis não tenham sido identificadas como preditivos da metastização no fígado na regressão logística efectuada.

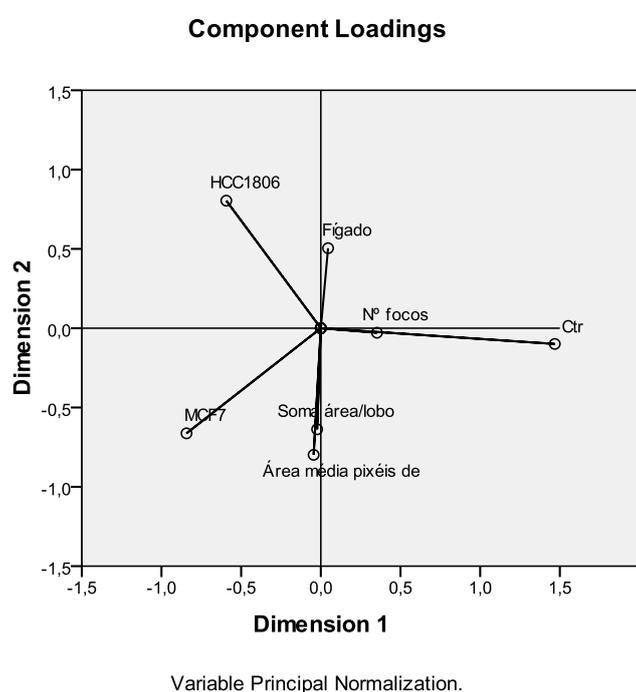


Figura 21 - Representação gráfica do modelo de regressão logística para os factores preditivos de metastização hepática.

2.3 – Estudo imunohistoquímico

O estudo imunohistoquímico teve como alvo a marcação para RE, RP, ErbB-2 e CK5/6. Foram aplicadas as técnicas em 9 lâminas do grupo de animais injectado com MCF7 e 8 lâminas do grupo injectado com HCC1806. O estudo das lesões hepáticas revelou-se insuficiente dado que não foi possível atingir lesões secundárias nas secções estudadas uma vez que os focos metastáticos apresentavam dimensões reduzidas. Focalizando a metastização pulmonar, a tabela X sistematiza os resultados da marcação por IHQ.

Tabela X- Marcação IHQ da metastização pulmonar considerando RE, RP, ErbB-2 e CK5/6.

	MCF7	HCC1806	p
	n (%)	n (%)	
RE			
Positivo	4 (57,1%)	4 (80%)	0,546
Negativo	3 (42,9%)	1 (20%)	
RP			
Positivo	3 (42,9%)	2 (40%)	0,546
Negativo	4 (57,1%)	3 (60%)	
ErbB-2			
Positivo		1 (20%)	0,125
Negativo	7 (100%)	4 (80%)	
CK5/6			
Positivo		1 (20%)	0,125
Negativo	7 (100%)	4 (80%)	

A figura 22, 23, 24 e 25 representam marcações IHQ de RE, RP, CerbB2 e CK5/6, respectivamente.

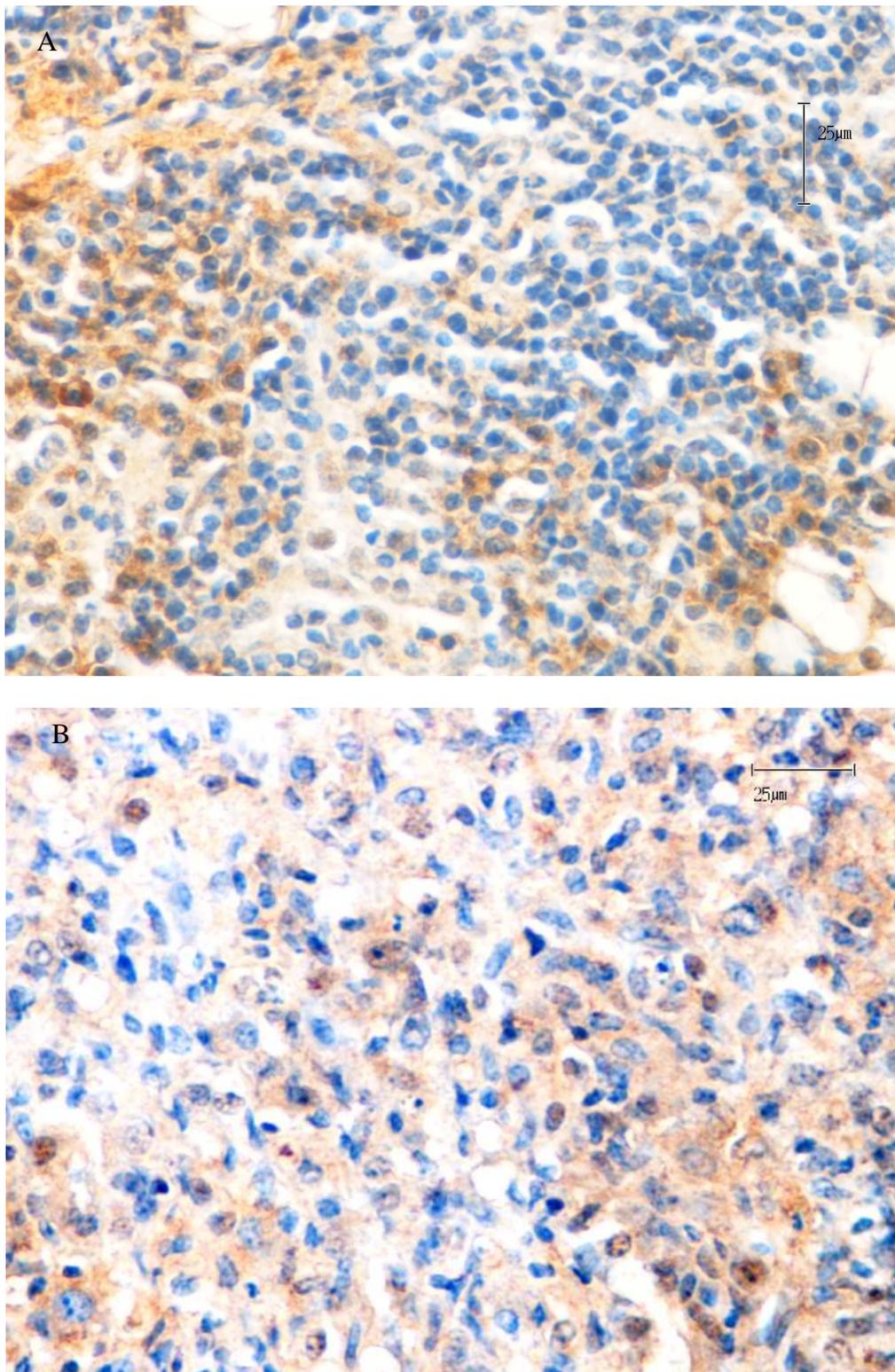


Figura 22 – Marcação IHQ para RE. A – RE positivos, correspondendo a foco metastático do grupo MCF7. B - RE positivos, correspondendo a foco metastático do grupo HCC1806.

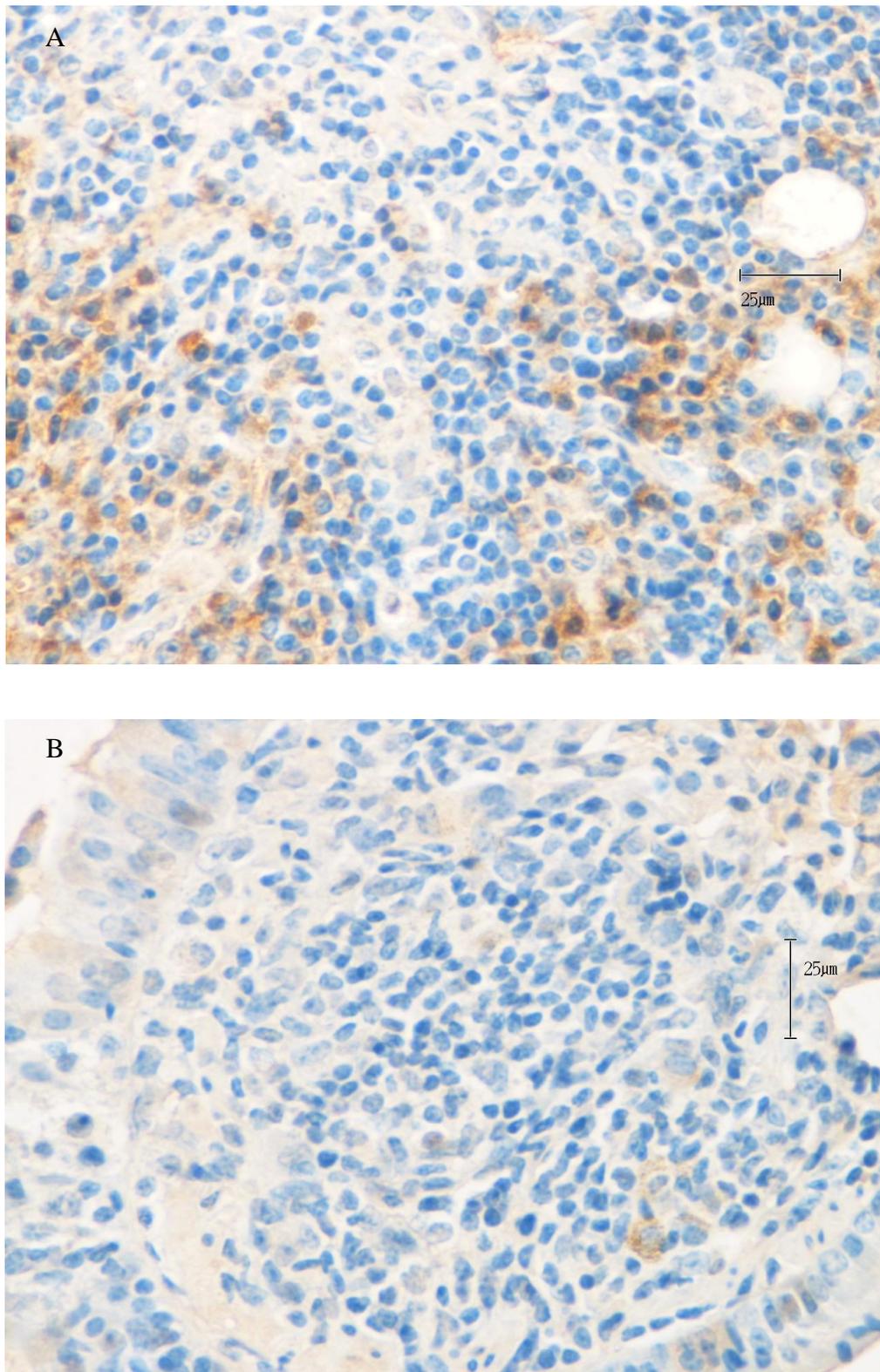


Figura 23 – Marcação IHQ para RP. A – RP positivos, correspondendo a foco metastático do grupo HCC1806. B - RP negativo, correspondendo a foco metastático do grupo MCF7.

