

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA E DETERMINAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS  
CARCINOMAS MAMÁRIOS RECEPTOR DE ESTROGÊNIO NEGATIVO E  
RECEPTOR DE PROGESTERONA POSITIVO**

**Rosana Pellin De Nardi**

Porto Alegre, 2017

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Medicina

Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia

**ANÁLISE DA FREQUÊNCIA E DETERMINAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DOS  
CARCINOMAS MAMÁRIOS RECEPTOR DE ESTROGÊNIO NEGATIVO E  
RECEPTOR DE PROGESTERONA POSITIVO**

**Rosana Pellin De Nardi**

Orientador: Profa. Dra. Andrea Pires Souto Damin.

Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre no Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul.

Porto Alegre, 2017

CIP - Catalogação na Publicação

De Nardi, Rosana Pellin  
Análise da Frequência e Determinação Imuno-  
histoquímica dos Carcinomas Mamários Receptor de  
Estrogênio Negativo e Receptor de Progesterona  
Positivo / Rosana Pellin De Nardi. -- 2017.  
102 f.

Orientadora: Andrea Pires Souto Damin.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-  
Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e  
Obstetrícia, Porto Alegre, BR-RS, 2017.

1. Câncer de Mama. I. Damin, Andrea Pires Souto,  
orient. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização do meu Mestrado.

Primeiramente, agradeço a minha orientadora Professora Doutora Andréa Pires Souto Damin pelo convite para realizar o Mestrado. Os ensinamentos começaram durante a Residência em Mastologia, como minha preceptora. Após, durante o Mestrado, como minha orientadora, esteve presente de forma muito ativa, sempre com uma visão prática sobre a pesquisa. Sua dedicação às pacientes, sua competência e seus conhecimentos me serviram como exemplo e contribuíram de forma substancial para a minha formação.

Agradeço ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre e a Universidade Federal do Rio Grande de Sul por serem instituições de excelência e incentivadoras da pesquisa.

Agradeço a todos os professores com quem tive aula durante o Mestrado, muitos dos quais tive o prazer de reencontrar após alguns anos do término da Residência em Ginecologia e Obstetrícia. As disciplinas e os temas discutidos contribuíram para minha formação acadêmica, e muitas delas também, para minha formação pessoal.

Ao Dr. Diego de Mendonça Uchôa, com sua paciência e com sua coerência, agradeço pelo excelente trabalho de leitura das lâminas e pelo grande auxílio em todos as questões ligadas à Patologia durante o meu trabalho.

A Gabriela Remonato, meu agradecimento pela confecção das lâminas de imuno-histoquímica e pela atenção e carinho dispensados a mim, durante esse processo.

Meu agradecimento a todos os funcionários da Patologia, em especial a Carina Machado Costamilan Henriques e seus estagiários, os quais separaram as lâminas e os blocos de parafina solicitados por diversas vezes.

Meu especial agradecimento a minha família que entendeu a minha ausência e sempre me apoiou. A meus pais, meus grandes exemplos, agradeço muito pela generosidade em fazer com que essa etapa da minha vida fosse mais tranquila. Agradeço a meus irmãos e a meu afilhado Pedro, que mesmo passando por momentos difíceis, me transmitiram força, carinho e motivação.

Aos meus amigos e aos meus colegas de trabalho, agradeço a compreensão durante os momentos em que precisei estar ausente.

Ao meu noivo, agradeço pelo amor, na forma de atenção, de carinho, de paciência e de cuidado. Agradeço a sua dedicação em me fazer feliz, mesmo quando distante ou quando eu não consegui retribuí-lo. Muito obrigada por me ajudar a evoluir e ao mesmo tempo a tornar minha vida mais leve.

E enfim, meu mais especial agradecimento às pacientes, cujas doenças e particularidades nos despertam questionamentos que nos levam à busca continuada de conhecimentos. Através do afeto e confiança depositados em mim, as pacientes me motivam a seguir pesquisando e aperfeiçoando meu modo de assisti-las. Muito Obrigada a todas!

## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURA.....	7
LISTA DE FIGURAS.....	10
RESUMO .....	11
ABSTRACT .....	13
INTRODUÇÃO .....	15
REVISÃO DA LITERATURA.....	18
1. Estratégia de Busca.....	18
2. Mapa Conceitual .....	20
3. Epidemiologia do Câncer de mama.....	21
4. Subtipos tumorais – Avaliação molecular e Imuno-histoquímica...	22
5. Hormonioterapia.....	32
6. Receptores Hormonais e o Fenótipo RE-/RP+.....	34
7. Fatores preditivos e prognósticos e o Fenótipo RE-/RP+.....	39
JUSTIFICATIVA .....	46
HIPÓTESES .....	47
OBJETIVOS .....	48
REFERÊNCIAS .....	49
ARTIGO EM INGLÊS.....	68
CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	100
PERSPECTIVAS FUTURAS .....	103

## LISTA DE ABREVIATURAS

**ASCO/CAP:** American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists – Sociedade Americana de Oncologia/Colégio Americano de Patologistas

**CK5:** Citokeratin 5 – citoqueratina 5

**DAB:** Diaminobenzidina

**DMO:** Densidade Mineral Óssea

**EGF:** Epidermal growth factor – fator de crescimento epidérmico

**EGFR/HER 1:** Epidermal Growth Factor Receptor (Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico) / Human Epidermal growth factor Receptor-type 1 (Receptor tipo 1 do fator de crescimento epidérmico humano)

**ESR1:** gene do receptor de estrogênio

**ERBB2:** gene do HER2

**Et al:** e outros

**HCPA:** Hospital de Clínicas de Porto Alegre

**HER 2:** Human Epidermal growth factor Receptor-type 2 – Receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano

**H2O2:** Peróxido de Hidrogênio

**IA:** Inibidores da Aromatase

**IGF-I:** Insulin-like growth factor I – Fator de crescimento semelhante à insulina I

**IHQ:** Imuno-histoquímica

**Ki67:** Antígeno nuclear marcador de proliferação celular

**Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonato de Lítio

**Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>:** Carbonato de Sódio

**PAM 50:** Prediction analysis of microarray 50 – Teste genético que avalia a expressão de 50 genes relacionados ao câncer de mama

**PGR:** gene do receptor de progesterona

**RE:** Receptor de Estrogênio

**RH:** Receptor Hormonal

**RNAm:** RNA mensageiro

**RP:** Receptor de Progesterona

**(+):** Positivo

**(-):** Negativo

**RT-PCR:** Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction – Reação de Transcriptase Reversa, seguida de reação em cadeia de polimerase.

**SERMs:** Selective Estrogen Receptor Modulators - Moduladores Seletivos dos Receptores de Estrogênio



**TGF alpha:** Transforming Growth Factor-alpha – Fator de crescimento transformador – alfa.

**TFF1 (pS2):** Trefoil fator 1 (proteína pS2)

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Expressão dos Receptores Hormonais.....	26
<b>Figura 2:</b> Distribuição dos subtipos dos carcinomas mamários.....	27
<b>Figura 3:</b> Carcinomas triplo-negativos e basal-like.....	29
<b>Figura 4:</b> TFF1 positivo.....	45
<b>Figura 5:</b> CK5.....	45
<b>Figura 6:</b> EGFR positivo.....	45

## RESUMO

**Introdução:** Cerca de 70% dos carcinomas mamários possui expressão de receptores hormonais de estrogênio (RE) e de progesterona (RP), os quais estão envolvidos em processos relacionados ao desenvolvimento tumoral. Conseqüentemente, terapias que bloqueiam a ação hormonal têm sido utilizadas para tratamento e prevenção do câncer de mama. A ausência do RE em um câncer de mama PR positivo é infrequente e de significado incerto. Pode representar um subgrupo de tumores com vias de sinalização de receptores hormonais deficientes, que, provavelmente, não responderá à hormonioterapia, comportando-se como um tumor com perfil triplo-negativo e, portanto, sem necessidade do uso de terapias-alvo anti-hormonais.

**Objetivo:** Avaliar a prevalência de tumores RE negativo e RP positivo, determinando, através da expressão imuno-histoquímica (IHQ) dos marcadores TFF1, CK5 e EGFR, os tumores com comportamento biológico triplo-negativo. A identificação do perfil triplo-negativo dentro desse subgrupo irá melhorar a seleção das pacientes que realmente necessitam de terapia de bloqueio hormonal.

**Material e Métodos:** Estudo retrospectivo, onde foram pesquisados todos os exames imuno-histoquímicos de carcinoma de mama invasivo realizados no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) atendidos no período de dezembro de 2012 a dezembro de 2016. Os casos que apresentaram perfil imuno-histoquímico estrogênio negativo e progesterona positivo foram selecionados para verificação da sua prevalência e características clínico-patológicas, assim como para a realização de Imuno-histoquímica específica com

os anticorpos TFF1, CK5 e EGFR. Quando disponível em nova amostra foi repetida a imuno-histoquímica dos RE e dos RP.

**Resultados:** Dos 1188 casos de carcinoma mamário invasor, o fenótipo RE-/RP+ esteve presente em 3,19% da nossa amostra. Em 30 casos disponíveis para análise, a realização de imuno-histoquímica de TFF1, EGFR e CK5 classificou 27 casos (90%) como triplo-negativos basal-like, 1 caso (3,3%) como luminal-like e dois casos (6,7%) como inconclusivos. Na repetição da imuno-histoquímica dos RE e RP, 75% dos casos (12/16) foram reclassificados como RE- e RP-. As pacientes apresentaram características clínico-patológicas semelhantes aos tumores triplo-negativos e recidivas precoces.

**Conclusões:** Os tumores RE-/RP+ apresentam um comportamento agressivo, assemelhando-se aos tumores triplo-negativos. Como ainda são alvo de terapias endócrinas, a realização de IHQ para TFF1, CK5 e EGFR representa uma importante ferramenta para a categorização adequada desses tumores e uma melhor programação terapêutica.

**Palavras-chave:** Câncer de mama, Imuno-histoquímica, Receptor Estrogênio negativo e Receptor de Progesterona positivo, Triplo-negativo, Basal-like.

## ABSTRACT

**Introduction:** About 70% of breast carcinomas present expression of estrogen (ER) and progesterone (PR) hormonal, which are involved in processes related to tumor development. Consequently, therapies that block hormone action have been used for treating and preventing breast cancer. The absence of ER in a PR+ breast cancer is infrequent and has uncertain significance. It may represent a subset of tumors with deficient hormone receptors signaling pathways, which will probably not respond to hormone therapy, behaving as a tumor with triple-negative profile and, therefore, with no need for anti-hormone target therapies.

**Objective:** To evaluate the prevalence of ER-negative and PR-positive tumors, determined by the immunohistochemical expression of markers TFF1, CK5 and EGFR tumors with triple-negative biological behavior. The identification of triple-negative profile within this subgroup will improve the selection of patients who really need hormone-blocking therapy.

**Materials and Methods:** A retrospective study that investigated all immunohistochemical results for invasive breast carcinoma performed by the pathology service at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) between December 2012 and December 2016. The cases that presented immunohistochemical profiles of estrogen receptor-negative and progesterone receptor-positive were selected to verify their prevalence and clinicopathological features, as well as to perform a specific immunohistochemistry with antibodies TFF1, CK5 and EGFR. When available in new samples, the immunohistochemistry of ER and PR was repeated.

**Results:** Out of 1188 invasive breast carcinomas, ER-/PR+ phenotype was identified in 3.19% of our sample. In 30 cases available for analysis, immunohistochemistry of TFF1, EGFR and CK5 classified 27 cases (90%) as basal-like triple-negative, 1 case (3.3%) as luminal-like and two cases (6.7%) as inconclusive. After repeating the immunohistochemistry of ER and PR in the available samples, 75% of the cases (12/16) were reclassified as ER- and PR-. Patients presented clinicopathological features similar to triple-negative tumors and early relapses.

**Conclusions:** ER-/PR+ tumors exhibit an aggressive behavior, resembling triple-negative tumors. Since they are still the targets of endocrine therapies, immunohistochemistry for TFF1, CK5 and EGFR is an important tool for an appropriate classification of these tumors and better therapeutic planning.

**Keywords:** Breast cancer, Immunohistochemistry, Estrogen receptor-negative and Progesterone Receptor-positive, Triple-negative, Basal-like.

## INTRODUÇÃO

O câncer de mama é o câncer que mais acomete mulheres em todo o mundo, respondendo por cerca de 25% dos casos novos a cada ano<sup>1,2</sup>. Constitui a maior causa de mortalidade entre os tipos de câncer nos países em desenvolvimento, perdendo apenas para o câncer de pulmão em países desenvolvidos<sup>2</sup>.

Representa uma doença heterogênea em relação à etiologia e às características clínicas e patológicas, com alguns casos apresentando um crescimento lento e bom prognóstico, enquanto outros tomam um curso clínico extremamente agressivo<sup>3,4,5,6</sup>.

A maior parte dos carcinomas de mama (em torno 70%) possui expressão de receptores hormonais, dependendo do estrogênio e, possivelmente, da progesterona para seu desenvolvimento e crescimento<sup>7,8,9</sup>. As ações dos hormônios esteroides nos tecidos são mediadas através de uma ligação de alta afinidade a receptores específicos. Conseqüentemente, terapias que possuem como alvo os hormônios e suas vias sinalizadoras têm sido utilizadas para tratamento e para prevenção do câncer de mama. Os mecanismos dessas terapias se baseiam, principalmente, na atuação sobre os receptores de estrogênio (RE)<sup>9,10</sup>.

A avaliação inicial do carcinoma de mama consiste na análise imunohistoquímica dos receptores hormonais, além do HER2 e do Ki67. A partir desta avaliação os tumores são classificados em 4 grupos, que apresentam características clínico-patológicas e prognósticas diferentes<sup>11,12,13</sup>. Os tumores

Luminais apresentam positividade para os receptores hormonais, sendo classificados em luminal A: RE positivo e Receptor de Progesterona (RP) positivo, HER2 negativo e Ki67 < 14% e luminal B: RE positivo e/ou RP positivo, HER2 positivo/negativo, Ki67 ≥ 14%<sup>7,13</sup>. Os tumores luminais apresentam resposta à hormonioterapia, baseada no bloqueio da ação hormonal estrogênica, sendo que há melhor resposta no grupo Luminal A em relação ao B<sup>12</sup>. Os outros dois grupos, que apresentam pior prognóstico em relação aos primeiros, são o HER2-positivo isolado, sem a positividade de receptores esteroides e o Triplo-negativo: RE, RP e HER2 negativos, sendo que a maior parte destes é representada pelos carcinomas basais (tumores com características das células basais da mama)<sup>6,7,14,15,16,17,18</sup>.

Apesar dos tumores RE negativo e RP positivo, que representam 1 a 5%<sup>19-27</sup> de todos os casos de câncer de mama, ainda serem classificados como luminais, sendo passíveis de terapia endócrina, dados sugerem que eles apresentam uma pior resposta clínica em comparação aos tumores RE positivos<sup>19,23,25,28</sup>. Itoh e colaboradores (2014) demonstraram pela primeira vez, através da avaliação histogenética por DNA microarray, que esse grupo de tumores na realidade apresenta um comportamento misto, já que 65% dos tumores RE-/RP+ nesse estudo eram geneticamente triplo-negativos basal-like e 20% eram luminal-like<sup>29</sup>. Recentemente também foi demonstrado através da expressão gênica por PAM 50 que 60% desse subgrupo de tumores têm comportamento triplo-negativo, ou seja, com baixa sensibilidade à terapia hormonal e um pior prognóstico<sup>28</sup>. Nesse estudo, foram avaliados em 64 tumores, através da imuno-histoquímica, três marcadores – TFF1, CK5, e EGFR – observando-se correlação com a determinação gênica para classificar esses tumores no perfil luminal-like e no perfil basal-like. O painel imuno-



histoquímico desses marcadores mostrou-se como um fator prognóstico independente para recaída ( $p=0,017$ ).

A avaliação molecular através da expressão gênica tumoral é o teste padrão-ouro para classificação dos cânceres de mama, fornecendo importantes informações prognósticas e preditivas. Porém é um método caro e de difícil acesso. Dessa forma, a imuno-histoquímica, técnica utilizada rotineiramente na prática clínica, que detecta a presença de proteínas celulares sintetizadas através da expressão gênica, representa uma ferramenta importante na diferenciação dos subtipos tumorais<sup>30,31,32</sup>.

Nosso estudo irá avaliar a prevalência do fenótipo RE-/RP+, determinando dentre esses tumores, através da expressão imuno-histoquímica dos marcadores TFF1, EGFR e CK5, quais possuem comportamento triplo-negativo (TFF1 negativo e EGFR e/ou CK5 positivos). Dessa forma, pretendemos contribuir para a melhor seleção dos pacientes que se beneficiarão da terapia de bloqueio hormonal.

## REVISÃO DA LITERATURA

### 1. Estratégia de busca

A revisão da literatura foi realizada através da busca de artigos científicos publicados nas bases de dados eletrônicas Pubmed, Scopus e Scielo. A pesquisa foi limitada aos idiomas inglês, português e espanhol.

As palavras-chave utilizadas estão na tabela a seguir, assim como o número de artigos encontrados e o número de artigos selecionados em cada base de dados. As publicações foram escolhidas de acordo com a relevância para o tema em estudo e encontram-se entre parênteses.

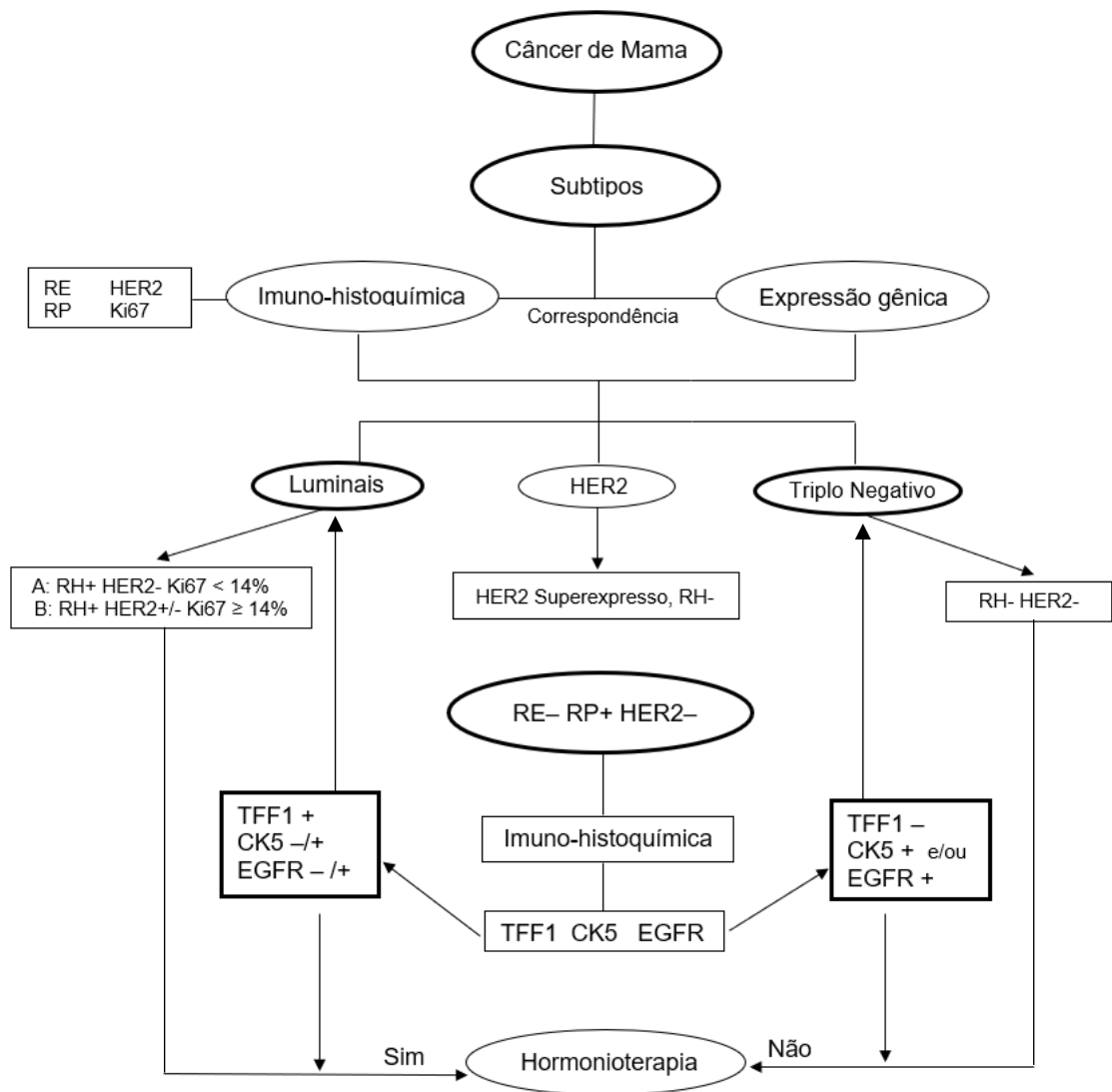
Além disso, uma busca adicional foi executada na lista de referência dos artigos de interesse para selecionar estudos relevantes, não identificados pela pesquisa eletrônica.

**Tabela 1 – Estratégia de busca nas bases de dados**

<b>Palavras-Chave</b>	<b>Pubmed</b>	<b>Scopus</b>	<b>Scielo</b>
“breast cancer” AND “epidemiology”	29126	10766	94
“breast cancer” AND “epidemiology” AND “incidence”	8215 (1)	5831	14
“breast cancer” AND “epidemiology” AND “incidence” AND “mortality”	2223 (2)	3782 (2)	4
<b>Palavras-Chave</b>	<b>Pubmed</b>	<b>Scopus</b>	<b>Scielo</b>

"breast cancer" AND "epidemiology" AND "incidence" AND "mortality" AND "Brazil"	37(3)	17	0
"single hormone receptor positive" AND "breast cancer"	5 (5)	5 (5)	0
"progesterone receptor positive" AND "estrogen receptor negative"	64 (10)	117 (13)	0
"estrogen receptor" AND "progesterone receptor" AND "isoform"	115 (1)	403 (3)	0
"breast cancer" AND "hormone therapy" AND "tamoxifen"	504 (7)	5095	17
"breast cancer" AND "molecular classification"	235 (5)	367 (4)	15(1)
"breast cancer" AND "immunohistochemistry"	13502	25561	24
"breast cancer" AND "immunohistochemical" AND "receptor" AND "progesterone" AND "estrogen"	1265 (11)	2109 (4)	17
"breast cancer" AND "immunohistochemical" AND "receptor" AND "progesterone" AND "estrogen" AND "basal-like"	124 (5)	193 (2)	0
"triple-negative" AND "basal-like" AND "breast cancer"	673 (8)	891(5)	3
"TFF1" AND "breast cancer"	409 (3)	321 (2)	0
"TFF1" AND "breast cancer" AND "pS2"	287 (5)	195 (3)	0

## 2. Mapa conceitual



### 3. Epidemiologia do Câncer de mama

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais frequente entre as mulheres. De acordo com o GLOBOSCAN, em 2012 ocorreram 1,67 milhões de casos novos da doença, sendo que a incidência vem aumentando ao longo dos anos, em todo o mundo<sup>2</sup>. Estima-se que em 2050 a incidência mundial do câncer de mama atinja 3,2 milhões de casos novos por ano<sup>3</sup>.

A incidência varia muito entre os países, sendo que as maiores taxas (>90/100.000 mulheres-ano) encontram-se nos países desenvolvidos, como os da Europa Ocidental e América do Norte e as menores (<30/100.000 mulheres-ano) situam-se em regiões em desenvolvimento, como no Leste Asiático e na África Central<sup>2,33</sup>. Segundo estimativa norte-americana as mulheres têm risco de 12,3% ao longo de sua vida de desenvolver a doença, o que representa 1 em cada 8 mulheres<sup>34</sup>. Embora os países desenvolvidos apresentem as maiores taxas de incidência, tem-se observado tendência de aumento nos demais países, fato atribuído ao envelhecimento da população, à urbanização, às mudanças no estilo de vida e às práticas de diagnóstico<sup>1,2,33,35</sup>.