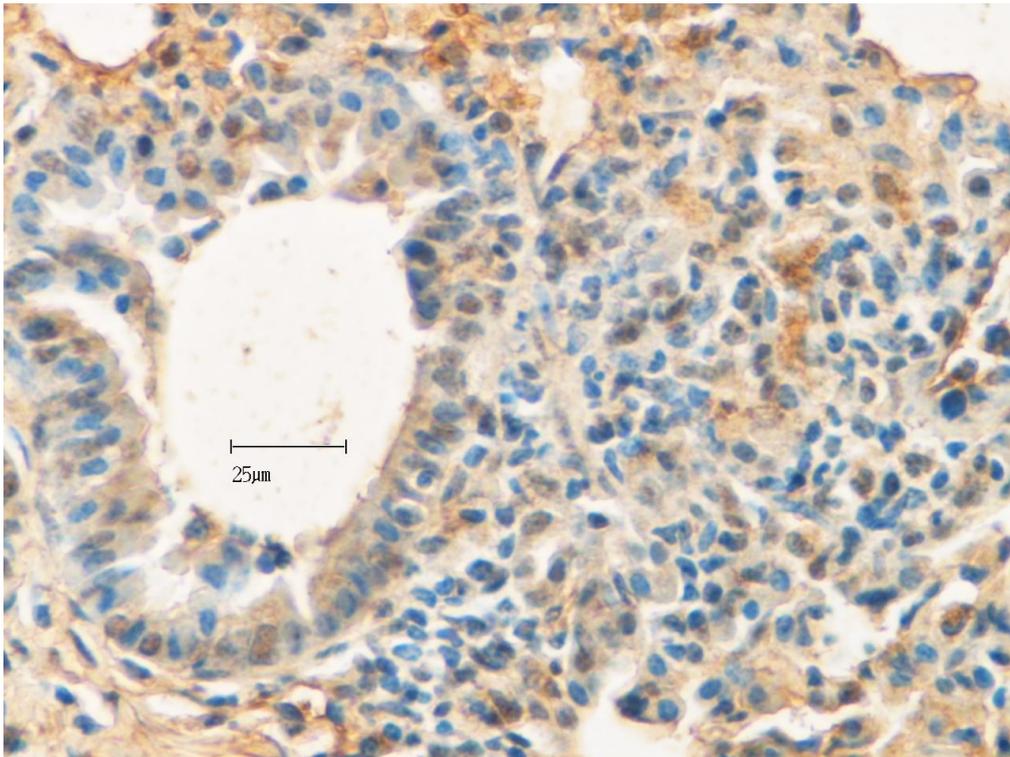


Figura 24 – Marcação IHQ para ErbB-2. A- Foco metastático do grupo MCF7.

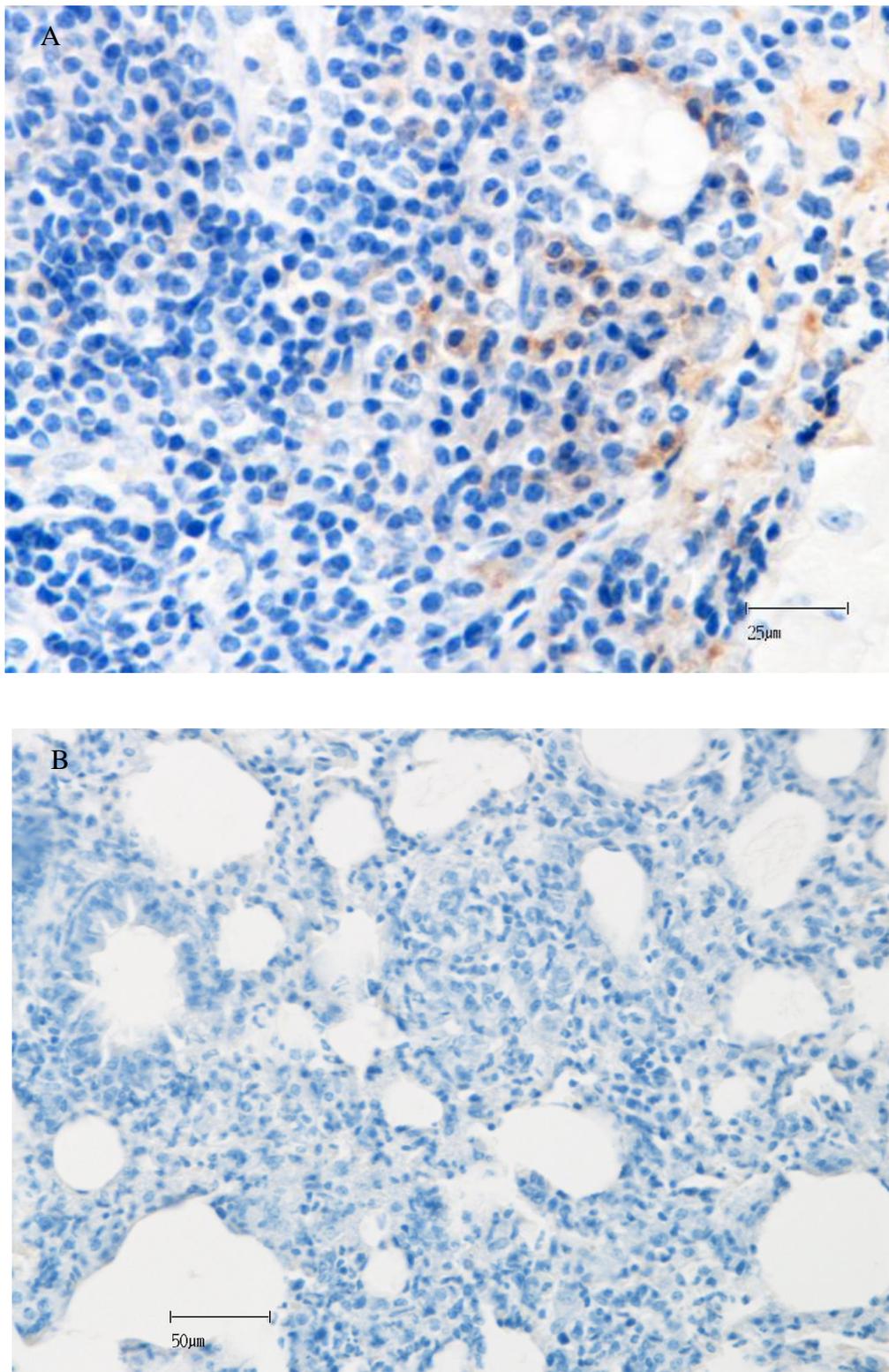


Figura 25 – Marcação IHQ para CK5/6. A- Foco metastático com marcação positiva do grupo HCC1806. B- Foco metastático com marcação negativa do grupo HCC1806.

A taxa de alterações da expressão de RE, RP no grupo HCC1806 é idêntica à que se verifica no grupo MCF7 ($p = 0.546$). A alterações da expressão CerbB2 no grupo das células HCC1806 não é significativamente diferente da verificada no grupo MCF7. Contudo é de referir a existência de um caso com marcação positiva ErbB-2 no grupo HCC1806, que representa 20% de aquisição desta expressão. A avaliação da CK 5/6 também não foi significativamente diferente nos dois grupos, com apenas um caso de franca marcação no grupo HCC1806.

No grupo de ratinhos injectados com MCF7 verificou-se manutenção do fenótipo RE e RP+ e ErbB-2 negativo em 3 casos (42,8%). Por outro lado no grupo com HCC1806, esta manutenção não se verificou globalmente em nenhum dos casos, considerando tratar-se de tumores TN.

A metastização continua a ser a principal causa de morbidade e mortalidade nos doentes com cancro. As estratégias terapêuticas, incluindo cirurgia e as subsequentes terapêuticas sistémicas e/ou radioterapia, têm como objectivo erradicar as células tumorais remanescentes que escapam à exérese cirúrgica ou que já se encontram disseminadas. Apesar de todos estes meios disponíveis, em muitos casos são diagnosticadas recidivas tumorais e metástases. Estes fenómenos obviamente reduzem a sobrevivência dos doentes. Cerca de um terço das doentes com cancro da mama já apresentam doença metastática no momento do diagnóstico²⁰¹.

As células tumorais que se disseminaram, sobreviveram e que permaneceram em fase latente, podem posteriormente recomeçar o seu crescimento. Para o desenvolvimento de metástases é necessário portanto, o crescimento destas células sobreviventes nas localizações secundárias. Este conceito macroscópico difere, no entanto, da presença de um grupo de células disseminadas em circulação, que não origina inevitavelmente proliferação e crescimento em locais distantes do tumor primitivo. Uma vez disseminadas, o crescimento das células tumorais parece ser regulado pelo novo microambiente que as rodeia. No entanto, existem condições determinantes à disseminação, características do tumor de origem²⁰². Este processo evolutivo só é possível mediante a selecção de uma subpopulação de células que completam todos os passos da cascata de metastização. A metastização é um fenómeno pouco efectivo, isto é, apenas uma pequena proporção de células vai progredir com sucesso esta escalada²⁰³.

1. Modelo animal

O estudo experimental do crescimento de células tumorais pode ser conseguido em condições controladas como a cultura celular e os modelos animais. Os modelos animais estão rodeados de uma maior complexidade já que múltiplos factores influenciam os resultados. Nos estudos *in vitro*, as células são sujeitas aos mesmos factores ambientais e alterações genéticas que particularmente se pretendem avaliar. No entanto, para avaliar a interacção entre as células tumorais e o organismo e eventos críticos no processo de metastização, é necessário a criação de modelos *in vivo*.

Existem várias metodologias descritas com o intuito de mimetizar o crescimento e metastização do cancro da mama. Destes métodos destaca-se a formação espontânea de tumores em animais, a transplantação singénica, indução química de tumores, xenotransplantes de tumores humanos em animais imunocomprometidos e modelos com animais transgénicos²⁰⁴. O modelo animal escolhido, juntamente com o tropismo específico de um determinado tipo celular, vai definir o crescimento metastático.

A implantação ortotópica ou ectotópica de células tumorais no tecido celular subcutâneo ou gordura mamária origina a formação de tumor que posteriormente formará metástases. Esta metodologia, em parte, assemelha-se aos múltiplos estádios do desenvolvimento do cancro da mama em humanos²⁰⁵.

A injeção de células tumorais na veia da cauda resulta sobretudo em metastização pulmonar e a injeção intracardíaca resulta numa disseminação para os diferentes órgãos, incluindo o osso. A introdução de células tumorais na circulação é

por alguns considerado um processo de colonização e não um verdadeiro processo de metastização²⁰⁵. No entanto, esta metodologia *in vivo* permite avaliar a disseminação circulatória, de acordo com as características genéticas da célula tumoral injectada. Partindo deste ponto no processo de metastização, será possível correlacionar as implicações nos passos subsequentes como extravasação, sobrevivência no meio extracelular, crescimento da metástase e neovascularização no local secundário. O facto da metastização espontânea à distância a partir dos locais primários ser rara e morosa em modelos animais vem também reforçar este modelo de estudo.

A transplantação de células tumorais pode ser singénica ou xenotransplantada. A transplantação singénica (entre animais da mesma espécie), elimina a reacção imunológica hospedeiro *versus* transplante e permite investigação na vertente do sistema imune inato na progressão tumoral maligna²⁰⁶.

Por outro lado, a xenotransplantação permite avaliar o crescimento e metastização de células tumorais humanas em animais imunocomprometidos²⁰⁷. Também neste caso é possível a injeção celular subcutânea, na veia da cauda, intracardíaca e na gordura mamária²⁰⁸. A implantação de células tumorais humanas no modelo animal é um procedimento simples e permite a manipulação genética e farmacológica das células utilizadas. No entanto destacam-se algumas limitações, como a resposta imune, que desempenha um papel fulcral no desenvolvimento tumoral e cuja influência fica prejudicada com a utilização de animais imunodeprimidos. Por outro lado, os componentes do estroma. Assim como os vasos, não são os do tumor de origem. Ainda se aponta o facto das células tumorais não estarem programadas para crescimento num ambiente murino.