No Brasil a estimativa para 2016 foi de 57.960 casos novos de câncer de mama, ou seja, 56,02 casos a cada 100 mil mulheres (28,1% dos casos de câncer). A região sul tem a maior incidência do país, com estimativa de 74,3 casos por 100.000 mulheres-ano. Porto Alegre é a capital com maior incidência da doença, com 130,99 casos por 100.000 mulheres-ano, equiparando-se as maiores incidências mundiais<sup>1</sup>.

Esse tipo de câncer, que é mais frequente em mulheres brancas não-hispânicas, apresenta pico de incidência entre 65 a 74 anos<sup>36</sup>. Porém observa-se

maior incidência de mulheres negras em pacientes abaixo de 40 anos, assim como de tumores mais agressivos e que não apresentam expressão de receptores hormonais<sup>34</sup>.

O câncer de mama é a maior causa de morte por câncer em mulheres nos países em desenvolvimento, ocupando o segundo lugar em países desenvolvidos. Embora a incidência seja mais alta em países ricos, sessenta por cento das mortes por câncer de mama ocorrem em regiões menos desenvolvidas<sup>37</sup>. Nos últimos 40 anos, a sobrevivência vem aumentando nos países desenvolvidos, em grande parte devido ao diagnóstico precoce e aos avanços na terapêutica, sendo que, atualmente, atinge taxas gerais maiores que 85% em 5 anos, enquanto que nos países em desenvolvimento permanece com valores em torno de 60%. No Brasil, as taxas de mortalidade ainda são altas (14 óbitos a cada 100.000 mulheres), com uma tendência à queda nas áreas com maior nível socioeconômico<sup>1,38,39</sup>.

Importantes avanços na abordagem do câncer de mama aconteceram nos últimos anos, possibilitando, dessa forma, a diminuição de sua mortalidade. O maior entendimento dos subtipos tumorais e suas características, ganha fundamental importância nesse contexto, uma vez que possibilita um tratamento mais individualizado e eficaz no combate à mortalidade por essa doença.

#### **4. Subtipos tumorais – Avaliação molecular e Imuno-histoquímica**

O câncer de mama é uma patologia heterogênea e complexa que possui comportamentos biológicos variados. Apresenta-se na forma de diferentes subtipos histológicos, que mesmo compartilhando das características morfológicas, podem

diferir nas propriedades moleculares, na apresentação clínica e na resposta ao tratamento<sup>3,6,5,40</sup>.

O carcinoma mamário tem origem na unidade ducto-lobular terminal. A maioria dos tumores de mama (cerca de 80%) são representados pelos carcinomas ductais invasores originando-se do epitélio dos ductos mamários. Em seguida observam-se os carcinomas lobulares invasores, seguidos dos subtipos que juntos correspondem em torno de 10% dos casos: mucinoso, cribriforme, tubular, papilar e micropapilar, medular, metaplásico e adenoide-cístico<sup>41,42</sup>.

Atualmente, esses subtipos morfológicos podem ainda ser subdivididos baseando-se na expressão de biomarcadores protéicos e no perfil de expressão gênica<sup>5,41,43</sup>.

Com o avanço biotecnológico, desenvolveram-se assinaturas genéticas do câncer, utilizando técnicas como o RT-PCR (Reverse Transcription Polimerase Chain Reaction) e a análise genética por múltiplos genes - DNA microarray. As assinaturas moleculares avaliam a expressão de um conjunto de genes, identificando tumores com características biológicas e clínicas específicas. Permitem um melhor esclarecimento sobre a biologia do câncer de mama, avaliando a relação entre a progressão neoplásica e a expressão de oncogenes, genes supressores de tumor e genes responsáveis pela expressão de receptores hormonais. Dessa forma, além de auxiliarem no diagnóstico e representarem assinaturas prognósticas e preditivas, ajudam a identificar novos alvos terapêuticos e a personalizar estratégias de tratamento<sup>30,40,43,44,45</sup>.

São diversos os testes moleculares disponíveis que avaliam a expressão de variáveis grupos de genes e estratificam os pacientes de acordo com seu risco.

Alguns deles são: Mamaprint – avalia 70 genes através da técnica de microarray; Oncotype Dx – 21 genes através de RT-PCR; EndoPredict – 11 genes através da técnica de RT-PCR; Prosigna (PAM 50) – 50 genes utilizando RT-PCR. Este último, ao estratificar os carcinomas de mama de acordo com seu subtipo molecular intrínseco é um teste preditivo muito usado em pesquisa<sup>6,42,46</sup>.

De acordo com a classificação genômica subdividimos os carcinomas invasores de mama em: *Luminal A*, *Luminal B*, *HER-2 enriquecido*, *Basal-like* e *Normal-like*<sup>44,47</sup>. Há ainda os subtipos menos elucidados como *claudin-low* e *molecular apócrino*<sup>7</sup>. Cada subgrupo tumoral apresenta semelhanças tanto na expressão gênica como na velocidade de crescimento, vias de sinalização, composição celular, prognóstico e resposta terapêutica<sup>7</sup>.

A tecnologia de microarray/RT-PCR é o padrão-ouro para classificação molecular do câncer de mama, porém não é um método acessível à população em geral, devido ao seu alto custo, à complexidade e à viabilidade técnica, sendo substituída rotineiramente pelos testes imuno-histoquímicos<sup>4,43</sup>.

Através da realização da imuno-histoquímica de RE, RP, HER2 e Ki67 – podemos prever a classificação molecular. A IHQ desses quatro marcadores é mandatória após o diagnóstico de carcinoma mamário invasor, sendo a forma mais utilizada para caracterização dos subtipos tumorais no câncer de mama, uma vez que representa um método menos trabalhoso, sendo mais barato e acessível à população em relação à expressão gênica<sup>31,32,48</sup>.

Estudo realizado em 2012 por Bastien et al. comparou a classificação molecular através do método PAM50 com a imuno-histoquímica e a expressão dos genes ESR1, PGR e ERBB2 (genes do receptor de estrogênio, do receptor de

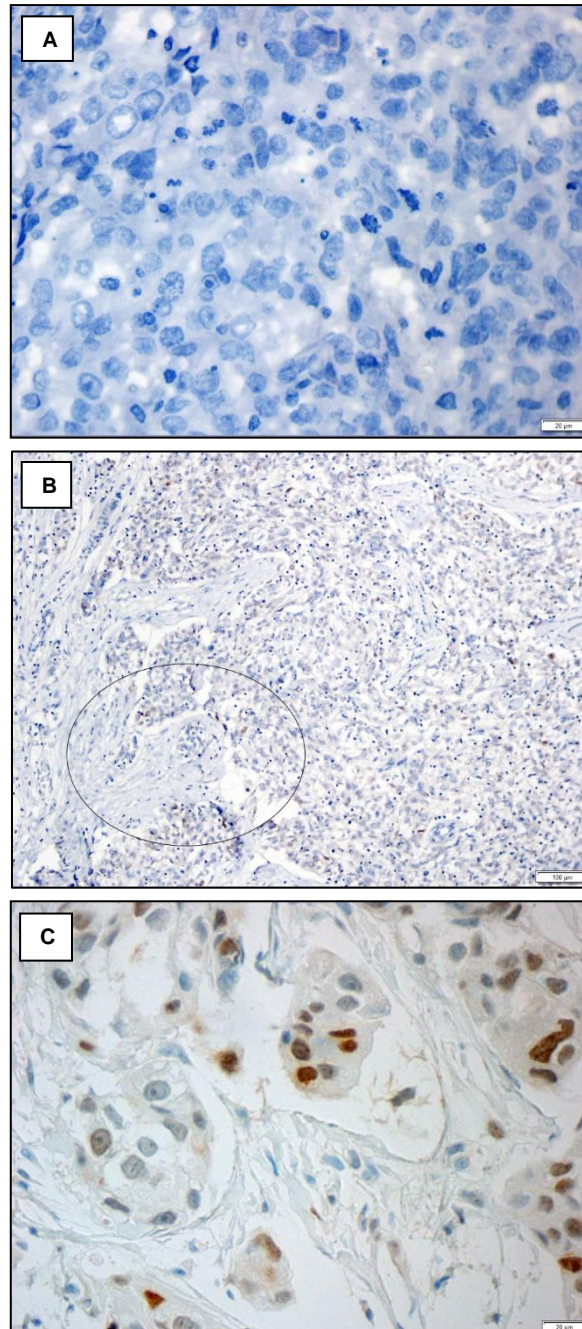


progesterona e do HER2, respectivamente). Nesse estudo observou-se alta correção molecular com a IHQ para os tumores luminais. Noventa e dois por cento dos tumores luminais (497/538) tiveram RE+ na IHQ e 99% tiveram scores intermediários e altos de ESR1. Também se constatou que os Luminais A expressaram mais frequentemente RP e PGR que os tumores Luminais B. Dos tumores basais, 90% (63/70) foram RE- e 96% apresentaram baixos níveis de ESR1. Oitenta e um por cento dos tumores basais foram triplo-negativos na IHQ e 86% apresentaram baixos escores para os três genes ESR1, PGR e ERBB2. Em relação ao subtipo HER2-enriquecido a correlação entre a classificação molecular e IHQ foi menor. Dos casos classificados na IHQ como HER2 isolado (RE-, RP-, HER2+), aproximadamente dois terços (69/113:61%) foram confirmados pela classificação molecular, e aproximadamente um terço (33%) foi classificado como Luminal B<sup>43</sup>.

A técnica de imuno-histoquímica permite a recuperação de antígenos (por exemplo: proteínas como os receptores hormonais) nos tecidos, utilizando-se do princípio da ligação específica de antígenos a anticorpos. Através de uma série de reações, será produzida uma coloração se houver a presença da proteína em estudo no material examinado. Os receptores de estrogênio e progesterona, quando presentes, devido sua localização, produzem coloração no núcleo da célula. Segundo a Sociedade Americana de Oncologia e o Colégio Americano de Patologistas (ASCO/CAP)<sup>49</sup>, tumores com 1% ou mais de células com núcleo corado são consideradas RE e/ou RP positivos e, portanto, passíveis de tratamento hormonal, embora tumores com mais de 10% de positividade apresentem melhor resposta à essa terapia<sup>50</sup>. Segundo ASCO/CAP tanto a porcentagem quanto a intensidade da coloração devem ser avaliadas, contribuindo assim para a avaliação

prognóstica. Amostras sem coloração detectada ou com menos de 1% dos núcleos corados são consideradas negativas, ao possuir um controle interno e/ou externo positivo (núcleos de tecido mamário não tumoral corados, por exemplo)<sup>49</sup> (figura 1).

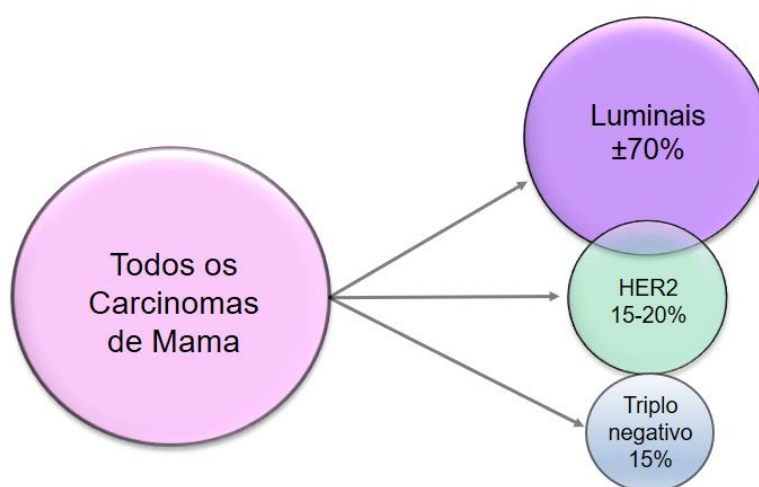
Figura 1 – Expressão dos Receptores Hormonais. A = RE ou RP negativo; B = RE ou RP positivos:  $\geq 1\%$ ; C = RE ou RP  $> 10\%$



Além dos receptores de estrogênio e progesterona, mais dois marcadores imuno-histoquímicos são analisados rotineiramente nos tumores de mama: o Ki67 e o HER2. O Ki 67 é um marcador de proliferação celular – positivo somente nas células em divisão, sendo considerado alto, quando observado em mais de 14% das células. O HER2 – receptor tipo 2 do fator de crescimento epidérmico humano – codificado pelo oncogene ERBB2, é uma proteína de membrana com importante papel no crescimento e desenvolvimento celular<sup>51</sup>.

Através da análise de RE, RP, Ki67 e HER2 subdividimos imuno-histoquimicamente o câncer de mama em: Luminal A, Luminal B, HER2 superexpresso e Triplo-negativo<sup>7,31,41</sup>(figura 2).

Figura 2 – Distribuição dos subtipos dos carcinomas mamários.



Os tumores Luminais têm origem nas células epiteliais diferenciadas dos lúmens ducto-lobulares. Os luminais A representam 30 a 40% dos casos, possuindo geralmente RE e RP em grande quantidade e ausência de expressão de HER2<sup>52</sup>. Possuem Ki67 baixo (<14%), sendo indolentes e bastante sensíveis à hormonioterapia. Apresentam sobrevida de 90% em cinco anos<sup>6</sup>. Já os luminais B,

provém de células com expressão de RE e/ou expressão de RP e com Ki67  $\geq$  14%. Geralmente são tumores com menor expressão de RE em relação aos luminais A e com baixa expressão de RP<sup>53</sup>. Esses tumores, que representam 20-30% dos carcinomas mamários, podem expressar o HER2, sendo então passíveis de tratamento com transtuzumab e tratamento hormonal, porém com resposta inferior à hormonioterapia, apresentando mais recidivas precoces, comparados aos tumores Luminais A<sup>52,54</sup>. Apresentam maior grau nuclear, menor expressão de genes de RE e maior expressão de genes de proliferação<sup>55,56</sup>. Por serem tumores mais agressivos, o acréscimo de quimioterapia ao tratamento pode trazer benefício na sobrevida<sup>42,57</sup>.

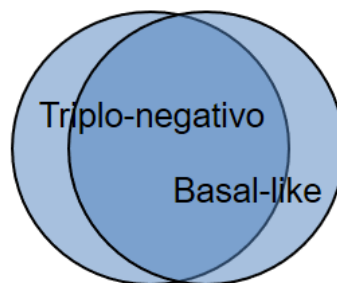
Os tumores HER2 enriquecidos têm superexpressão do receptor de HER2 e negatividade para os receptores hormonais. Representam em torno de 15% dos casos, sendo tumores maiores e que apresentam mais metástases linfonodais e potencial metastatizante que os luminais<sup>7</sup>. São alvos da terapia com o anticorpo monoclonal anti-HER2 (transtuzumab), o qual se liga ao domínio extracelular do receptor de HER2, bloqueando a sua ativação<sup>5,15</sup>. Esses tumores também são bastante sensíveis à quimioterapia citotóxica, sendo que o tratamento combinado anti-HER2 + quimioterapia tem melhorado os resultados dessas pacientes<sup>58</sup>.

Os tumores triplo-negativos na IHQ (em torno de 15% dos casos) apresentam negatividade de RE, RP e HER2 e representam um amplo espectro de neoplasias, sendo possível discriminá-las em diferentes formas genômicas<sup>7</sup>. Esses tumores surgem em idades mais precoces, são de comportamento mais agressivo, pouco diferenciados, com alta taxa de proliferação e mais frequentes metástases viscerais<sup>59,60</sup>. Não possuem terapia-alvo específica, porém são mais sensíveis à

quimioterapia que os tumores com receptores hormonais positivos<sup>15,61</sup>. Estudos têm mostrado que 21 a 45% das pacientes RE- alcançam resposta patológica complete (RPC) com a quimioterapia neoadjuvante contra 6 a 8% das pacientes com RE+<sup>60-64</sup>. Embora apresentem maiores taxas de RPC, os tumores RE negativo são tumores de mais difícil tratamento e associados a pior prognóstico, com sobrevida de 50 a 65% em 5 anos<sup>7,42,65</sup>.

Aproximadamente 70 a 80% dos tumores triplo-negativos à imuno-histoquímica são definidos como basal-like por DNA microarray e 80% dos carcinomas basais por DNA microarray apresentam fenótipo triplo-negativo pela imuno-histoquímica<sup>17,66,67</sup>(figura 3). Pelas fortes semelhanças entre eles, em grande parte das vezes, ambos são usados como sinônimos.

Figura 3 – Carcinomas triplo-negativos e basal-like.



Os tumores basal-like são assim chamados porque expressam genes e proteínas características das células basais/mioepiteliais da mama: citoqueratinas basais de alto peso molecular (CK5/6, CK14 e CK17), p-caderina, caveolinas 1 e 2, p-63 e EGFR (HER1)<sup>67</sup>.

Semelhantes aos tumores triplo-negativos, os tumores basal-like apresentam comportamento agressivo. Têm alto índice mitótico, com 65–100%

deles apresentando grau 3 da classificação de Nottingham<sup>16,68</sup>. São mais frequentes em mulheres jovens e negras do que os tumores luminais e estão associados a mutações do gene BRCA<sup>68,69</sup>. Esses tumores são mais comumente do tipo histológico não especial, sendo que carcinomas medulares, metaplásicos e adenoide-císticos são em sua maioria do subtipo basal triplo-negativo<sup>70-73</sup>. As metástases ocorrem mais frequentemente para pulmão e cérebro, raramente surgindo em sítios como ossos e fígado<sup>74,75</sup>. Altos níveis de expressão de EGFR e CK5/6 já foram associados a mais frequentes metástases para aqueles órgãos<sup>76</sup>. As recidivas são precoces, a maioria ocorrendo dentro dos primeiros 5 anos do diagnóstico, com pico entre o primeiro e terceiro ano<sup>7,77,78</sup>. Usualmente não respondem à hormonioterapia, uma vez que em grande parte das vezes apresentam negatividade para os receptores hormonais, assim como para o HER2<sup>5,6,16,79</sup>.

Estudos têm demonstrado que a utilização de dois marcadores em conjunto – EGFR e CK5 – apresenta boa acurácia para classificar pela imuno-histoquímica os tumores triplo-negativos como basal-like<sup>80,81</sup>. Em estudo realizado por Nielsen et al. (2004), a utilização de CK5/6 e EGFR apresentou 76% de sensibilidade e 100% de especificidade para detecção do subtipo basal-like em relação ao DNA microarray<sup>82</sup>. Posteriormente em 2008, Bhargava et al. demonstrou que o CK5 apresentou maior sensibilidade para identificar o subtipo basal do que o CK5/6 (95% X 59%, respectivamente), com especificidade maior que 95% para ambos. Tanto a porcentagem quanto a intensidade de coloração para os casos positivos foram mais altas para CK5 em comparação com CK5/6 ( $p=0,0001$ )<sup>80</sup>. O HER1 é um membro da família dos receptores transmembrana de fator de crescimento epidérmico, que incluem também HER2, HER3 e HER4 e está envolvido em diversas funções celulares como proliferação, diferenciação, motilidade, sobrevivida

e desenvolvimento tecidual<sup>83</sup>. Já o CK5 corresponde a citoqueratina 5 de alto peso molecular que compõe o citoesqueleto das células epiteliais basais, codificada pelo gene KRT5<sup>14</sup>. Estudos prévios associam tanto o EGFR quanto o CK5 como fatores de mau prognóstico<sup>84-86</sup>. Uma vez que estão expressos em níveis variados nos tumores basais (50-70%), a testagem dos dois marcadores apresenta maior acurácia diagnóstica, sendo considerados positivos com qualquer quantidade/intensidade de coloração<sup>16,70,79,82</sup>.

A nível molecular, podemos ainda encontrar de acordo com a expressão gênica os subtipos *normal-like*, *claudin-low* e molecular apócrino. A existência do subtipo *normal-like* é controversa, sendo que alguns autores afirmam que sua determinação pode ser apenas devido a contaminação de amostras com tecido normal<sup>78,87</sup>. O subtipo *claudin-low* representa em torno de 10% dos carcinomas de mama, sendo mais frequentemente triplo-negativo (80%). Apresenta baixa expressão de proteínas de junção celular como as claudinas 3, 4 e 7 e a E-caderina e superexpressão de marcadores de transição epitelial-mesenquimatoso, assim como células muito próximas hierarquicamente às primitivas células tronco-mamárias<sup>61</sup>. Esses tumores são de alto grau e de prognóstico reservado, apresentando curto intervalo livre de doença e menor sensibilidade à quimioterapia padrão, o que pode ser reflexo de suas propriedades mesenquimais<sup>43,59</sup>. O subtipo molecular apócrino foi descrito em 2005, chegando até 10% dos tumores triplo-negativos, porém não foi encontrado com frequência por outros autores<sup>7,88</sup>.

## 5. Hormonioterapia

Quando mencionamos receptores hormonais positivos ou negativos, estamos nos referindo à presença ou não de uma proteína capaz de se ligar aos hormônios no citoplasma das células e transportá-los ao núcleo, promovendo a transcrição de genes específicos, muitos dos quais codificam proteínas envolvidas no crescimento e na sobrevivência das células tumorais. O tratamento hormonal baseia-se na interrupção de um dos pontos dessa via<sup>9</sup>.

Em torno de 75% dos carcinomas de mama receptores hormonais positivos (RH+) respondem à hormonioterapia, enquanto que em pacientes cujos tumores não expressam RE e RP a resposta é baixa ou inexistente, não sendo candidatos a esse tratamento<sup>8,89-91</sup>.

A classe de drogas mais estudadas são os moduladores seletivos dos receptores de estrogênio (SERMs), com o Tamoxifeno sendo seu principal representante. Essas drogas, no tecido mamário, bloqueiam a ação dos hormônios, competindo com o estrogênio pela ligação ao seu receptor e exercendo função citostática<sup>10</sup>. Metanálise de 2011, conduzida pelo Early Breast Cancer Trialist's Collaborative Group (EBCTCG), mostrou que o uso de tamoxifeno durante 5 anos em pacientes RH+ reduz a taxa de recorrência anual em 50% e a taxa de mortalidade por câncer de mama em 30%<sup>92</sup>. Mais recentemente o estudo ATLAS mostrou que o uso prolongado da droga por 10 anos, associou-se à redução significativa do risco de recorrência e mortalidade em relação ao seu uso por 5 anos<sup>93</sup>. Essa droga, que age inibindo o crescimento das células tumorais no tecido mamário por antagonismo competitivo nos RE, atua também como agonista parcial em outros tecidos. Essa ação pode levar a efeitos maléficos, no tecido endometrial



e vascular, por exemplo, uma vez que aumenta a incidência de câncer de endométrio (Risco cumulativo de 1,6 % em 5 anos e de 3,1% em 10 anos) e eventos tromboembólicos (Risco cumulativo de 3,5% em 5 anos)<sup>93</sup>. Dentre seus efeitos adversos mais comuns, presentes em torno de 40% das pacientes, estão os fogachos, a secura e a secreção vaginal e a diminuição da libido<sup>92-94</sup>.

Outra classe de drogas, que apresenta resultados semelhantes ao tamoxifeno no tratamento do câncer de mama, são os Inibidores da Aromatase (IA)<sup>94</sup>. Os IA, dentre eles o anastrozol, o letrozol e o exemestano, são reservados para pacientes após a menopausa, quando a fonte de estrogênio provém de sua conversão periférica (a aromatase, enzima presente no tecido adiposo, pele, músculos, converte androgênios adrenais em estrogênios)<sup>95</sup>. Essas drogas, ao levarem o organismo a um estado hipoestrogênico importante, além de provocarem efeitos adversos semelhantes ao tamoxifeno, como exacerbação dos sintomas menopáusicos, estão associadas à dislipidemia, desordens musculoesqueléticas e desmineralização óssea. Queixas musculoesqueléticas foram reportadas em 35,6% das pacientes<sup>95-97</sup>. Em um ano de tratamento com inibidores da aromatase pode ocorrer diminuição de 2,6% da densidade mineral óssea (DMO) da coluna e 1,7% da DMO do quadril. A taxa de fraturas em 5 anos fica em torno de 6% contra 3,7% das pacientes que usam tamoxifeno<sup>94</sup>.

Dessa forma, apesar do resultado positivo da hormonioterapia no tratamento do câncer de mama, ela não é isenta de riscos e efeitos colaterais, sendo necessária uma criteriosa seleção das pacientes que se beneficiarão desse tratamento.