O modelo aplicado neste projecto é utilizado na avaliação diferencial da metastização de duas linhas celulares de cancro da mama, fenotipicamente distintas. Conforme apontado, parte-se de um estudo do processo metastático a partir da presença de células na circulação. As desvantagens apontadas vão estar igualmente presentes em ambos os tipos celulares, concretamente a influência do estroma murino e do sistema imune. Portanto, na avaliação do comportamento metastático das linhas celulares RH positivos e triplas negativas, estes factores estarão igualizados. Assim, este modelo é reprodutível e progride em tempo útil para a investigação.

2. Estudos imagiológicos

Nas imagens obtidas através da administração do ^{99m}Tc -HMDP e ^{99m}Tc -MIBI não se verificaram diferenças significativas relativamente aos animais controlo. Este resultado poderá ser justificado por factores que influenciam a captação dos diferentes radiofármacos por parte dos diferentes órgãos, nomeadamente a eficiência de marcação e as vias de eliminação dos radiotraçadores.

No caso das marcações com tecnécio-99m as principais impurezas radioquímicas são, principalmente, o pertecnetato livre e as formas coloidais resultantes da hidrólise do pertecnetato, que se constituem em complexos de tecnécio reduzido-hidrolizado não ligado. Deste modo, a pureza radioquímica de um complexo de ^{99m}Tc é expressa em percentagem de actividade presente na forma química desejada relativamente à radioactividade total. No caso presente, para o ^{99m}Tc -HMDP verificou-se que, por vezes, a eficiência de marcação mostrava valores percentuais de complexos de tecnécio

reduzido-hidrolizado não ligado da ordem dos 10%, o que se traduzia num moderado aumento de captação no fígado.

Relativamente ao ^{99m}Tc -MIBI, e de acordo com a sua farmacocinética, órgãos como o coração apresentam elevada captação, factor que influenciou o desenho de ROIs no pulmão e posterior interpretação de dados relativamente à captação por parte dos pulmões. Ainda relativamente à farmacocinética deste radiofármaco mas em relação às vias de eliminação o ^{99m}Tc -MIBI é eliminado principalmente por via hepatobiliar e acessoriamente por via urinária. Assim, é possível verificar um aumento da captação em órgãos como fígado e intestino, impedindo a correcta interpretação de dados relativamente ao fígado.

Assim e tendo em conta todos estes factores inerentes à eficiência de marcação e farmacocinética dos radiofármacos o ideal seria ter utilizar outro radiofármaco com diferente farmacocinética, como por exemplo a ^{18}F -Fluordesoxiglicose (^{18}F -FDG). O ^{18}F -FDG entra nas células através dos mesmos mecanismos membranares de transporte da glicose, ou seja, por transportadores de glicose (GLUT) ²¹⁰. Após transposição da membrana celular, ambos (glicose e ^{18}F -FDG) são fosforilados pela hexoquinase (HK). Contudo, ao contrário da glicose-6-fosfato, o ^{18}F -FDG-6-fosfato não é um substrato da isomerase glicose-6-fosfatase e, como tal, não sofre metabolização subsequente²¹⁰. O ^{18}F -FDG-6-fosfato produzido no interior das células tumorais permanece dentro da célula²¹¹. Desta forma factores como os descritos anteriormente não influenciariam a análise de imagens com ^{18}F -FDG.

3. Locais de metastização

O movimento das células tumorais dos tumores sólidos para os locais de metastização pode envolver trajectórias como da mama até ao osso. Certamente neste processo o sistema circulatório sanguíneo terá um papel fulcral, podendo também contribuir o sistema linfático^{211,212}. As metástases têm tendência a desenvolverem-se em localizações específicas²¹¹. A distribuição das células tumorais circulantes pelos diferentes órgãos, a sua sobrevivência e crescimento não pode ser um fenómeno aleatório. As células tumorais têm diâmetros superiores aos capilares, interagindo preferencialmente com a microvascularização²¹³. A entrada das células provenientes do tumor primitivo na circulação sistémica converge no sistema venoso e dirige-se ao coração direito até que atinge directamente a microcirculação pulmonar. No pulmão, a distribuição do fluxo sanguíneo e a embolização celular são relativamente uniformes²¹⁴. Noutro contexto, as células provenientes de órgãos como o cólon, entram directamente no fígado via circulação portal. Na circulação hepática a distribuição também é uniforme. As células de tumores hepáticos apenas têm a possibilidade de se dirigirem para o pulmão. Nos tumores pulmonares as células tumorais migram para o coração esquerdo e convergem na circulação arterial sistémica. A distribuição das células tumorais nestes órgãos vai depender da vascularização dos mesmos. Existe ainda a possibilidade de disseminação linfática. Uma vez passando os gânglios linfáticos, directamente ou após proliferação, as células tumorais podem atingir a circulação venosa. A partir deste ponto verifica-se o já mencionado em relação à disseminação pela circulação venosa.

A necrópsia dos animais revelou metastização pulmonar em todos os casos injectados com células tumorais, metastização hepática em 47%, um caso de metástase óssea e noutro caso uma metástase pélvica. Diversos trabalhos clínicos descreveram as localizações secundárias mais frequentes do cancro da mama. Os estudos apontam uma prevalência de metastização pulmonar em 70%, óssea em 70%, gânglios linfáticos em 67%, fígado 62%, supra-renais em 40%, cérebro 25% e ovário em 20%²¹⁵. Os casos de metastização óssea e de metástases pélvicas que se descrevem foram encontrados em animais injectados com células que expressam RH. Os estudos clínicos preliminares que correlacionam a expressão de RE com a metastização à distância, apontam para maior relevância da metastização óssea, em detrimento da visceral²¹⁶. A metástase pélvica apresentava origem indeterminada, podendo corresponder a um extravasamento de células tumorais nesta região, após a injeção na veia da cauda e que posteriormente cresceu e infiltrou os órgãos adjacentes.

O estudo necrópsico dos ratinhos revelou metastização pulmonar em todos os animais injectados com as células MCF7 e as células HCC1806. Este dado histológico reforça a validade e reprodutibilidade do método utilizado no estudo da metastização pulmonar através da injeção na veia da cauda, conforme já reportado noutros estudos^{211,215,217,218}. Considerando os diferentes lobos pulmonares, não se verificou uma metastização preferencial individualizando cada um deles. Assim, a distribuição circulatória no pulmão parece ser homogénea, reflectindo embolização uniforme das células tumorais²¹⁴. O número médio de focos de metastização foi semelhante. No entanto, a área média (em pixels) dos focos do grupo injectado com MCF7 foi significativamente superior em relação ao grupo injectado com as células triplas negativas ($p=0,023$). O lobo esquerdo, zona média, foi o único local onde se verificou

uma diferença relevante, preferencial para as células que expressam RH. Esta diferença da área de metastização implica a presença de uma metastização pulmonar massiva das células com RH. Assim, provavelmente existem factores envolvidos no crescimento das metástases e neovascularização pulmonar que favorecem o seu crescimento em relação às triplas negativas. É facto que o número de focos detectados em cada lobo foi semelhante, portanto os fenómenos de extravasação e manutenção no meio extracelular serão garantidos por mecanismos moleculares que actuam de igual forma. No entanto, as vias reguladoras do crescimento das metástases e a necessária vascularização de suporte estarão particularmente sobrerregulados para as células com RH. Do ponto de vista clínico, conforme descrito anteriormente, os tumores triplos negativos apresentam maior agressividade clínica^{117,118}. Os resultados da metastização pulmonar levantam uma maior relevância nas células com RH. Esta descrição poderá ser justificada por interacções entre células tumorais, estroma de suporte e matriz extracelular pulmonar, que favorecem o crescimento metastático mediante a presença de RH. Neste sentido, a expressão e função de moléculas de adesão como membros da família das integrinas, caderinas e MMP poderão desempenhar uma função crítica^{219,220}. Algumas moléculas foram propostas para o tropismo específico das metástases. A compatibilidade de moléculas de adesão entre célula tumoral e tecido hospedeiro e a presença de factores de crescimento nos locais de metastização foram implicados em mecanismos moleculares que estabelecem a metastização à distância²²¹. O receptor de citocinas CXCR4 parece ser importante na metastização pulmonar específica do cancro da mama. A existência do ligando específico CXCL12 permite a activação da via sinalizadora^{222,223}. Também já foi apontada a influência dos RE e RP na expressão de factores de crescimento, concretamente TGF- α , IGF-2 e IGF-1^{224,225}. Provavelmente existirão também vias

reguladoras da angiogénese que correlacionam a expressão de RE e RP. Neste contexto, surge com particular interesse o contributo do VEGF e do FGF. Particularizando o microambiente pulmonar, parece provável que o HIF-1, que activa o VEGF, possa ter particular relevância. Cerca de 40% dos tumores da mama apresentam áreas de hipóxia ($pO_2 < 2,5 \text{ mmHg}$)^{226,227}. A hipóxia intracelular parece correlacionar-se com o elevado grau de diferenciação citonuclear, elevado índice de proliferação e maiores dimensões tumorais²²⁶. A exposição das células tumorais à hipóxia activa genes que estão associados a aumento da transcrição de HIF-1 e HIF-2²²⁸. Os mecanismos de diminuição da pressão de oxigénio pulmonar secundários ao crescimento metastático poderão estar implicados na metastização massiva das células com RE. No entanto estes fenómenos moleculares ainda não foram correlacionados com a expressão de RH.

A metastização hepática foi superior (69% vs. 29%) no grupo injectado com HCC1806, sendo o número de focos metastáticos significativamente superior em relação ao grupo MCF7 ($p=0,006$). Estes resultados favorecem uma disseminação circulatória relevante das células TN, que resistem na circulação sistémica e metastizam de forma uniforme no parênquima hepático. Esta via hematogénica já foi descrita como preferencial pelas células *basal-like*, que têm fenótipo parcialmente sobreponível às TN^{229,230}.

A sobrevivência da célula na circulação depende em primeira instância da resistência à destruição mecânica. Considerando a circulação arterial, é lógico apontar diferenças substanciais na velocidade sanguínea desde a camada mais próxima da parede até à zona média, reflectindo diferentes tensões de corte sobre a superfície celular. Quando as células aderem à parede dos vasos de pequeno calibre, o lúmen é diminuto e a superfície celular é sujeita a deformação. Este fenómeno tem então

particular relevância na microcirculação. As células que encravam por restrição do calibre vascular sofrem lesão da membrana e podendo ocorrer destruição celular²³¹. Ou, por outro lado, esta deformação celular permite a sua passagem através da parede vascular²³². A tensão de corte da membrana celular devido à deformação nos vasos de menor calibre é maior quando a pressão circulatória é maior. Esta pressão de perfusão (ou pressão motora) é particularmente diferente entre órgãos como o fígado e o pulmão. A pressão arterial sistémica é cerca de 100 mmHg. No entanto no fígado e pulmão, dois órgãos preferenciais de metastização, esse valor desce até 40 e 10 mmHg, respectivamente, logo ocorre menor deformação celular. Por outro lado as conexões intervasculares destes órgãos permitem manter esta pressão baixa e o consequente alojamento celular. Nos vasos da parede intestinal, na pele ou redes capilares exuberantes, a passagem das células tumorais processa-se facilmente, com escassos fenómenos de deformação. Alguns estudos pulmonares e hepáticos demonstraram viabilidade celular significativa várias horas após a administração na circulação²¹¹. Assim, as células tumorais podem permanecer no espaço intravascular pulmonar, apesar do stress hemodinâmico e retornar à circulação sistémica. Esta explicação justifica o processo de metastização extra pulmonar verificado neste estudo *in vivo*.