## 6. Receptores Hormonais e o Fenótipo RE-/RP+

O RE e o RP pertencem à família dos receptores nucleares que funcionam como fatores de transcrição quando acoplados aos seus ligantes – estrogênio e progesterona, respectivamente<sup>98</sup>.

O RE possui duas isoformas: RE $\alpha$  e RE $\beta$ , codificadas pelos genes ESR1 e ESR2, respectivamente. O estrogênio age através desses receptores tendo papel no desenvolvimento glandular e na morfogênese mamária e em diversos processos patológicos, incluindo proliferação celular, inibição da apoptose, invasão e angiogênese<sup>59</sup>. Os receptores alfa e beta se ligam ao estradiol na mesma extensão, porém evidências sugerem que eles se diferenciam na afinidade da ligação e também na resposta produzida. Os efeitos mitogênicos do estrogênio na mama são mediados através do RE $\alpha$ , sendo os antagonistas desse receptor efetivos no tratamento do câncer de mama<sup>99</sup>. A expressão do RE $\alpha$  é considerada um dos mais importantes biomarcadores do câncer de mama<sup>59</sup>. O papel do RE $\beta$  não está bem definido, sendo que sua expressão não é avaliada nos testes imuno-histoquímicos de rotina. Seu possível uso como alvo no tratamento do câncer de mama está sob investigação. Em estudo com a linhagem celular HC11 em camundongos, ao avaliar as respostas dos receptores de estrogênio alfa e beta a agonistas específicos, Helguero et al. (2005) observou que a ligação ao RE $\alpha$  estimulou a proliferação celular, enquanto que a ligação ao RE $\beta$  inibiu o crescimento celular e induziu a apoptose<sup>100</sup>. Estudo usando a linhagem celular MCF-7 que expressa somente RE-alfa mostrou que, após a introdução do RE-beta nas células, a ligação do estradiol promoveu um efeito inibitório na proliferação celular, ao prevenir a transcrição de genes c-myc, cyclin D1 e cyclin A e aumentando a expressão de p21

e p27 – enzimas supressoras tumorais<sup>8</sup>. Estudos sugerem que a isoforma beta pode ser um importante modulador das vias de sinalização do estrogênio nas células mamárias, podendo se comportar como modulador negativo do RE-alfa<sup>101</sup>. Especula-se, portanto, a presença do RE $\beta$  como um fator prognóstico positivo, podendo mesmo ser usado como ferramenta terapêutica.

O RP também possui duas isoformas, altamente homólogas, A e B, codificadas a partir de diferentes regiões do gene PGR, ambas sob controle estrogênico<sup>102</sup>. Através da ligação do estrogênio ao seu receptor ocorre estímulo gênico para a expressão do Receptor de Progesterona, via elemento estrogênio-responsivo localizado na região promotora do gene PGR. Dessa forma, a expressão do RP pode indicar uma via do RE funcional<sup>12,22,103</sup>.

O papel do RP nos tumores de mama é menos definido que o do receptor de estrogênio. A progesterona ao se ligar ao seu receptor exerce função paradoxal, com efeitos proliferativos e de diferenciação<sup>104</sup>. Estudo realizado em 2015 demonstrou que a progesterona e o RP afetam a ativação do RE-alfa, agindo como um freio na proliferação dos tumores RE positivos. Essa seria uma explicação para o comportamento mais agressivo de tumores com baixa ou nenhuma expressão de RP<sup>105</sup>.

O RP-B já foi associado a ausência de HER2 indicando um bom prognóstico, enquanto que o excesso de RP-A correlacionou-se com up-regulation de genes envolvidos na carcinogênese, com fenótipos pobremente diferenciados e com alto grau tumoral<sup>104,106</sup>. As duas isoformas do receptor estão geralmente expressas em níveis iguais nas células mamárias, sendo que os testes imuno-histoquímicos atuais detectam a quantidade total do RP, não diferenciando o RP-B do RP-A. Ao

avaliar separadamente a expressão desses receptores em tumores de mama, demonstrou-se que alta relação RP-A/RP-B reprime a função do RP-B e RE $\alpha$ , podendo causar resistência ao tamoxifeno e determinando menor sobrevida livre de doença<sup>106-108</sup>. A perda de expressão coordenada das isoformas do RP resulta não só na perturbação da sinalização do RP mas também pode ser indicativo de alteração da sinalização do RE<sup>107</sup>, podendo ser uma das explicações para o fenótipo RE-/RP+. Porém não há estudos confirmando essa hipótese.

Alguns pesquisadores alegam que, devido ao RP ser uma proteína dependente de estrogênio, sua expressão em tumores RE negativos representa um artefato técnico<sup>24,109</sup>.

Apesar de ser um método relativamente simples, a imuno-histoquímica tem certas particularidades, sendo que diversos fatores podem afetar o resultado do método, gerando resultados falso-positivos ou falso-negativos. O tempo de fixação do espécime, assim como o processo de recuperação do antígeno, que envolve a escolha de anticorpos e as reações imuno-histoquímicas propriamente ditas podem interferir na interpretação dos resultados<sup>9,58</sup>. Rhodes et al. (2001) em uma análise de dados de 66 laboratórios do Reino Unido identificou a eficiência do processo de recuperação de antígenos como o fator mais importante para a reprodutibilidade dos testes imuno-histoquímicos<sup>110</sup>. Estudo realizado em 2003 por Goldstein et al ressaltou o tempo de fixação do espécime como fator limitante para os resultados de coloração do RE, sendo que o curto tempo de fixação tem mais efeitos deletérios que a fixação prolongada<sup>111</sup>. Os receptores hormonais se degradam em tecidos não fixados, por isso a importância de uma fixação tecidual o mais breve possível (em até uma hora da retirada da amostra), em formalina 10%, com permanência por 6h

a 72h, sendo necessária a realização de cortes a cada 5mm em espécimes maiores, para a adequada fixação do tumor<sup>49</sup>.

O Guideline da ASCO/CAP de 2010 apresenta diversas recomendações que devem ser seguidas pelos laboratórios de patologia para manter a qualidade do exame imuno-histoquímico. Tais recomendações envolvem questões técnicas e de análise dos resultados. Para excluir os resultados falso-negativos de RE e falso-positivos de RP, uma das orientações do Guideline é a repetição do teste em nova amostra quando espécimes apresentam RE- e RP+<sup>49</sup>.

Outra explicação para a ocorrência desse fenótipo seria a heterogeneidade tumoral. Há a heterogeneidade intertumoral, em que cada tumor apresenta uma combinação única de alterações genômicas e também a heterogeneidade intratumoral, em que cada tumor é composto por células com diferentes características moleculares. A iniciação tumoral tem origem em uma célula (clone celular), a qual pode sofrer diversas mutações, influências epigenética e do microambiente tumoral, determinando áreas intratumorais (subclones) biologicamente diferentes<sup>42,112</sup>. Isso resulta em diversidade fenotípica dentro do mesmo tumor. Dessa forma, por exemplo, tumores considerados RP+ podem ter porções RP negativas, assim como em um mesmo tumor podem ocorrer áreas RE- e partes RE+, de tal modo que o fenótipo imuno-histoquímico possa ser misto e não uniforme. A heterogeneidade intratumoral dos receptores de progesterona tem sido identificada com maior frequência do que para os receptores de estrogênio através da técnica de microarray (28,9% x 8,8%, respectivamente)<sup>113</sup>. Isto é particularmente importante devido a observações de que áreas distintas de um tumor podem resultar em perfis de expressão gênica distintos<sup>114</sup>. À imuno-histoquímica, a

observação de 5497 biópsias de tumores de mama, mostrou que em 92% dos casos de RE+ a coloração foi uniforme e difusa. Os 8% restantes, tiveram RE+ focalmente, principalmente devido fixação inadequada. Já nos tumores com RP+, a reação foi focal e heterogênea em 21% dos casos, não relacionada com problemas de fixação da amostra<sup>115</sup>.

Apesar de pesquisadores sugerirem que o fenótipo RE- e RP+ não exista, recentemente tem se demonstrado que existe uma categoria de tumores que tem apenas expressão de RP<sup>21</sup>. YU e colaboradores, em 2015, observaram que a maioria dos tumores RE negativo e RP positivo (71%) mostraram baixos níveis de RNAm de ESR1, mas níveis variáveis de RNAm de PGR, indicando a existência desse fenótipo<sup>28</sup>. Estudo, realizado em 2016 por Schroth et al, avaliando a expressão gênica através de PAM50 de tumores com fenótipo RE-/RP+ demonstrou a expressão de 59 genes somente expressos nesse subtipo<sup>23</sup>. Além disto, foi detectada uma linhagem celular de câncer de mama, a ESVA-T, que apresenta este fenótipo<sup>116</sup>. Uma variante das células dos tumores mamários T47-D, também já foi relatada por possuir altos níveis de receptores de progesterona apesar da resistência ao estrogênio e anti-estrogênios. Nesse estudo os níveis de RP não foram influenciados pela presença de estrogênio, o que pode indicar a existência de um mecanismo de regulação do RP independente do RE<sup>117</sup>. Peptídeos extracelulares por reação cruzada poderiam ativar os receptores esteroides. Fatores de crescimento como o IGF-I (insulin-like growth factor I) já foram associados a ativação de elementos transcricionais responsivos ao estrogênio em células de adenocarcinoma ovariano<sup>118</sup>.

Em contrapartida aos receptores nucleares, foi observado também que existem discretas quantidades de receptores de estrogênio fora do núcleo celular, os quais não são reconhecidos pelos métodos imuno-histoquímicos clássicos. Existem fortes evidências da presença de RE na membrana plasmática, sendo também encontrada em organelas citoplasmáticas como mitocôndria e retículo endoplasmático<sup>119</sup>. Esses receptores de estrogênio ativam vias de sinalização de forma mais rápida. Estima-se que 5-10% do total celular de receptores de estrogênio estão na membrana plasmática de muitas células do organismo, como as vasculares endoteliais e do tecido mamário. Tanto RE alfa quanto beta podem ser encontrados, sendo que no tecido mamário foi encontrado predominância de receptores alfa. Estudo em neurônios hipotalâmicos do ventrículo medial identificou, pela primeira vez, indução do RP através de receptores estrogênicos localizados na membrana plasmática dessas células<sup>120</sup>. Sendo assim, a presença de receptores de estrogênio fora do núcleo, também poderia justificar o fenótipo RE-/RP+ detectado pelos métodos imuno-histoquímicos atuais.

## **7. Fatores preditivos e prognósticos e o Fenótipo RE-/RP+**

A determinação dos receptores hormonais no câncer de mama fornece informações preditivas e prognósticas. O fator preditivo se refere à capacidade de informar a resposta a determinado tipo de tratamento, ou seja, tumores que expressem positividade de receptores hormonais são passíveis de tratamento hormonal. O fator prognóstico, por sua vez, prediz o risco de recidiva ou morte devido ao câncer de mama, independente do tratamento empregado. São conhecidos como fatores de mau prognóstico no câncer de mama: idade inferior a

35 anos, tumores maiores que 2cm, invasão de linfonodos axilares, invasão linfovascular, alto grau histológico, ausência de receptores hormonais e superexpressão de HER2<sup>51,121</sup>.

Considerando os demais fatores prognósticos, além do TNM (tamanho tumoral, envolvimento axilar e metástases), e o avanço da biologia molecular, o American Joint Commission on Cancer TNM Anatomic Stage Group, na sua oitava edição publicada em 2017, incorporou a avaliação de biomarcadores e de painéis multigênicos no seu Sistema de Estadiamento. Com o objetivo de refinar as informações prognósticas e melhorar a seleção terapêutica foram incorporados o status dos RE, RP e HER2 e o grau nuclear. Além disso, em casos selecionados e que possuem acesso ao exame, os painéis multigênicos ganharam destaque. Recomenda-se a avaliação da expressão gênica somente após o conhecimento do RE, RP e HER2 em pacientes em que se pode haver downstaging e, portanto, não necessitem de tratamento quimioterápico. Por exemplo, pacientes T2N0, RE positivo e HER2 negativo podem passar de estagio II para I, se apresentarem baixo risco no teste Oncotype Dx. Esse downstaging é embasado pelo baixo risco de recorrência em 5 anos<sup>122</sup>.