4. Análise imunohistoquímica

A problemática das células tumorais seleccionadas na recorrência locorregional e metastização à distância está ainda por delinear. Na metastização permanece por esclarecer se o fenótipo do tumor primitivo apresenta uma derivação característica da sua história natural ou se é uma consequência directa da terapêutica instituída.

Concretamente, em relação aos RE, têm sido descritos resultados discordantes da expressão metastática, patenteados pela ausência de resposta à hormonoterapia adjuvante²³³. A expressão de RE nos focos metastáticos pulmonares no grupo de ratinhos injectados com MCF7 revelou manutenção desta expressão em relação ao fenótipo das células injectadas em 57,1% dos casos. Considerando os estudos clínicos publicados, a manutenção de uma expressão positiva de RE na recorrência locorregional e metastização à distância pode ascender aos 97%²³⁴. A ausência de expressão de RE parece manter-se unanimemente na metastização^{233,234}. No entanto, os casos publicados representam estudos retrospectivos e com casuísticas pouco abrangentes. Por outro lado salienta-se ainda a divergência de critérios e técnicas de caracterização dos receptores utilizadas ao longo dos tempos que impossibilitam a uniformização da interpretação dos dados. Também foram descritas variantes de RE- α ²³⁵. Alguns receptores não serão detectados na presença de domínios de ligação livres. Por outro lado a detecção de RE não implica necessariamente a presença de uma proteína funcional. O epítipo específico de ligação do anticorpo na técnica IHQ utilizada pode estar bloqueado, o que se traduz por uma marcação negativa apesar da presença de um RE funcional.

Os dados deste estudo experimental podem levar a uma reflexão com vista à análise sistemática dos RE na metastização, uma vez que até ao momento ainda são o fenótipo que traduz a melhor resposta à hormonoterapia. Além deste dado, não é irrelevante considerar o tempo de metastização. Os casos de metastização tardia parecem correlacionar-se com RE+. Por outro lado, a metastização RE negativa com antecedentes de cancro da mama RE+ deverá ser considerado um tipo biologicamente distinto, inclusivamente considerando a terapêutica a instituir.

A perda da expressão de receptores de progesterona atingiu os 57% no grupo injectado com células RH positivos. Nas células triplas negativas, o processo de metastização veio a revelar tumores secundários com expressão de RP em dois casos entre os cinco avaliados. A perda de RP foi reportada mais frequentemente que de RE, tendo sido descrita ausência de RP em 40% dos focos metastáticos⁶³. Este dado parece coadunar-se com uma menor resposta à hormonoterapia adjuvante, conferindo um aspecto promotor da metastização.

Os RP interagem com proteínas quinases funcionais que promovem a vias dependentes da fosforilação que culminam na alteração da progressão do ciclo celular. As acções citoplasmática e genómica dos RP estão integradas de forma a permitir fenómenos convergentes do metabolismo da célula tumoral⁶⁵. O papel dos RP, ou da sua ausência, no metabolismo das células tumorais está ainda por delinear em diversas vertentes. No contexto clínico a expressão de RP na metastização poderá ter aspectos mais divergentes que a dos RE, com implicações prognósticas relevantes.

A terapêutica dirigida anti-HER2 é uma realidade. No entanto, a concordância e estabilidade entre o tumor primitivo e a metástase não é linear. O *status* HerbB-2 pode ser distinto ao longo do curso da doença. Para acrescentar dispersão a este contexto, existe a hipótese da quimioterapia (adjuvante ou neoadjuvante) poder modificar esta sobreexpressão.

Todos os tipos celulares injectados neste estudo experimental não apresentavam originalmente sobreexpressão HerbB-2. O estudo da expressão metastática veio a revelar manutenção da negatividade de marcação em todos os casos do grupo injectado

com MCF7 e positividade num dos casos do grupo injectado com HCC1806. Estes dados apontam para a aquisição da expressão HerB-2 no processo de metastização por uma parte dos tumores originalmente triplos negativos no processo de metastização. Este dado poderá ser particularmente relevante no contexto de doença metastática, acrescentando o leque de terapêuticas dirigidas a oferecer a estas doentes.

Alguns trabalhos têm demonstrado manutenção da expressão HerB-2 entre a metástase e o tumor primitivo^{236,237}. Por outro lado, outros estudos revelaram discordâncias em cerca de 20%^{238,239}. A alteração da expressão HerB-2 pode ser justificada pela selecção de um clone HerB-2 durante o processo de progressão tumoral ou pela presença de heterogeneidade intratumoral HerB-2, com maior potencial metastático.

Dado que o fenótipo original das células tumorais injectadas é uniforme, provavelmente a primeira hipótese parece mais plausível. Assim, existirá um clone HerB-2+ que se torna relevante no processo de metastização.

O fenótipo BL foi proposto pela semelhança com as células mioepiteliais deste tipo de tumores. Apesar da semelhança entre TN e BL, reconhece-se a heterogeneidade dos TN. A marcação com CK 5/6 tem sido um método aplicado à catalogação dos tumores BL^{240,241}. Neste trabalho pretendeu-se avaliar a expressão destas CK de modo a isolar um grupo particular no contexto dos tumores TN, com comportamento biológico mais agressivo e poucas alternativas terapêuticas. Esta marcação foi positiva na metástase num caso do grupo de células originalmente TN. Este dado pode ser enquadrado numa dicotomia. Por um lado considera-se a preponderância do fenótipo BL apenas numa parte de metástases de células originalmente TN. Por outro lado, a

aplicação desta CK pode ser reducionista na avaliação do fenótipo. Alguns trabalhos têm apontado para uma especificidade de 80% da CK5/6 para o fenótipo BL^{240,242,243}. Estudos recentes têm aplicado um painel alternativo e mais alargado de marcadores mioepiteliais^{243,244}. Assim, a presença de marcadores BL foi reportada em 71% dos tumores TN²⁴⁴. No entanto, estes dados são referentes a estudos com carcinomas primitivos da mama. O comportamento metastático não tem alvo de expressão delineado. Portanto, dada a especificidade da CK5/6, pode-se apontar para um fenótipo BL na metástase discordante em relação ao tumor primitivo, contabilizando cerca de 30%. Nesta fase será interessante a avaliação na metástase do fenótipo BL ou outra expressão com implicações terapêuticas, dadas as alternativas disponíveis de momento na progressão tumoral.

Neste estudo experimental utilizou-se um modelo *in vivo* de disseminação circulatória que parece fiável e reprodutível na avaliação da metastização sistémica das células tumorais da mama que expressam RH e triplas negativas.

O estudo de marcação celular com ^{99m}Tc -HMPAO durante a injeção na veia da cauda dos ratinhos fêmea *Balb/c nu nu* revelou um padrão de embolização pulmonar em ambas as linhas celulares nas primeiras duas horas.

De acordo com o estudo imagiológico que se realizou, não se verificaram diferenças estatisticamente significativas quer nas imagens adquiridas com ^{99m}Tc -HMDP quer nas adquiridas com ^{99m}Tc -MIBI às 7-8 semanas após injeção celular. A captação dos radiofármacos por parte dos diferentes órgãos, a eficiência de marcação e as vias de eliminação podem justificar estes resultados.

Em todos os animais constatou-se metastização pulmonar. No entanto, as áreas de metastização pulmonar dos animais injectados com células que expressam RH foram significativamente maiores comparando com as células TN. Provavelmente poderá existir uma influência dos RH na expressão de factores de crescimento e neovascularização pulmonares ainda não delineados.

A metastização hepática, diagnosticada em 47% dos casos, foi superior no grupo injectado com células TN. Este resultado reforça a resistência deste tipo celular na circulação, que escapa à microcirculação pulmonar o que permite a metastização para o fígado.

A regressão logística mostrou que o número de focos, a área e a soma das áreas por lobo pulmonar não são preditivos da metastização hepática. O modelo de previsão

aponta para um menor risco de metastização hepática com células RH positivas e maior risco com células TN.

Os RE mantêm a sua marcação em 57,1% nos casos de células originalmente RH positivas. Os receptores de progesterona perdem marcação em 57% destes tumores. A sobreexpressão CerbB2 veio a revelar-se na metastização em apenas um caso correspondente a células TN. A mudança do fenótipo em relação às células injectadas não foi significativamente diferente nos dois grupos analisados. A manutenção global do fenótipo RH positivo verificou-se em 42,8%. Considerando as células triplas negativas, os marcadores apresentaram mudanças particulares em todos os casos.

Esta análise IHQ experimental levanta a discussão cerca do comportamento na metastização do cancro da mama humano. A catalogação fenotípica das lesões secundárias translaciona-se clinicamente numa melhor adequação terapêutica dirigida. Os estudos clínicos poderão infirmar ou não a consistência destes dados e a justificação de outros procedimentos de diagnóstico complementares na metastização.

CAPÍTULO VII |
BIBLIOGRAFIA |

1. Boyle P, Ferlay J (2005) Cancer incidence and mortality in Europe, 2004. *Ann Oncol* 16(3):481-8.
2. Weir HK, Thun MJ, Hankey BF, Ries LA, Howe HL, Wingo PA, Jemal A, Ward E, Anderson RN, Edwards BK. (2003) Annual report to the nation on the status of cancer, 1975-2000, featuring the uses of surveillance data for cancer prevention and control. *J Natl Cancer Inst* 95(17):1276-99.
3. Bastos J, Barros H, Lunet N (2007) Breast cancer mortality trend in Portugal (1955-2002). *Acta Med Port* 20(2):139-44.
4. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, Thun MJ. (2008) Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 58(2):71-96.
5. Jemal A, Ward E, Thun MJ. (2007) Recent trends in breast cancer incidence rates by age and tumor characteristics among U.S. women. *Breast Cancer Res* 9:R28.
6. Ravdin PM, Cronin KA, Howlader N, *et al.* (2007) The decrease in breast-cancer incidence in 2003 in the United States. *N Engl J Med* 356:1670-74.
7. Boyle P, d'Onofrio A, Maisonneuve P *et al.* (2003) Measuring progress against cancer in Europe: has the 15% decline targeted for 2000 come about? *Ann Oncol* 14:1312-25.
8. Seow A, Duffy SW, McGee MA, Lee J, Lee HP.(1996) Breast cancer in Singapore: trends in incidence 1968-1992. *Int J Epidemiol* 25(1):40-5.
9. Nagata C, Kawakami N, Shimizu H. (1997) Trends in the incidence rate and risk factors for breast cancer in Japan. *Breast Cancer Res Treat* 44(1):75-82.
10. Registo Oncológico Regional - Zona Centro, 2006.
11. Ries L, Einar M Kosary C, *et al.* (2003) SEER cancer statistics review, 1975-2000. Bethesda, MD: National Cancer Institute.
12. Colditz GA. (2005) Estrogen, estrogen plus progestin therapy, and risk of breast cancer. *Clin Cancer Res* 15;11(2):909-17.
13. Kelsey JL, Gammon MD, John EM.(1993) Reproductive factors and breast cancer. *Epidemiol Rev* 15(1):36-47.
14. Garland M, Hunter DJ, Colditz GA, Manson JE, Stampfer MJ, Spiegelman D, Speizer F, Willett WC. (1998) Menstrual cycle characteristics and history of ovulatory infertility in relation to breast cancer risk in a large cohort of US women. *Am J Epidemiol* 147(7):636-43.