A presença de RE+ é um fator preditivo para terapia hormonal e um marcador de bom prognóstico. Indica tumores menos agressivos, com melhor sobrevida global e livre de doença em 5 anos comparados aos tumores RE-<sup>8</sup>. Os tumores que apresentam receptores hormonais são mais comuns em pacientes mais velhas e na pós-menopausa, com tendência a serem mais bem diferenciados histologicamente, com menor grau nuclear e de proliferação celular e com menor chance de mutação ou superexpressão de genes de mau prognóstico (TP53,



ERBB2 e EGFR)<sup>123</sup>. Por serem tumores mais indolentes e de crescimento lento, tem menor potencial metastático, sendo que ao apresentar recidivas, geralmente são tardias. As recidivas tardias associadas aos tumores luminais podem ocorrer por alterações nas vias de sinalização dos receptores hormonais durante a evolução da doença, causando resistência à hormonioterapia<sup>8,105,106</sup>.

A presença do receptor de progesterona como valor prognóstico independente permanece controversa<sup>24,92</sup>. Entretanto, alguns estudos mostram que tumores com somente um receptor hormonal positivo apresentam comportamentos diversos daqueles que expressam os dois receptores<sup>20,29,124-127</sup>. Foi demonstrado que em pacientes com tumores RE+, a negatividade para o RP está associada a subtipos mais agressivos, com mais alterações nas cópias DNA e com associação com vias oncogênicas de sinalização de fatores de crescimento como a PI3K/Akt/mTOR<sup>128</sup>. Tanto a negatividade quanto a fraca positividade para RP (1-19%) associam-se a características de pior prognóstico, como comprometimento linfonodal, grau, tamanho tumoral e índice de proliferação<sup>128</sup>. Prat et al. (2013) demonstrou que tumores RE+ com mais de 20% de positividade para RP apresentam maior sobrevida, sugerindo que tumores com  $\leq 19\%$  de positividade para RP sejam classificados com luminais B<sup>52</sup>. Essa classificação foi adotada no 13º Consenso de St Gallen (Conferência internacional de especialistas em Câncer de mama realizada em St Gallen em 2013)<sup>13</sup>. Rakha e colaboradores mostram que em pacientes com RE+/RP- e linfonodo sentinela negativo, a ausência do receptor de progesterona foi o único preditor de recorrência e menor sobrevida<sup>22</sup>.

A perda do RP em um câncer de mama RE positivo, portanto, identifica um subgrupo de tumores com uma via RE deficiente, que, apresenta menor resposta

ao tratamento de bloqueio hormonal<sup>22,92</sup>. Em uma publicação de 2013, ao se avaliar a expressão do mRNA do RP em tumores RE+, verificou-se que expressão do RP é fortemente dependente do RE e que em tumores RE-, sua expressão foi extremamente baixa ou ausente<sup>24</sup>.

Estudos prévios reportam o fenótipo RE-/RP+ apresentando características clínico-patológicas intermediárias entre os tumores Luminais e os tumores Triplo-negativos<sup>20,27,126,130,131</sup>. Schroth et al. (2016) demonstrou que componentes-chave da expressão de RE como os genes ESR1 e GATA3 apresentam upregulation nos tumores RE-/RP+ em relação aos triplos negativos, enquanto que apresentam down-regulation em relação aos tumores com ambos receptores positivos<sup>23</sup>.

Geralmente tumores RE-/RP+ estão presentes em pacientes mais jovens e apresentam maior grau tumoral, sendo menos diferenciados em relação aos RE+/RP+<sup>20,25,126</sup>. Esse fenótipo já foi associado também a biomarcadores de pior prognóstico como a expressão positiva de p53 e de citoqueratinas basais, a redução da expressão de E-caderina e a expressão de c-erbB3(HER3)<sup>22,103</sup>. Apresentam pobre resposta à hormonioterapia, exibindo recidivas mais precoces do que tumores RE+/RP+<sup>23,124</sup>. Comparados aos tumores com ambos receptores positivos, os tumores RE-/RP+ foram associados a maiores taxas recorrência locais e à distância e a maiores taxas de mortalidade, semelhantes aos tumores triplo-negativos<sup>22,26,124,116</sup>.

Uma vez que apresentam comportamento clínico diverso daqueles com receptores estrogênicos positivos e, na maioria das vezes, comportam-se como triplo-negativos<sup>23,29,92,127</sup>, a categorização dos tumores que expressam somente receptores de progesterona em um dos subtipos é incerta. Como apresentam

positividade para um dos receptores hormonais, a hormonioterapia ainda é utilizada, porém com resposta inferior àqueles com ambos receptores positivos<sup>8,25,26,103</sup>.

Estudos prévios que avaliaram a distribuição molecular do câncer de mama através do PAM50 reportaram de 20 a 30% de perfil luminal e de 53 a 65% de perfil basal entre os tumores RE-/RP+ na IHQ<sup>23,28,29</sup>.

Estudo de Yu e colaboradores (2015) avaliou tumores com fenótipo RE negativo e RP positivo em relação ao comportamento biológico e à expressão gênica, utilizando o teste genético PAM 50. Este estudo demonstrou a presença de 60% de tumores com comportamento triplo-negativo basal-like e 30% luminal-like. Quando avaliada a expressão dos genes TFF1, CK5 (KRT5) e EGFR observou-se que sua combinação foi estatisticamente significativa para discriminar tumores com perfil luminal daqueles com perfil basal ( $p=0,005$ ). A realização de imuno-histoquímica dos três marcadores – TFF1, CK5 e EGFR, também apresentou correspondência com a classificação molecular na categorização dos tumores RE-/RP+. Em 64 casos, utilizando-se ponto de corte para TFF1 de 10% e qualquer intensidade para EGFR e CK5, foi encontrado 23% de tumores luminal-like e 63% de tumores basal-like. Os subtipos classificados por esses marcadores, após ajustes para fatores prognósticos como idade, tamanho tumoral, metástase linfonodal e grau, representaram um fator prognóstico independente para recidiva ( $p=0,017$ ), sendo que os tumores basal-like não apresentaram resposta à hormonioterapia<sup>28</sup>.

O TFF1 é uma proteína que estimula a migração celular, codificada pelo gene pS2<sup>132</sup>. O TFF1/pS2 é um gene responsivo ao estrogênio presente no tecido

mamário normal, cuja expressão está aumentada nos cânceres de mama RE+<sup>133,134</sup>. Foi encontrado sendo expresso em 40-70% dos carcinomas mamários, associado a expressão de RE<sup>135,136</sup>. Esse peptídeo foi descrito como o mais abundante RNAm induzido pelo estrogênio presente na linhagem celular do câncer de mama RE+: MCF-7<sup>134</sup>. Estudos relacionam a presença de TFF1 nas células com tumores mais diferenciados, com menor grau e tamanho tumoral e com melhor prognóstico<sup>137,138</sup>, especialmente em tumores sem metástase axilar<sup>139,140</sup>. Sua positividade também está associada à resposta ao tamoxifeno<sup>136,141,142</sup>. Por ser uma proteína estimulada pelo estrogênio, durante o tratamento de hormonioterapia observa-se queda de sua expressão, assim como observa-se aumento dos seus níveis em células mamárias durante o tratamento de reposição hormonal<sup>136</sup>. Como já foi descrito que a expressão do gene TFF1 pode ser regulada por outras substâncias como IGF-I, IGF-II, EGF e TGF<sup>143</sup>, para a detecção desse marcador sob influência do estrogênio, estudos utilizam diferentes pontos de corte, os quais variam de acordo com a técnica utilizada. Através da IHQ, coloração citoplasmática de TFF1 em 10% das células ou mais foi associada, por Yu et al (2015), a tumores luminais-like, independente do resultado de EGFR e CK5. Já a presença de qualquer expressão de CK5 e/ou EGFR em tumores com menos de 10% de TFF1, classificou tumores como basal-like<sup>28</sup> (figuras 3,4 e 5).

Figura 4 – TTF1 positivo = Exemplo de coloração citoplasmática >10% fraca.

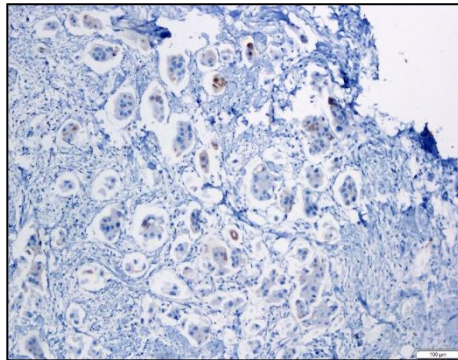


Figura 5 – CK5 = A: Negativo com controle interno positivo; B: Positivo com controle interno positivo.

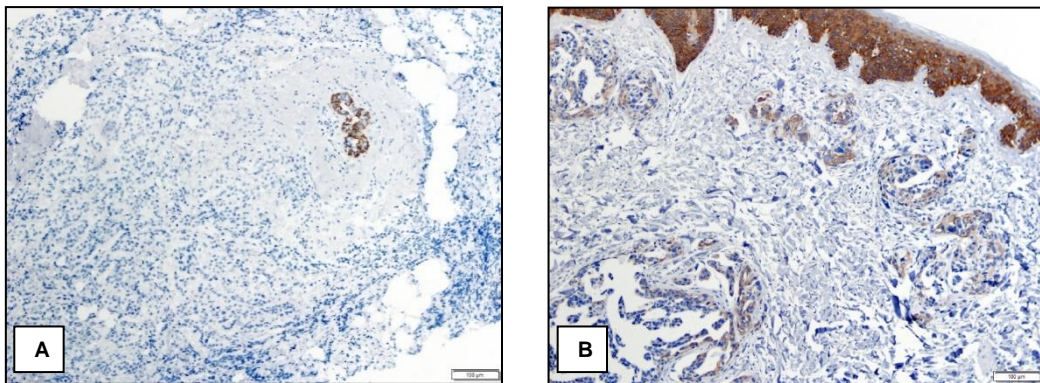
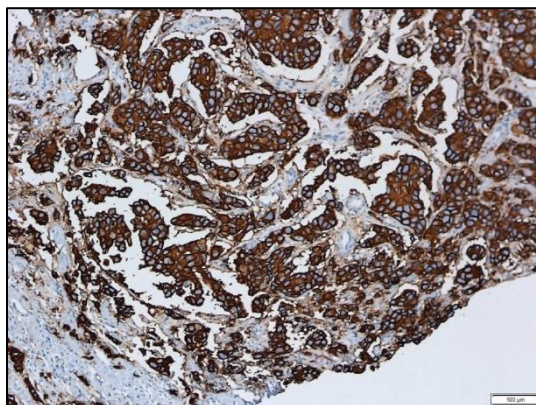


Figura 6 – EGFR positivo = Exemplo de coloração de membrana e citoplasmática 100% forte



## JUSTIFICATIVA

Os tumores RE-/RP+, apesar de raros, quando presentes geram dúvidas quanto a sua classificação e sua resposta terapêutica. Através da identificação de um perfil imuno-histoquímico, compatível com o perfil genômico, que não responda à terapia hormonal, evita-se o uso desnecessário desse tratamento, ou seja, o overtreatment. A reclassificação desse subtipo tumoral, pela imuno-histoquímica, técnica relativamente simples e barata, além de representar economia em termos financeiros, traz benefício para as pacientes com tumores de perfil triplo-negativo, ao evitar os riscos dos efeitos colaterais dessas drogas.

## **HIPÓTESES**

### **1. Hipóteses nulas**

A realização de imuno-histoquímica para TFF1, EGFR e CK5 não classifica a maioria dos tumores RE-/RP+ como triplo-negativos basal-like.

As características clínico-patológicas dos tumores RE-/RP+ não são semelhantes aos tumores triplo-negativos basal-like.

### **2. Hipóteses alternativas**

A realização de imuno-histoquímica para TFF1, EGFR e CK5 classifica a maioria dos tumores RE-/RP+ como triplo-negativos basal-like.

As características clínico-patológicas dos tumores RE-/RP+ são semelhantes aos tumores triplo-negativos basal-like.

## **OBJETIVOS**

### **1. Principais**

Verificar a frequência de tumores RE negativos e RP positivos a partir de dezembro de 2012, quando foi implementada a imuno-histoquímica automatizada BENCHMARK® no Laboratório de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), até dezembro de 2016.