15. Lyons TR, Schedin PJ, Borges VF. (2009) Pregnancy and breast cancer: when they collide. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 14(2):87-98.
16. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer (1996) Breast cancer and hormonal contraceptives: collaborative reanalysis of individual data on 53 297 women with breast cancer and 100 239 women without breast cancer from 54 epidemiological studies. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. *Lancet* 22;347(9017):1713-27.
17. Malone KE, Daling JR, Weiss NS. (1993) Oral contraceptives in relation to breast cancer. *Epidemiol Rev* 15(1):80-97.
18. Marchbanks PA, McDonald JA, Wilson HG, Folger SG, Mandel MG, Daling JR, Bernstein L, Malone KE, Ursin G, Strom BL, Norman SA, Wingo PA, Burkman RT, Berlin JA, Simon MS, Spirtas R, Weiss LK. (2002) Oral contraceptives and the risk of breast cancer. *N Engl J Med* 27;346(26):2025-32.
19. Breast cancer and hormone replacement therapy: collaborative reanalysis of data from 51 epidemiological studies of 52,705 women with breast cancer and 108,411 women without breast cancer. Collaborative Group on Hormonal Factors in Breast Cancer. (1997) *Lancet* 11;350(9084):1047-59.
20. Rossouw JE, Anderson GL, Prentice RL, LaCroix AZ, Kooperberg C, Stefanick ML, Jackson RD, Beresford SA, Howard BV, Johnson KC, Kotchen JM, Ockene J; Writing Group for the Women's Health Initiative Investigators. (2002) Risks and benefits of estrogen plus progestin in healthy postmenopausal women: principal results From the Women's Health Initiative randomized controlled trial. *JAMA* 17;288(3):321-33.
21. Schairer C, Lubin J, Troisi R, Sturgeon S, Brinton L, Hoover R. (2000) Menopausal estrogen and estrogen-progestin replacement therapy and breast cancer risk. *JAMA* 26;283(4):485-91.
22. Pathology and genetics, tumor of the breast and female genital organs. WHO Classification of Tumors, 2003.
23. Lampejo OT, Barnes DM, Smith P, Millis RR. (1994) Evaluation of infiltrating ductal carcinomas with a DCIS component: correlation of the histologic type of the in situ component with grade of the infiltrating component. *Semin Diagn Pathol* 11(3):215-22.
24. Gupta SK, Douglas-Jones AG, Fenn N, Morgan JM, Mansel RE. (1997) The clinical behavior of breast carcinoma is probably determined at the preinvasive stage (ductal carcinoma in situ). *Cancer* 1;80(9):1740-5.

25. Harris JM, Lippman ME, Marrow M Osborne CK, (2004) Diseases of the Breast Philadelphia, Williams&Wilkins 541-584.
26. Sastre-Garau X, Jouve M, Asselain B, Vincent-Salomon A, Beuzeboc P, Dorval T, Durand JC, Fourquet A, Pouillart P. (1996) Infiltrating lobular carcinoma of the breast. Clinicopathologic analysis of 975 cases with reference to data on conservative therapy and metastatic patterns. *Cancer* 1;77(1):113-20.
27. Eusebi V, Magalhaes F, Azzopardi JG.(1992) Pleomorphic lobular carcinoma of the breast: an aggressive tumor showing apocrine differentiation. *Hum Pathol* 23(6):655-62.
28. Horn PL, Thompson WD. (1988) Risk of contralateral breast cancer. Associations with histologic, clinical, and therapeutic factors. *Cancer* 15;62(2):412-24.
29. Mate TP, Carter D, Fischer DB, Hartman PV, McKhann C, Merino M, Prosnitz LR, Weissberg JB. (1986) A clinical and histopathologic analysis of the results of conservation surgery and radiation therapy in stage I and II breast carcinoma. *Cancer* 1;58(9):1995-2002.
30. Rydén L, Chebil G, Sjöström L, Pawlowski R, Jönsson P-E. (2007) Determination of sentinel lymph node (SLN) status in primary breast cancer by prospective use of immunohistochemistry increases the rate of micrometastases and isolated tumour cells: Analysis of 174 patients after SLN biopsy. *Eur J Surg Oncol* 33:33-8.
31. Lyman GH, Giuliano AE, Somerfield MR, Benson AB 3rd, Bodurka DC, Burstein HJ, *et al.* (2005) American Society of Clinical Oncology guidelines recommendations for sentinel lymph node biopsy in early-stage breast Cancer. *J Clin Oncol* 23:7703-20
32. Recht A, Houlihan MJ. (1995) Axillary lymph nodes and breast cancer: a review. *Cancer*76:1491-1512.
33. Moore MP, Kinne DW. (1997) Axillary lymphadenectomy: a diagnostic and therapeutic procedure. *J Surg Oncol* 66:2-6.
34. Cserni G, Bianchi S, Vezzosi V, Arisio R, Bori R, Peterse J, *et al.* (2007) Sentinel Lymph Node Biopsy in Staging Small (up to 15 mm) Breast Carcinomas. Results from a European Multi-institutional Study. *Pathol Oncol Res* 13:5-14.

35. Krauth J-S, Charitansky H, Isaac S, Bobin J-Y. (2006) Clinical implications of axillary sentinel lymph node 'micrometastases' in breast cancer. *Eur J Surg Oncol* 32:400-4.
36. Singletary SE, Allred C, Ashley P, Bassett L, Berry D, Bland K, *et al.* (2002) Revision of the American Joint Committee on Cancer Staging System for Breast Cancer. *J Clin Oncol* 20:3628-36.
37. Carter CL, Allen C, Henson DE. (1989) Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. *Cancer* 63(1):181-7.
38. Abner AL, Collins L, Peiro G, Recht A, Come S, Shulman LN, Silver B, Nixon A, Harris JR, Schnitt SJ, Connolly JL. (1998) Correlation of tumor size and axillary lymph node involvement with prognosis in patients with T1 breast carcinoma. *Cancer* 83(12):2502-8.
39. Rosen PP, Groshen S, Kinne DW, Norton L. (1993) Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. *J Clin Oncol* 11(11):2090-100.
40. Newcomer LM, Newcomb PA, Trentham-Dietz A, Storer BE, Yasui Y, Daling JR, Potter JD. (2002) Detection method and breast carcinoma histology. *Cancer* 1;95(3):470-7.
41. Green I, McCormick B, Cranor M, Rosen PP.(1997) A comparative study of pure tubular and tubulolobular carcinoma of the breast. *Am J Surg Pathol* 21(6):653-7.
42. Roberti NE. (1997) The role of histologic grading in the prognosis of patients with carcinoma of the breast: is this a neglected opportunity? *Cancer* 1;80(9):1708-16.
43. Nixon AJ, Schnitt SJ, Gelman R, Gage I, Bornstein B, Hetelekidis S, Recht A, Silver B, Harris JR, Connolly JL. (1996) Relationship of tumor grade to other pathologic features and to treatment outcome of patients with early stage breast carcinoma treated with breast-conserving therapy. *Cancer* 1;78(7):1426-31.
44. Pinder SE, Murray S, Ellis IO, Trihia H, Elston CW, Gelber RD, Goldhirsch A, Lindtner J, Cortés-Funes H, Simoncini E, Byrne MJ, Golouh R, Rudenstam CM, Castiglione-Gertsch M, Gusterson BA.(1998) The importance of the histologic grade of invasive breast carcinoma and response to chemotherapy. *Cancer* 15;83(8):1529-39.

45. Lauria R, Perrone F, Carlomagno C, De Laurentiis M, Morabito A, Gallo C, Varriale E, Pettinato G, Panico L, Petrella G, *et al.* (1995) The prognostic value of lymphatic and blood vessel invasion in operable breast cancer. *Cancer* 15;76(10):1772-8.
46. Wilkinson HA, Dahllund J, Liu H, Yudkovitz J, Cai SJ, Nilsson S, Schaeffer JM, Mitra SW. (2002) Identification and characterization of a functionally distinct form of human estrogen receptor beta. *Endocrinology* 143(4):1558-61.
47. Pettersson K, Grandien K, Kuiper GG, Gustafsson JA. (1997) Mouse estrogen receptor beta forms estrogen response element-binding heterodimers with estrogen receptor alpha. *Mol Endocrinol* 11(10):1486-96.
48. Kuiper GG, Carlsson B, Grandien K, Enmark E, Häggblad J, Nilsson S, Gustafsson JA. (1997) Comparison of the ligand binding specificity and transcript tissue distribution of estrogen receptors alpha and beta. *Endocrinology* 138(3):863-70.
49. Vladusic EA, Hornby AE, Guerra-Vladusic FK, Lupu R. (1998) Expression of estrogen receptor beta messenger RNA variant in breast cancer. *Cancer Res* 58(2):210-4.
50. Hill SM, Fuqua SA, Chamness GC, Greene GL, McGuire WL. (1989) Estrogen receptor expression in human breast cancer associated with an estrogen receptor gene restriction fragment length polymorphism. *Cancer Res* 49(1):145-8.
51. Yaich L, Dupont WD, Cavener DR, Parl FF. (1992) Analysis of the PvuII restriction fragment-length polymorphism and exon structure of the estrogen receptor gene in breast cancer and peripheral blood. *Cancer Res* 52(1):77-83.
52. Schuur ER, Weigel RJ. (2000) Monoallelic amplification of estrogen receptor-alpha expression in breast cancer. *Cancer Res* 60(10):2598-601.
53. Ottaviano YL, Issa JP, Parl FF, Smith HS, Baylin SB, Davidson NE. (1994) Methylation of the estrogen receptor gene CpG island marks loss of estrogen receptor expression in human breast cancer cells. *Cancer Res* 54(10):2552-5.
54. Yoshida T, Eguchi H, Nakachi K, Tanimoto K, Higashi Y, Suemasu K, Iino Y, Morishita Y, Hayashi S. (2000) Distinct mechanisms of loss of estrogen receptor alpha gene expression in human breast cancer: methylation of the gene and alteration of trans-acting factors. *Carcinogenesis* 21(12):2193-201.

55. Nicholson RI, McClelland RA, Robertson JF, Gee JM. (1999) Involvement of steroid hormone and growth factor cross-talk in endocrine response in breast cancer. *Endocr Relat Cancer* 6(3):373-87.
56. Sabnis GJ, Jelovac D, Long B, Brodie A. (2005) The role of growth factor receptor pathways in human breast cancer cells adapted to long-term estrogen deprivation. *Cancer Res* 65(9):3903-10.
57. Bezwoda WR, Esser JD, Dansey R, Kessel I, Lange M. (1991) The value of estrogen and progesterone receptor determinations in advanced breast cancer. Estrogen receptor level but not progesterone receptor level correlates with response to tamoxifen. *Cancer* 68(4):867-72.
58. Elledge RM, Green S, Pugh R, Allred DC, Clark GM, Hill J, Ravdin P, Martino S, Osborne CK. (2000) Estrogen receptor (ER) and progesterone receptor (PgR), by ligand-binding assay compared with ER, PgR and pS2, by immuno-histochemistry in predicting response to tamoxifen in metastatic breast cancer: a Southwest Oncology Group Study. *Int J Cancer* 89(2):111-7.
59. Rastelli F, Crispino S. (2008) Factors predictive of response to hormone therapy in breast cancer. *Tumori* 94(3):370-83.
60. Buzdar A, Jonat W, Howell A, Jones SE, Blomqvist C, Vogel CL, Eiermann W, Wolter JM, Azab M, Webster A, Plourde PV. (1996) Anastrozole, a potent and selective aromatase inhibitor, versus megestrol acetate in postmenopausal women with advanced breast cancer: results of overview analysis of two phase III trials. Arimidex Study Group. *J Clin Oncol* 14(7):2000-11.
61. Kuukasjärvi T, Kononen J, Helin H, Holli K, Isola J. ((1996) Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol* 14(9):2584-9.
62. Ravdin PM, Green S, Dorr TM, McGuire WL, Fabian C, Pugh RP, Carter RD, Rivkin SE, Borst JR, Belt RJ, *et al.* (1992) Prognostic significance of progesterone receptor levels in estrogen receptor-positive patients with metastatic breast cancer treated with tamoxifen: results of a prospective Southwest Oncology Group study. *J Clin Oncol* 10(8):1284-91.
63. Fernö M, Stål O, Baldetorp B, Hatschek T, Källström AC, Malmström P, Nordenskjöld B, Rydén S. (2000) Results of two or five years of adjuvant tamoxifen correlated to steroid receptor and S-phase levels. South Sweden Breast Cancer Group, and South-East Sweden Breast Cancer Group. *Breast Cancer Res Treat* 59(1):69-76.

64. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group. (2001) Tamoxifen for early breast cancer. *Cochrane Database Syst Rev* (1):CD000486
65. Dressing G, Hagan C, Knutson T, Daniel A and Lange C. (2009) Progesterone receptors act as sensors for mitogenic protein kinases in breast cancer models. *Endocrine-Related Cancer* 16:351-61
66. Condon JC, Hardy DB, Kovaric K & Mendelson CR (2006) Up-regulation of the progesterone receptor (PR)-C isoform in laboring myometrium by activation of nuclear factor-kappaB may contribute to the onset of labor through inhibition of PR function. *Molecular Endocrinology* 20:764–75.
67. Shen T, Horwitz KB & Lange CA (2001) Transcriptional hyperactivity of human progesterone receptors is coupled to their ligand-dependent down-regulation by mitogen-activated protein kinase-dependent phosphorylation of serine 294. *Molecular and Cellular Biology* 21:6122–31.
68. Weigel NL (1996) Steroid hormone receptors and their regulation by phosphorylation. *Biochemical Journal* 319:657–67.
69. Wiebe J (2006) Progesterone metabolites in breast cancer. *Endocrine-Related Cancer* 13:717–38
70. Ellis MJ, Coop A, Singh B, Mauriac L, Llombert-Cussac A, Jänicke F, Miller WR, Evans DB, Dugan M, Brady C, Quebe-Fehling E, Borgs M. (2001) Letrozole is more effective neoadjuvant endocrine therapy than tamoxifen for ErbB-1- and/or ErbB-2-positive, estrogen receptor-positive primary breast cancer: evidence from a phase III randomized trial. *J Clin Oncol* 19(18):3808-16.
71. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM, Osborne CK, Clark GM. (2003) Progesterone receptor status significantly improves outcome prediction over estrogen receptor status alone for adjuvant endocrine therapy in two large breast cancer databases. *J Clin Oncol* 21(10):1973-9.
72. Calogero RA, Musiani P, Forni G, Cavallo F (2004) Towards a long-lasting immune prevention of HER2 mammary carcinomas: directions from transgenic mice. *Cell Cycle* 3:704-6.
73. Fornier M, Munster P, Seidman AD (1999) Update on the management of advanced breast cancer. *Oncology* 13:647-58.
74. Hicks D and Kulkarni S (2008) HER2+ Breast Cancer Review of Biologic Relevance and Optimal Use of Diagnostic Tools. *Am J Clin Pathol* 129:263-73

75. Yarden Y. (2001) Biology of HER2 and its importance in breast cancer. *Oncology* 61(suppl 2):1-13.
76. Pegram MD, Konecny G, Slamon DJ. The molecular and cellular biology of HER2/neu gene amplification/overexpression and the clinical development of Herceptin (trastuzumab) therapy for breast cancer. *Cancer Treat Res* 103:57-75.
77. Kurokawa H, Lenferink AE, Simpson JF, Pisacane PI, Sliwkowski MX, Forbes JT, Arteaga CL.(2000) Inhibition of HER2/neu (erbB-2) and mitogen-activated protein kinases enhances tamoxifen action against HER2-overexpressing, tamoxifen-resistant breast cancer cells. *Cancer Res* 60(20):5887-94.
78. Normanno N, Bianco C, Strizzi L, Mancino M, Maiello MR, De Luca A, Caponigro F & Salomon DS (2005) The ErbB receptors and their ligands in cancer: an overview. *Current Drug Targets* 6:243–57.
79. Olayioye MA, Neve RM, Lane HA & Hynes NE (2000) The ErbB signaling network: receptor heterodimerization in development and cancer. *EMBO Journal* 19: 3159–67.
80. Ross JS, Fletcher JA, Bloom KJ, *et al.* (2003) HER-2/neu testing in breast cancer. *Am J Clin Pathol* 120(suppl 1):S53-S71.
81. Traina A, Agostara B, Marasa L, *et al.* (2006) HER2/neu expression in relation to clinicopathologic features of breast cancer patients. *Ann N Y Acad Sci* 1089:159-67.
82. Ariga R, Zarif A, Korasick J, *et al.* (2005) Correlation of HER-2/neu gene amplification with other prognostic and predictive factors in female breast carcinoma. *Breast J* 11:278-80.
83. Gong Y, Booser DJ, Sneige N. (2005) Comparison of HER-2 status determined by fluorescence in situ hybridization in primary and metastatic breast carcinoma. *Cancer* 103(9):1763-9.
84. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, *et al.* (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl JMed* 344:783-92.
85. Osoba D, Slamon DJ, Burchmore M, *et al.* (2002) Effects on quality of life of combined trastuzumab and chemotherapy in women with metastatic breast cancer. *J Clin Oncol* 20:3106-113.

86. Romond EH, Perez EA, Bryant J, *et al.* (2005) Trastuzumab plus adjuvant chemotherapy for operable HER2-positive breast cancer. *N Engl J Med* 353:1673-84.
87. Smith I, Procter M, Gelber RD, *et al.* (2007) 2-year follow-up of trastuzumab after adjuvant chemotherapy in HER2-positive breast cancer: a randomised controlled trial. *Lancet* 369:29-36.
88. Rusnak DW, Affleck K, Cockerill SG, Stubberfield C, Harris R, Page M, Smith KJ, Guntrip SB, Carter MC, Shaw RJ *et al.* (2001) The characterization of novel, dual ErbB-2/EGFR, tyrosine kinase inhibitors: potential therapy for cancer. *Cancer Res* 61:7196–203.
89. Scaltriti M, Rojo F, Ocana A, Anido J, Guzman M, Cortes J, Di Cosimo S, Matias-Guiu X, Ramon y Cajal S, Arribas J *et al.* (2007) Expression of p95HER2, a truncated form of the HER2 receptor, and response to anti-HER2 therapies in breast cancer. *J Nat Cancer Ins* 99:628–38.
90. Normanno N, Morabito A, Luca A, Piccirillo M, Gallo M, Maiello M and Perrone F (2009) Target-based therapies in breast cancer: current status and future perspectives. *Endocrine-Related Cancer* 16:675–702.
91. Benz CC, Scott GK, Sarup JC, Johnson RM, Tripathy D, Coronado E, Shepard HM, Osborne CK. (1992) Estrogen-dependent, tamoxifen-resistant tumorigenic growth of MCF-7 cells transfected with HER2/neu. *Breast Cancer Res Treat* 24(2):85-95.
92. Ferrero-Poüs M, Hacène K, Bouchet C, Le Doussal V, Tubiana-Hulin M, Spyrtos F. (2000) Relationship between c-erbB-2 and other tumor characteristics in breast cancer prognosis. *Clin Cancer Res* 6(12):4745-54.
93. Ménard S, Valagussa P, Pilotti S, Gianni L, Biganzoli E, Boracchi P, Tomasic G, Casalini P, Marubini E, Colnaghi MI, Cascinelli N, Bonadonna G. (2001) Response to cyclophosphamide, methotrexate, and fluorouracil in lymph node-positive breast cancer according to HER2 overexpression and other tumor biologic variables. *J Clin Oncol* 19(2):329-35.
94. Coon JS, Marcus E, Gupta-Burt S, Seelig S, Jacobson K, Chen S, Renta V, Fronza G, Preisler HD. (2002) Amplification and overexpression of topoisomerase IIalpha predict response to anthracycline-based therapy in locally advanced breast cancer. *Clin Cancer Res* 8(4):1061-7.
95. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, *et al.* (1999) Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women

- who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol* 17:2639-48.
96. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, *et al.* (2007) 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* 25:118-45.
 97. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB *et al.* (2000) Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 406:747–52.
 98. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R *et al.* (2001) Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 98:10869–74.
 99. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J *et al.* (2003) Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 100:8418-23.
 100. Reis-Filho JS, Westbury C, Pierga JY. (2006) The impact of expression profiling on prognostic and predictive testing in breast cancer. *J. Clin. Pathol* 59:225–31.
 101. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF *et al.* (2005) Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin. Cancer Res* 11; 5678–85.
 102. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. (2005) Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol* 23:7350–60.
 103. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K *et al.* (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res.*10:5367–74.
 104. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R *et al.* (2002) Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am. J. Pathol* 161:1991–96.
 105. Weigelt B, Hu Z, He X, *et al.* (2005) Molecular portraits and 70-gene prognosis signature are preserved throughout the metastatic process of breast cancer. *Cancer Res* 65:9155–8.
 106. Parker JS, Mullins M, Cheang MCU, *et al.* (2009) Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol.* 27:1160–7.
 107. Buyse M, Loi S, van't Veer L, *et al.* (2006) Validation and clinical utility of a 70-gene prognostic signature for women with node-negative breast cancer. *J Natl Cancer Inst* 98:1183–92.

108. Mary Cianfrocca and William Gradishar (2009) New Molecular Classifications of Breast Cancer. *CA Cancer J Clin* 59:303-13
109. Wang Y, Klijn JGM, Siewerts AM, *et al.* (2005) Gene-expression profiles to predict distant metastasis of lymph node-negative primary breast cancer. *Lancet* 365:671–9.
110. Foekens JA, Atkins D, Zhang Yi, *et al.* (2006) Multicenter validation of a gene expression based prognostic signature in lymph node negative primary breast cancer. *J Clin Oncol* 24:1665–71.
111. Ma XJ, Wang Z, Ryan PD, *et al.* (2004) A two-gene expression ratio predicts clinical outcome in breast cancer patients treated with tamoxifen. *Cancer Cell*. 5:607–16.
112. Ma XJ, Hilsenback SG, Wang W, *et al.* (2006) The HOXB13:IL17BR expression index is a prognostic factor in early-stage breast cancer. *J Clin Oncol* 24:4611–17.
113. Jansen MP, Siewerts AM, Look MP, *et al.* (2007) HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related to tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol* 25:662–8.
114. Harris L, Fritsche H, Mennel R, *et al.* (2007) American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol* 25:5287–312.
115. Carey LA, Dees EC, Sawyer L *et al.* (2007) The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin. Cancer Res* 13:2329–34.
116. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI *et al.* (2007) Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin. Cancer Res* 13:4429–34.
117. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR *et al.* (2007) Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer* 7:134.
118. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. (2007) Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer* 109:1721–28.
119. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM *et al.* (2007) BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene* 14:2126–32.

120. Haffty BG, Yang Q, Reiss M *et al.* (2006) Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J. Clin. Oncol* 24; 5652–57.
121. Reis-Filho J S and Tutt A (2008) Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology* 52:108–18
122. Jones C, Mackay A, Grigoriadis A *et al.* (2004) Expression profiling of purified normal human luminal and myoepithelial breast cells: identification of novel prognostic markers for breast cancer. *Cancer Res* 64; 3037–45.
123. Matos I, Dufloth R, Alvarenga M, Zeferino LC, Schmitt F. ((2005) p63, cytokeratin 5, and P-cadherin: three molecular markers to distinguish basal phenotype in breast carcinomas. *Virchows Arch* 447; 688–94.
124. Savage K, Leung S, Todd SK *et al.* (2008) Distribution and significance of Caveolin 2 expression in normal breast and invasive breast cancer: an immunofluorescence and immunohistochemical analysis. *Breast Cancer Res Treat* 110(2):245-56.
125. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D *et al.* (2006) Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology* 49:10–21.
126. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS *et al.* (2006) Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology* 49:22–34.
127. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L *et al.* (2005) Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin. Cancer Res* 11:5175–80.
128. Livasy CA, Karaca G, Nanda R *et al.* (2006) Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod. Pathol* 19: 264–71.
129. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE *et al.* (2004) Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J. Pathol* 203:661–71.
130. 28. 43. Fan C, Oh DS, Wessels L *et al.* (2006) Concordance among gene expression-based predictors for breast cancer. *N. Engl. J. Med* 355: 560–9.
131. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, Fukutomi T, Hirohashi S. (2000) Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am. J. Surg. Pathol* 24:197–202.

132. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. (2005) Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J. Clin. Oncol* 23: 7350–60.
133. Turner N, Tutt A, Ashworth A.(2004) Hallmarks of ‘BRCAness’ in sporadic cancers. *Nat. Rev. Cancer* 4: 814–19.
134. Turner NC, Reis-Filho JS. (2006) Basal-like breast cancer and the BRCA1 phenotype. *Oncogene* 2006; 25; 5846–53.
135. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO *et al.* (2003) Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J. Natl Cancer Inst* 95:1482–85.
136. Turner N, Tutt A, Ashworth A. (2005) Targeting the DNA repair defect of BRCA tumours. *Curr. Opin. Pharmacol* 5: 388–93.
137. Bartz SR, Zhang Z, Burchard J *et al.* (2006) Small interfering RNA screens reveal enhanced cisplatin cytotoxicity in tumor cells having both BRCA network and TP53 disruptions. *Mol. Cell. Biol* 26: 9377–86.
138. Rottenberg S, Jaspers J, Kersbergen A, der Burg E, Nygren A, *at al.* (2008) High sensitivity of BRCA1-deficient mammary tumors to the PARP inhibitor AZD2281 alone and in combination with platinum drugs. *PNAS* 105(44):17079-84.
139. Schreiber V, Dantzer F, Ame JC, de Murcia G (2006) Poly(ADP-ribose): Novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7:517–28.
140. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. (2007) Cancer statistics, 2007. *CA Cancer J Clin* 57(1):43–66.
141. Eccles S, Paon L and Sleeman J (2007) Lymphatic metastasis in breast cancer: importance and new insights into cellular and molecular mechanisms *Clin Exp Metastasis* 24:619–36
142. Merlo LMF, Pepper JW, Reid BJ, Maley CC. ((2006) Cancer as an evolutionary and ecological process. *Nat Rev Cancer* 6(12):924–35.
143. Hanahan D, Weinberg RA. (2000) The hallmarks of cancer. *Cell* 100(1):57–70.
144. Vaidya K, Weich D (2007) Metastasis suppressors and their roles in breast carcinoma. *J Mammary Gland Biol Neoplasia* 12(2-3):175–90.
145. Fidler IJ, Radinsky R. (1996) Search for genes that suppress cancer metastasis. *J Natl Cancer Inst* 88 (23):1700–3.

146. Shawver LK, Slamon D, Ullrich A. (2002) Smart drugs: tyrosine kinase inhibitors in cancer therapy. *Cancer Cell* 1(2):117-23.
147. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, Fleming T, Eiermann W, Wolter J, Pegram M, Baselga J, Norton L. (2001) Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med* 344(11):783-92.
148. Weiss A, Schlessinger J. (1998) Switching signals on or off by receptor dimerization. *Cell* 94(3):277-80.
149. Price DJ, Avraham S, Feuerstein J, Fu Y, Avraham HK. (2002) The invasive phenotype in HMT-3522 cells requires increased EGF receptor signaling through both PI 3-kinase and ERK 1,2 pathways. *Cell Commun Adhes* 9(2):87-102.
150. Atlas E, Cardillo M, Mehmi I, Zahedkargaran H, Tang C, Lupu R. (2003) Heregulin is sufficient for the promotion of tumorigenicity and metastasis of breast cancer cells in vivo. *Mol Cancer Res* 1(3):165-75.
151. Zhang X, Yee D. (2000) Tyrosine kinase signalling in breast cancer: insulin-like growth factors and their receptors in breast cancer. *Breast Cancer Res* 2(3):170-5.
152. Chung J, Bachelder RE, Lipscomb EA, Shaw LM, Mercurio AM. (2002) Integrin (alpha 6 beta 4) regulation of eIF-4E activity and VEGF translation: a survival mechanism for carcinoma cells. *J Cell Biol* 158(1):165-74
153. Rodrigues LR, Teixeira JA, Schmitt FL, Paulsson M, Lindmark-Månsson H. (2007) The role of osteopontin in tumor progression and metastasis in breast cancer. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 16(6):1087-97
154. Laferriere J, Houle F, Huot J. (2002) Regulation of the metastatic process by E-selectin and stress-activated protein kinase-2/p38. *Ann N Y Acad Sci* 973:562-72.
155. Coussens LM, Fingleton B, Matrisian LM. (2002) Matrix metalloproteinase inhibitors and cancer: trials and tribulations. *Science* 295(5564):2387-92.
156. Lee CH, Jeon YT, Kim SH, Song YS. (2007) NF-kappaB as a potential molecular target for cancer therapy. *Biofactors* 29(1):19-35.
157. Chaudary N, Hill RP. (2007) Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast Dis* 26:55-64.

158. Shim H, Lau SK, Devi S, Yoon Y, Cho HT, Liang Z. (2006) Lower expression of CXCR4 in lymph node metastases than in primary breast cancers: potential regulation by ligand-dependent degradation and HIF-1 α . *Biochem Biophys Res Commun* 346(1):252-8.
159. Müller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verástegui E, Zlotnik A. (2001) Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410(6824):50-6.
160. Phillips KK, Welch DR, Miele ME, Lee J-H, Wei LL, Weissman BE. (1996) Suppression of MDA-MB-435 breast carcinoma cell metastasis following the introduction of human chromosome 11. *Cancer Res* 56(10):1222-26.
161. Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Yamamoto Y, Kawasoe T, Iwase H. (2006) Reduced expression of the breast cancer metastasis suppressor 1 mRNA is correlated with poor progress in breast cancer. *Clin Cancer Res* 12(21):6410-4.
162. Cronin-Fenton DP, Ries LA, Clegg LX *et al.* (2007) Rising incidence rates of breast carcinoma with micrometastatic lymph node involvement. *J Natl Cancer Inst* 99(13):1044-9.
163. Van den Eynden GG, Van Laere SJ, Van der Auwera I *et al.* (2007) Differential expression of hypoxia and (lymph) angiogenesis-related genes at different metastatic sites in breast cancer. *Clin Exp Metastasis* 24(1):13-23.
164. Karpanen T, Egeblad M, Karkkainen MJ, Kubo H, Ylä-Herttuala S, Jäättelä M, Alitalo K. (2001) Vascular endothelial growth factor C promotes tumor lymphangiogenesis and intralymphatic tumor growth. *Cancer Res* 61(5):1786-90.
165. Gaforio JJ, SerranoMJ, Sanchez-Rovira P, SirventA, Delgado-RodriguezM, CamposM, de la Torre N, Algarra I, Duenas R, Lozano A. (2003) Detection of breast cancer cells in the peripheral blood is positively correlated with estrogenreceptor status and predicts for poor prognosis. *International Journal of Cancer* 107:984-90.
166. Pierga JY, Bonneton C, Vincent-Salomon A, de Cremoux P, Nos C, Blin N, Pouillart P, Thiery JP, Magdelénat H. (2004) Clinical significance of immunocytochemical detection of tumor cells using digital microscopy in peripheral blood and bone marrow of breast cancer patients. *Clinical Cancer Research*. 10:1392-400.

167. Cristofanilli M, Budd GT, Ellis MJ, Stopeck A, Matera J, Miller MC, Reuben JM, Doyle GV, Allard WJ, Terstappen LW *et al.* (2004) Circulating tumor cells, disease progression, and survival in metastatic breast cancer. *N Eng J Med* 351:81–791.
168. Mehes G, Witt A, Kubista E, *et al.* (2001) Circulating breast cancer cells are frequently apoptotic. *Am J Pathol* 159:17–20.
169. Ross AA, Cooper BW, Lazarus HM, *et al.* (1993) Detection and viability of tumor cells in peripheral blood stem cell collections from breast cancer patients using immunocytochemical and clonogenic assay techniques. *Blood* 82:2605–10.
170. Carvalho MJ, Laranjo M, Abrantes M, Cabrita AS, Botelho MF, de Oliveira CF (2009) Breast cancer circulating tumor cells. *Oncol reviews* 2(4)225-35.
171. Racila E, Euhus D, Weiss AJ, *et al.* (1998) Detection and characterization of carcinoma cells in the blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:4589–94.
172. Ring A, Smith IE, Dowsett M. (2004) Circulating tumour cells in breast cancer. *Lancet Oncol* 5:79–88.
173. Braun S, Naume B. (2005) Circulating and disseminated tumor cells. *J Clin Oncol* 23:1623–6.
174. Lacroix M. (2006) Significance, detection and markers of disseminated breast cancer cells. *Endoc Relat Cancer* 13(4):1033-67.
175. Theirult RL, Hortobagyi GN. (1992) Bone metastasis in breast cancer. *Anticancer Drugs* 3:455–62.
176. Diel IJ, Kaufman M, Goener R, *et al.* (1992) Detection of tumour cells in bone marrow of patients with primary breast cancer: prognostic factor for distant metastasis. *J Clin Oncol* 10:1534–9.
177. Harbeck N, Untch M, Pache L, *et al.* (1994) Tumour cell detection in the bone marrow of breast cancer patients at primary therapy: results of a 3-year median follow-up. *Br J Cancer* 69:566–71.
178. Pantel K, Brakenhoff RH. (2004) Dissecting the metastatic cascade. *Nature Reviews Cancer* 4:448–56.
179. Solomayer EF, Diel IJ, Meyberg GC, Gollan C, Bastert G. (2000) Metastatic breast cancer: clinical course, prognosis and therapy related to the first site of metastasis. *Breast Cancer Res Treat* 59(3):271-8.

180. Hess KR, Puzstai L, Buzdar AU, Hortobagyi GN. (2003) Estrogen receptors and distinct patterns of breast cancer relapse. *Breast Cancer Res Treat* 78(1):105-18.
181. Guise TA. (2000) Molecular mechanisms of osteolytic bone metastases. *Cancer* 88(12 Suppl):2892-8.
182. Bundred NJ, Walker RA, Ratcliffe WA, Warwick J, Morrison JM, Ratcliffe JG. (1992) Parathyroid hormone related protein and skeletal morbidity in breast cancer. *Eur J Cancer* 28(2-3):690-2.
183. Bundred NJ, Ratcliffe WA, Walker RA, Cjoley S, Morrison JM, Ratcliffe JG. (1991) Parathyroid hormone related protein and hypercalcaemia in breast cancer. *Br Med J* 303(6816):1506-9.
184. Vukmirovic-Popovic S, Colterjohn N, Lhoták S, Duivenvoorden WC, Orr FW, Singh G. (2002) Morphological, histomorphometric, and microstructural alterations in human bone metastasis from breast carcinoma. *Bone* 31(4):529-35.
185. Southby J, Murphy LM, Martin TJ, Gillespie MT. (1996) Cell-specific and regulator-induced promoter usage and messenger ribonucleic acid splicing for parathyroid hormone-related protein. *Endocrinol* 137:1349-57.
186. Merryman JJ, DeWille JW, Werkmeister JR, Capen CC, Rosol TJ. (1994) Effects of transforming growth factor- β on parathyroid hormone-related protein production and ribonucleic acid expression by a squamous carcinoma cell line in vitro. *Endocrinol* 134:2424-30.
187. Yin JJ, Chirgwin JM, Dallas M, Grubbs BG, Wieser R, Massague' J, *et al.* (1999) TGF β signaling blockade inhibits PTHrP secretion by breast cancer cells and bone metastases development. *J Clin Invest* 103:197-206.
188. Suda T, Takahashi N, Udagawa N, Jimi E, Gillespie MT, Martin TJ. (1999) Modulation of osteoclast differentiation and function by the new members of the tumor necrosis factor receptor and ligand families. *Endocr Rev* 20(3):345-57.
189. Gupta GP, Perk J, Acharyya S, de Candia P, Mittal V, Todorova-Manova K, Gerald WL, Brogi E, Benezra R, Massagué J. (2007) ID genes mediate tumor reinitiation during breast cancer lung metastasis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(49):19506-11.
190. Minn AJ, Gupta GP, Siegel PM, Bos PD, Shu W, Giri DD, Viale A, Olshen AB, Gerald WL, Massague J (2005) Genes that mediate breast cancer metastasis to lung. *Nature* 436:518-24.

191. Minn AJ, Gupta GP, Padua D, Bos P, Nguyen DX, Nuyten D, Kreike B, Zhang Y, Wang Y, Ishwaran H, *et al.* (2007) Proc Natl Acad Sci USA 104:6740–5.
192. Yu Q, Geng Y, Sicinski P (2001) Specific protection against breast cancers by cyclin D1 ablation. Nature 411:1017–21.
193. Pentheroudakis G, Fountzilas G, Bafaloukos D, Koutsoukou V, Pectasides D, Skarlos D, Samantas E, Kalofonos HP, Gogas H, Pavlidis N. (2006) Metastatic breast cancer with liver metastases: a registry analysis of clinicopathologic, management and outcome characteristics of 500 women. Breast Cancer Res Treat 97(3):237-44.
194. Wiltout RH. (2000) Regulation and antimetastatic functions of liver-associated natural killer cells. Immunol Rev 174:63-76.
195. Sato T. (2002) Locoregional immuno(bio)therapy for liver metastases. Semin Oncol 29(2):160-7.
196. Wroński M, Arbit E, McCormick B. (1997) Surgical treatment of 70 patients with brain metastases from breast carcinoma. Cancer 80(9):1746-54.
197. Lee TH, Avraham HK, Jiang S, Avraham S. (2003) Vascular endothelial growth factor modulates the transendothelial migration of MDA-MB-231 breast cancer cells through regulation of brain microvascular endothelial cell permeability. J Biol Chem 278(7):5277-84.
198. Arnold SM, Young AB, Munn RK, Patchell RA, Nanayakkara N, Markesbery WR. (1999) Expression of p53, bcl-2, E-cadherin, matrix metalloproteinase-9, and tissue inhibitor of metalloproteinases-1 in paired primary tumors and brain metastasis. Clin Cancer Res 5(12):4028-33.
199. Tolnai, Susan (1975). A method for viable cell count. Methods in cell science 1(1):37-38
200. Bassa P, García Garzón JR, Piera C, Pavía A, Minoves M, Moragas M, Pavía J, Lomeña F, Setoain J. (1994) Procedure for red blood cell labelling with ^{99m}Tc-HMPAO. Methodology and quality control. Nucl Med Biol 21(7):963-7.
201. Jemal A, Siegel R, Ward E, Murray T, Xu J, Thun MJ. (2007) Cancer statistics, 2007. CA Cancer J Clin 57(1):43–66.
202. Vaidya KS, Welch DR. (2007) Metastasis suppressors and their roles in breast carcinoma. J Mammary Gland Biol Neoplasia 12(2-3):175-90.

203. Weiss L. (1992) Comments on hematogenous metastatic patterns in humans as revealed by autopsy. *Clin Exp Metastasis* 10:191–9.
204. Rosol TJ, Tannehill-Gregg SH, Corn S, Schneider A, McCauley LK. (2004) Animal models of bone metastasis. *Cancer Treat Res* 118:47-81.
205. Fantozzi A, Christofori G. (2006) Mouse models of breast cancer metastasis. *Breast Cancer Res* 8(4):212.
206. Gravekamp C, Sypniewska R, Gauntt S, Tarango M, Price P, Reddick R (2004) Behavior of metastatic and nonmetastatic breast tumors in old mice. *Exp Biol Med* 229:665-75.
207. Hurst J, Maniar N, Tombarkiewicz J, Lucas F, Roberson C, Steplewski Z, James W, Perras J. (1993) A novel model of a metastatic human breast tumour xenograft line. *Br J Cancer* 68:274-6.
208. Kim JB, O'Hare MJ, Stein R. (2004) Models of breast cancer: is merging human and animal models the future? *Breast Cancer Res* 6:22-30.
209. Pauwels EK, Ribeiro MJ, Stoot JH, McCready VR, Bourguignon M, Mazière B. (1998) FDG accumulation and tumor biology. *Nucl Med Biol* 25(4):317-22.
210. Plathow C, Weber WA. (2008) Tumor cell metabolism imaging. *J Nucl Med* 49 (Suppl 2):43S-63S.
211. MacDonald IC, Groom AC, Chambers AF. (2002) Cancer spread and micrometastasis development: quantitative approaches for in vivo models. *Bioessays* 24(10):885-93.
212. Swartz MA, Skobe M. (2001) Lymphatic function, lymphangiogenesis, and cancer metastasis. *Microsc Res Tech* 55:92–7.
213. Chambers AF, Naumov GN, Varghese HJ, Nadkarni KV, MacDonald IC, Groom AC. (2001) Critical steps in hematogenous metastasis: an overview. *Surg Oncol Clin N Am* 10:243–55.
214. Cameron MD, Schmidt EE, Kerkvliet N, Nadkarni KV, Morris VL, Groom AC, Chambers AF, MacDonald IC. (2000) Temporal progression of metastasis in lung: cell survival, dormancy, and location dependence of metastatic inefficiency. *Cancer Res* 60:2541-6.
215. Tarin D. (2006) New insights into the pathogenesis of breast cancer metastasis. *Breast Dis* 26:13-25.

216. Campbell FC, Blamey RW, Elston CW, Nicholson RI, Griffiths K, Haybittle JL. (1981) Oestrogen-receptor status and sites of metastasis in breast cancer. *Br J Cancer* 44(3):456-9.
217. Welch DR.(1997) Technical considerations for studying cancer metastasis in vivo. *Clin Exp Metastasis* 5:272–306.
218. Morris VL, Schmidt EE, Koop S, MacDonald IC, Grattan M, Khokha R, McLane MA, Niewiarowski S, Chambers AF, Groom AC. (1995) Effects of the disintegrin eristostatin on individual steps of hematogenous metastasis. *Exp Cell Res* 219:571–8.
219. Cavallaro U, Christofori G. (2004) Cell adhesion and signalling by cadherins and Ig-CAMs in cancer. *Nat Rev Cancer* 4:118-32.
220. Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA. (2005) CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res* 65:6755-63.
221. Chambers AF, Groom AC, MacDonald IC. (2002) Dissemination and growth of cancer cells in metastatic sites. *Nat Rev Cancer* 2:563-72.
222. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, *et al* (2001). Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 410:50-6.
223. Staller P, Sulitkova J, Lisztwan J, Moch H, Oakeley EJ, Krek W (2003) Chemokine receptor CXCR4 downregulated by von Hippel-Lindau tumour suppressor pVHL. *Nature* 425:307-11.
224. Lee AV, Cui X, Oesterreich S. (2001) Cross-talk among estrogen receptor, epidermal growth factor, and insulin-like growth factor signaling in breast cancer. *Clin Cancer Res* 7(12 Suppl):4429s-4435s.
225. Cui X, Zhang P, Deng W, Oesterreich S, Lu Y, Mills GB, Lee AV. (2003) Insulin-like growth factor-I inhibits progesterone receptor expression in breast cancer cells via the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/mammalian target of rapamycin pathway: progesterone receptor as a potential indicator of growth factor activity in breast cancer. *Mol Endocrinol* 17(4):575-88.
226. Chaudary N, Hill RP. (2006) Hypoxia and metastasis in breast cancer. *Breast Dis* 26:55-64.
227. P. Vaupel, A. Mayer, S. Briest and M. Hockel, (2003) Oxygenation gain factor: a novel parameter characterizing the association between hemoglobin level and the oxygenation status of breast cancers. *Cancer Res* 63: 7634–7.

228. G.L. Semenza (2000) Hypoxia, clonal selection, and the role of HIF-1 in tumor progression. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 35: 71–103.
229. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K *et al.* (2007) Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res* 9;R4.
230. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, Fukutomi T, Large H. (2000) Central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am. J. Surg. Pathol* 24; 197–202.
231. Weiss L, Schmid-Schonbein GW. (1989) Biomechanical interactions of cancer cells with the microvasculature during metastasis. *Cell Biophys* 14:187–215.
232. Morris VL, MacDonald IC, Koop S, Schmidt EE, Chambers AF, Groom AC. (1993) Early interactions of cancer cells with the microvasculature in mouse liver and muscle during hematogenous metastasis: videomicroscopic analysis. *Clin Exp Metastasis* 11:377–390.
233. Kuukasjarvi T, Kononen J, Helin H, *et al.* (1996) Loss of estrogen receptor in recurrent breast cancer is associated with poor response to endocrine therapy. *J Clin Oncol* 14:2584-89.
234. Gomez-Fernandez C, Daneshbod Y, Nassiri M, Milikowski C, Alvarez C, Nadji M. (2008) Immunohistochemically determined estrogen receptor phenotype remains stable in recurrent and metastatic breast cancer. *Am J Clin Pathol* 130(6):879-82.
235. McGuire WL, Chamness GC, Fuqua SAW. (1991) Estrogen receptor variants in clinical breast cancer. *Mol Endocrinol* 5:1571-1577.
236. Vincent-Salomon A, Jouve M, Genin P, *et al.* (2002) HER2 status in patients with breast carcinoma is not modified selectively by preoperative chemotherapy and is stable during the metastatic process. *Cancer* 94:2169–73.
237. Cardoso F, Di Leo A, Larsimont D, *et al.* ((2001) Evaluation of HER2, p53, bcl-2, topoisomerase II-alpha, heat shock proteins 27 and 70 in primary breast cancer and metastatic ipsilateral axillary lymph nodes. *Ann Oncol* 12:615–20.
238. Edgerton SM, Moore D 2nd, Merkel D, Thor AD. (2003) erbB-2 (*HER-2*) and breast cancer progression. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 11:214–21.

239. Gancberg D, Di Leo A, Cardoso F, *et al.* (2002) Comparison of *HER-2* status between primary breast cancer and corresponding distant metastatic sites. *Ann Oncol* 13:1036–43.
240. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K *et al.* (2004) Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin. Cancer Res* 10:5367–74.
241. Hicks DG, Short SM, Prescott NL *et al.* (2006) Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5 / 6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am. J. Surg. Pathol* 30:1097–104.
242. Lerma E, Barnadas A, Prat J. (2009) Triple negative breast carcinomas: similarities and differences with basal like carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol* 17(6):483-94.
243. Pintens S, Neven P, Drijkoningen M, Van Belle V, Moerman P, Christiaens MR, Smeets A, Wildiers H, Vanden Bempt I. ((2009) Triple negative breast cancer: a study from the point of view of basal CK5/6 and HER-1. *J Clin Pathol* 62(7):624-8.
244. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, El-Sayed ME, *et al.* (2009) Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res* 15(7):2302-10.