Realizar imuno-histoquímica nos tumores RE negativos e RP positivos classificados com a técnica automatizada, com a utilização de três anticorpos TFF1, CK5 e EGFR, para identificação dos subgrupos com perfil imuno-histoquímico basal e luminal.

### **2. Secundários**

Correlacionar o perfil RE negativo e RP positivo com características clínico-patológicas: idade, raça, tipo histológico, grau tumoral, invasão linfovascular, índice proliferativo, tamanho tumoral e comprometimento linfonodal, tratamento realizado, resposta à quimioterapia neoadjuvante, sobrevida livre de doença e sobrevida específica por câncer de mama.



## REFERÊNCIAS

1. INCA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva, Rio de Janeiro. Available in <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016>.
2. Ferlay J, Soerjomataram I, Dikshit R et al. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. *Int J Cancer*. 2015;136:359-386.
3. Tao Z, Shi A, Lu C et al. Breast Cancer: Epidemiology and Etiology. *Cell Biochem Biophys*. 2015;72:333-338.
4. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature* 2000;406:747-752.
5. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011;5:5-23.
6. Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009;27:1160-1167.
7. Barros ACSD, Leite KRM. Classificação molecular dos carcinomas de mama: uma visão contemporânea. *Rev Bras Mastol*. 2015;25:146-155.
8. Kozakiewicz AMB, Patera J, Sobol M, Przybylski J. The role of oestrogen and progesterone receptors in breast cancer – immunohistochemical evaluation of

oestrogen and progesterone receptor expression in invasive breast cancer in women. *Contemp Oncol.* 2015;19:220-225.

9. Dowsett M & Miller W. Estrogen and progesterone receptor testins for prognosis and prediction. In: *Diseases of the Breast.* Harris J et al. Chapter 26.pg. 411. Wolters Kluwer, 2014.

10. Riggs, BL, Hartmann LC. Selective Estrogen-Receptor Modulators — Mechanisms of Action and Application to Clinical Practice. *N Engl J Med.* 2003;348:618-629.

11. Alrred DG. Issues and updates: evaluating estrogen receptor-a, progesterone receptor, and HER2 in breast cancer. *Mod Pathol.* 2010;23:S52-S59.

12. Chia SK, Bramwll VH, TU D et al. A 50-Gene Intrinsic Subtype Classifier for Prognosis and Prediction of Benefit from Adjuvant Tamoxifen. *Clin Cancer Res.* 2012;18:4465-4472.

13. Ahn HJ, Jung SJ, Kim Th et al. Differences in Clinical Outcomes between Luminal A and B Type Breast Cancers according to the St. Gallen Consensus 2013. *Ann Oncol.* 2015;26:1519-1520.

14. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology.* 2009;41:40-47.

15. Prat A, Pineda E, Adamo B et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015;24:26-35.

16. Livasy CA, Karaca G, Nanda R et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol.* 2006;19:264-271.

17. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008;123:236-240.
18. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Modern Pathology*. 2011;24:157-167.
19. Fan Y, Ding X, Xu B et al. A comparison Study of Estrogen Receptor Negative/Progesterone Receptor Positive/Her2 Negative Primary Breast Cancer With Triple Negative Breast Cancer. *Medicine*. 2015;94:1-7.
20. Ng CH, Pathy NB, Taib NA et al. Do Clinical Features and Survival of Single Hormone Receptor Positive Breast Cancers Differ from Double Hormone Receptor Positive Breast Cancers? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:7959-7964.
21. Ng CH, Pathy NB, Talb NA et al. The estrogen receptor negative-progesterone receptor positive breast carcinoma is a biological entity and not a technical artifact. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2012;13:1111-1113.
22. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol*. 2007;25:4772-4778.
23. Schroth W, Winter S, Bütter F et al. Clinical outcome and global gene expression data support the existence of the estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive invasive breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;155:85-97.

24. Heife MM, Hu R, Knoblauch N et al. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Research* 2013;15:R68.
25. Yu KD, Di GH, Wu J et al. Breast cancer patients with estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive tumors: being younger and getting less benefit from adjuvante tamoxifen treatment. *J Cancder Res Clin Oncol.* 2008;134:1347-1354.
26. Ahmed SS, Thike AA, Zhang K et al. Clinicopathological characteristics of oestrogen receptor negative, progesterone receptor positive breast cancers: re-evaluating subsets within this group. *J Clin Pathol.* 2017;70:320-332.
27. Yang L-H, Tseng H-S, Lin C et al. Survival benefit of tamoxifen in estrogen receptor-negative and progesterone receptor-positive low grade breast cancer patients. *J Breast Cancer.* 2012;15:288-295.
28. Yu KD, Jiang YZ, Hao S and Shao JM. Molecular essence and endocrine responsiveness of estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive, and HER2- negative breast cancer. *BMC Medicine.* 2015;13:254-265.
29. Itoh M, Iwamoto T, Matsuoka J et al. Estrogen receptor (ER) mRNA expression and molecular subtype distribution in ER-negative/progesterone receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;143:403-409.
30. Kumar N, Patni P, Agarwal A et al. Prevalence of molecular subtypes of invasive breast cancer: A retrospective study. *Med J Armed Forces India.* 2015;71:254-258.

31. Park S, Koo JS, Kim MS et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21:50-7.
32. Tang P, Skinner KA, Hicks DG. Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn Mol Pathol*. 2009;18:125-32.
33. Ghoncheh M, Pournamdar Z, Salehiniya H. Incidence and Mortality and Epidemiology of Breast Cancer in the World. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2016;17:43-46.
34. DeSantis C, Ma J, Bryan L, Jemal A. Breast Cancer Statistics, 2013. *CA Cancer J Clin*. 2014;64:52-62.
35. Torre LA, Bray F, Siegel RL et al. Global cancer statistics, 2012. *CA Cancer J Clin*. 2015;65:87-108.
36. Noone AM, Cronin KA, Altekruse SF et al. Cancer incidence and survival trends by subtype using data from the Surveillance Epidemiology and End Results Program, 1992-2013. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2017;26:632-641.
37. Cecilio AP, Takakura ET, Jumes JJ. Breast cancer in Brazil: epidemiology and treatment challenges. *Breast Cancer: Targets and Therapy*. 2015;7:43-49.
38. Freitas-Junior R, Gonzaga CM, Freitas NM et al. Disparities in female breast cancer mortality rates in Brazil between 1980 and 2009. *Clinics*. 2012;67:731-737.
39. Lee BL, Liedke PE, Barrios CH et al. Breast cancer in Brazil: present status and future goals. *Lancet Oncol*. 2012;13:95-102.

40. Jeffrey SS, Fero MJ, Borresen DA et al. Expression array technology in the diagnosis and treatment of breast cancer. *Mol Interv.* 2002;2:101-109.
41. Sotiriou C, Wang P, Pusztai L. Gene-expression signatures in breast cancer. *New Engl J Med.* 2009;360:790-800.
42. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer Challenges for Personalized Medicine. *Am J Pathol.* 2013;183:1113-1124.
43. Bastien RR, Rodrigues-Lescure A, Ebbert MT et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics.* 2012;5:44.
44. Kumar R, Sharma A, Tiwari RK. Application of microarray in breast cancer: An overview. *J Pharm Bioallied Sci.* 2012;4:21-26.
45. Hayes DF. Clinical utility of genetic signatures in selecting adjuvant treatment: Risk stratification for early vs. late recurrences. *Breast.* 2015;24:S6-S10.
46. Rakha EA, Green AR. Molecular Classification of Breast Cancer: What Pathologist needs to Know. *Pathology.* 2017;49:111-119.
47. Rattani NS, Swift-Scanlan T. Deconstructing Breast Cancer Heterogeneity: Clinical Implications for Women With Basal-Like Tumors. *Oncol Nursing Forum.* 2014;41:639-646.
48. Van de Eynden GG, Van de Auwera I, Van Laere S et al. Validation of a tissue microarray to study differential protein expression in inflammatory and non-inflammatory breast cancer. *Breast C Res Treat.* 2004;85:13-22.

49. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/ American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:2784-95.
50. Owaga Y, Moriya T, Kato Y et al. Immunohistochemical assessment for estrogen receptor and progesterone receptor status in breast cancer: analysis for a cut-off point as the predictor for endocrine therapy. *Breast Cancer.* 2004;11:267-75.
51. Cheang MC, Chia SK, Voduc D et al. Ki67 index, HER2 status and prognosis in patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst.* 2009;101:736-750.
52. Prat A, Cheang MC, Martin M, et al. Prognostic significance of progesterone receptor-positive tumor cells within immunohistochemically defined luminal A breast cancer. *J Clin Oncol.* 2013;3:203-209.
53. LI Z, HU P, Tu J et al. Luminal B breast cancer: patterns of recurrence and clinical outcome. *Oncotarget.* 2016;7:65024-65033.
54. Tran B, Bedard PL. Luminal-B breast cancer and novel therapeutic targets. *Breast Cancer Research.* 2011;13:221.
55. Zong Y, Zhu L, Wu J et al. Progesterone Receptor Status and Ki-67 Index May Predict Early Relapse in Luminal B/HER2 Negative Breast Cancer Patients: A Retrospective Study. *PLoS One.* 2014;9(8):e95629.
56. Harbeck N, Thomssen C, Gnant M. St. Gallen 2013: brief preliminary summary of the consensus discussion. *Breast Care.* 2013;8:102-109.

57. Baselga J, Perez EA, Pienkowski T et al. Adjuvant trastuzumab: a milestone in the treatment of HER-2-positive early breast cancer. *Oncologist*. 2006;11:S4-12.
58. Carey LA. Breast Cancer: HER2 – a good addiction. *Nat Rev Clin Oncol*. 2012;9:196-197.
59. Abreu FB, Wells WA, Tsongalis GJ. The Emerging Role of the Molecular Diagnostics Laboratory in Breast Cancer Personalized Medicine. *Am J Pathol*. 2013;183:1075-1083.
60. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. 2006;59:729–735.
61. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5678-85.
62. Colleoni M, Viale G, Zahrieh D et al. Chemotherapy is more effective in patients with breast cancer not expressing steroid hormone receptors: a study of preoperative treatment. *Clin Cancer Res*. 2004;10:6622-6628.
63. Ring AE, Smith IE, Ashley S et al. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:2012-2017.
64. Carey LA, Dees EC, Sawyer L et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007;13:2329-2334.
65. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4429-4434.



66. Perou CM: Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2011;1:61-70.
67. Prat A, Adamo B, Cheang M et al. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triplenegative breast cancer. *Oncologist*. 2013;18:123-133.
68. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;113:411-22.
69. Millikan RC, Newman B, Tse CK et al. Epidemiology of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res and Treat*. 2008;109:123-139.
70. Haupt B, Ro JY, Schwartz MR. Basal-like breast carcinoma: a phenotypically distinct entity. *Arch Pathol Lab Med*. 2010;134:130-133.
71. Bertucci F, Finetti P, Cervera N et al. Gene expression profiling shows medullary breast cancer is a subgroup of basal breast cancers. *Cancer Res*. 2006;66:4636-4644.
72. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008;216:141-150.
73. Luini A, Aguilar M, Gatti G et al. Metaplastic carcinoma of the breast, an unusual disease with worse prognosis: the experience of the European Institute of Oncology and review of the literature. *Breast Cancer Res Treat*. 2007;101:349-353.
74. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R, et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol* 2010;28:3271–3277.

75. Smid M, Wang Y, Zhang Y, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res* 2008;68:3108-3114.
76. Kozakiewicz AMB and Budzik MP. Immunohistochemical characteristics of basal-like breast cancer. *Contemp Oncol (Pozn)*. 2016;20:436-443.
77. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK. Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. *PLoS Med*. 2010;25:7:e1000279.
78. Yersal O, Barutca S. Biological subtypes of breast cancer: Prognostic and therapeutic implications. *World J Clin Oncol*. 2014;5:412-424.
79. Kuroda N, Ohara M, Inoue K et al. The majority of triple-negative breast cancer may correspond to basal-like carcinoma, but triple-negative breast cancer is not identical to basal-like carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2009;42:128-131.
80. Bhargava R, Beriwal S, McManus K, Dabbs DJ. CK5 Is more sensitive than CK5/6 in identifying the “basal-like” phenotype of breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2008;130:724-730.
81. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C et al. Basal-Like Breast Cancer Defined by Five Biomarkers Has Superior Prognostic Value than Triple-Negative Phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008;14:1368-1376.
82. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004;10:5367-5374.

83. Yarden Y, Sliwkowski MX. Untangling the ErbB signalling network. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2001;2:127-37.
84. Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol* 2002;161:1991-1996.
85. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol.* 2004;203:661-671.
86. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast Cancer Res Treat.* 2009;116:317-328.
87. Goldhirsch A, Winer EP, Coates AS et al. Personalizing the treatment of women with early breast cancer: highlights of the St Gallen International Expert Consensus on the Primary Therapy of Early Breast Cancer 2013. *Ann Oncol.* 2013;24:2206-2223.
88. Farmer P, Bonnefoi H, Becette V et al. Identification of molecular apocrine breast tumours by microarray analysis. *Oncogene.* 2005;24:4660-4671.
89. Goussard J, Genot JY. What can be now expected of the determination of estrogen and progesterone receptors in the treatment of breast cancers. *Bull Cancer.* 1994;81:22-28.
90. Yamashita H, Yando Y, Nishio M et al. Immunohistochemical evaluation of hormone receptor status for predicting response to endocrine therapy in metastatic breast cancer. *Breast Cancer.* 2006;13:74-83.

91. Thorpe SM. Estrogen and progesterone receptor determinations in breast cancer. Technology, biology and clinical significance. *Acta Oncol.* 1988;27:1-19.
92. Davies C, Godwin J, Gray R et al. Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen patient-level meta-analysis of randomized trials. *Lancet.* 2011;378:771-784.
93. Davies C, Pan H, Godwin J et al. Long-term effects of continuing adjuvant tamoxifen to 10 years versus stopping at 5 years after diagnosis of estrogen receptor-positive breast cancer: ATLAS, a randomized trial. *The Lancet.* 2012; 381:805-816.
94. Baum M, Budzar AU, Cuzick J et al.: ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet.* 2002;359:2131-2139.
95. Smith IE, Dowsett M: Aromatase inhibitors in breast cancer. *N Engl J Med.* 2003; 348:2431-2442.
96. Regan MM, Neven P, Giobbie-Hurder A et al. Assessment of letrozole and tamoxifen alone and in sequence for postmenopausal women with steroid hormone receptor-positive breast cancer: the BIG 1-98 randomised clinical trial at 8.1 years median follow-up. *Lancet Oncol.* 2011;12:1101-1108.
97. Jakesz R, Greil R, Gnant M et al. Extended adjuvant therapy with anastrozole among postmenopausal breast cancer patients: results from the randomized Austrian Breast and Colorectal Cancer Study Group Trial 6a. *J Natl Cancer Inst.* 2007;99:1845-1853.

98. Grimm SL, Hartig SM, Edwards DP. Progesterone Receptor Signaling Mechanisms. *J Mol Biol.* 2016; 428:3831-3849.
99. Bièche I, Parfait B, Laurendeau I et al. Quantification of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  expression in sporadic breast cancer. *Oncogene* 2001; 20:8109-8115.
100. Helguero LA, Faulds MH, Gustafsson J-A, Haldosén L-A. Estrogen receptors  $\alpha$  (ER $\alpha$ ) and  $\beta$  (ER $\beta$ ) differentially regulate proliferation and apoptosis of the normal murine mammary epithelial cell line HC11. *Oncogene.* 2005;24:6605-6616.
101. Hayashi S-I, Eguchi H, Tanimoto K et al. The expression and function of estrogen receptor  $\alpha$  and  $\beta$  in human breast cancer and its clinical application. *Endocrine-Related. Cancer.* 2003;10:193-202.
102. Kastner P, Krust A, Turcotte B et al. Two distinct estrogen-regulated promoters generate transcripts encoding the two functionally different human progesterone receptor forms A and B. *EMBO J.* 1990;9:1603-1614.
103. Arpino G, Weiss H, Lee AV et al: Estrogen receptor-positive, progesterone receptor-negative breast cancer: Association with growth factor receptor expression and tamoxifen resistance. *J Natl Cancer Inst.* 2005;97:1254-1261.
104. Richer JK, Jacobsen BM, Manning NG et al. Differential Gene Regulation by two Progesterone Receptor Isoforms in Human Breast Cancer Cells. *The Journal of Biol Chemistry.* 2002;277:5209-5218.
105. Mohammed H, Russell A, Stark R et al. Progesterone receptor modulates ER $\alpha$  action in breast cancer. *Nature.* 2015;523:314-317.

106. Khan JÁ, Bellance C, Guiochon-Mantel A et al. Differential Regulation of Breast Cancer-Associated Genes by Progesterone Receptor Isoforms PRA and PRB in a New Bi-Inducible Breast Cancer Cell Line. *PLoS One*. 2012;7:e45993.
107. Hopp TA, Weiss HL, Hilsenbeck SG et al. Breast cancer patients with progesterone receptor PR-A-rich tumors have poorer disease-free survival rates. *Clin Cancer Res*. 2004;10:2751-2760.
108. Vegeto E, Shahbaz MM, Wen DX et al. Human progesterone receptor A form is a cell- and promoter-specific repressor of human progesterone receptor B function. *Mol Endocrinol*. 1993;7:1244-55.
109. Maeyer L, Limbergen EV, Nys K. Does Estrogen Receptor–Negative/Progesterone Receptor–Positive Breast Carcinoma Exist? *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26:335-336.
110. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ et al. Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in Europe: Documentation of poor reliability and identification of insufficient microwave antigen retrieval time as a major contributory element of unreliable assays. *Am J Clin Pathol*. 2001;115:44-58.
111. Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E et al: Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2003;120:86-92.

112. Allott EA, Geradts J, Sun X et al. Intratumoral heterogeneity as a source of discordance in breast cancer biomarker classification. *Breast Cancer Res.* 2016;18:68.
113. Torhorst J, Bucher C, Kononen J et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol.* 2001;159:2249-2256.
114. Garlinger M, Rowan AJ, Horswell S et al. Intratumor heterogeneity and branched evolution revealed by multiregion sequencing. *N Engl J Med.* 2012;366:883-92.
115. Nadji M, Gomez-Fernandez C, Ganjei-Azar P, Morales AR. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. *Am J Clin Pathol.* 2005;123:21-27.
116. Borrás M, Lacroix M, Legros N, Leclercq G. Estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive Evsa-T mammary tumor cells: a model for assessing the biological property of this peculiar phenotype of breast cancers. *Cancer Lett.* 1997;120:23-30.
117. Horwitz KB, Mockus MB, Lessey BA. Variant T47D human breast cancer cells with high progesterone-receptor levels despite estrogen and antiestrogen resistance. *Cell.* 1982;28:633-642.
118. Ignar-Torwbridge DM, Pimentel M, Parker MG et al. Peptide growth factors cross-talk with the estrogen receptor requires A/B domain and occurs independently of protein kinase C or estradiol. *Endocrinology.* 1996;137:1735-1744.

119. Levin ER. Plasma Membrane Estrogen Receptors. *Trends Endocrinol Metab.* 2009;20:477-482.
120. Sá SI, Pereira PA, Malikov V et al. Role of Plasma Membrane Estrogen Receptors in Mediating the Estrogen Induction of Progesterone Receptors in Hypothalamic Ventromedial Neurons. *J. Comp. Neurol.* 2014;522:298-307.
121. Brundred NJ. Prognostic and predictive factors in breast cancer. *Cancer Treat Ver.* 2001;27:137-42.
122. Giuliano AE, Connolly JL, Edge SB et al. Breast Cancer-Major Changes in the American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual. *CA Cancer J Clin.* 2017;67:290-303.
123. Dowsett M, Houghton J, Iden C et al. Benefit from adjuvant tamoxifen therapy in primary breast cancer patients according to estrogen receptor, progesterone receptor, EGF receptor and HER2 status. *Ann Oncol.* 2006;17:818-826.
124. Bae SY, Kim S, Lee JH et al. Poor prognosis of single hormone receptor-positive breast cancer: similar of triple-negative breast cancer. *BMC Cancer* 2015;5:138.
125. Purdie CA, Quinlan P, Jordan LB et al. Progesterone receptor expression is an independent prognostic variable in early breast cancer: a population-based study. *British Journal of Cancer.* 2014;110:565-572.
126. Park S, Park BW, Kim TH et al. Lack of Either Estrogen or Progesterone Receptor Expression Is Associated with Poor Survival Outcome among Luminal A Breast Cancer Subtype. *Ann Surg Oncol.* 2013;20:1505-1513.



127. Bardou VJ, Arpino G, Elledge RM et al. 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.* 2003;21:1973-1979.
128. Creighton CJ, Kent Osborne C, van de Vijver Mj et al. Molecular profiles of progesterone receptor loss in human breast tumors. *Breast Cancer Res Treat* 2009;114:287-299.
129. Li A, Zhou S, Li M, et al. Clinicopathologic Characteristics of Oestrogen Receptor-Positive/Progesterone Receptor-Negative/Her2-Negative Breast Cancer According to a Novel Definition of Negative Progesterone Receptor Status: A Large Population-Based Study from China. *PLOS One.* 2015;10:e0125067.
130. Chan M, Chang MC, González R, et al. Outcomes of Estrogen Receptor Negative and Progesterone Receptor Positive Breast Cancer. *PLoS One.* 2015; 10:e0132449.
131. Fan Y, Ding X, Xu B et al. Prognostic Significance of Single Progesterone Receptor Positivity – A Comparison Study of Estrogen Receptor Negative/Progesterone Receptor Positive/Her2 Negative Primary Breast Cancer. *Medicine.* 2015;94:46.
132. Prest SJ, May FEB and Westley BB. The estrogen-regulated protein TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells. *FASEB J.* 2002;16:592-594.
133. Delvenne CG, Winkler-Gol RA, Piccart MJ et al. Expression of c-erbB2, TGF-131 and pS2 Genes in Primary Human Breast Cancers. *Eur. J Cancer.* 1992. 1992;28:700-705.

134. Jakowlew SB, Breathnach R, Jeltsch JM, Masiakowski P, Chambon P: Sequence of the pS2 mRNA induced by estrogen in the human breast cancer cell line MCF-7. *Nucleic Acids Res.* 1984;12:2861-2878.
135. Soubeyran I, Wafflart J, Bonichon F et al. Immunohistochemical determination of pS2 in invasive breast carcinomas: a study on 942 cases. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;34:119-128.
136. Markicevic M, Dzodic R, Buta M et al. Trefoil Factor 1 in Early Breast Carcinoma: A Potencial Indicator of Clinical Outcome during the First 3 Years of Follow-Up. *Int J Med Sci.* 2014;11:663-673.
137. Surowiak P, Materna V, Gyorffy B et al. Multivariate analysis of oestrogen receptor alpha, pS2, metallothionein and CD24 expression in invasive breast cancers. *Br J Cancer.* 2006;95:339-346.
138. Stonelake PS, Baker PG, Gillespie WM. Steroid receptors, pS2 and cathepsin D in early clinically node-negative breast cancer. *Eur J Cancer.* 1994;30:5-11.
139. Corte MD, Tamargo F, Alvarez A et al. Cytosolic levels of TFF1/pS2 in breast cancer: Their relationship with clinical-pathological parameters and their prognostic significance. *Breast Cancer Res Treat.* 2006;96:63-72.
140. Zhou L, Yan T, Jiang Y et al. Prognostic and predictive value of TFF1 for adjuvant endocrine therapy in Chinese women with early ER positive breast cancer: Comparing aromatase inhibitors with tamoxifen. *The Breast.* 2011;20:15-20.
141. Elledge RM, Green S, Pugh R et al. 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*. 2000;89:111-117.

142. Spyrtos F, Andrieu C, Hacene K, et al. pS2 and response to adjuvant hormone therapy in primary breast cancer. *Br J Cancer*. 1994;69:394-397.

143. Nunez AM, Berry M, Imler JL, Chambon P. The 5' flanking region of the pS2 gene contains a complex enhancer region responsive to oestrogens, epidermal growth factor, a tumour promoter (TPA), the c-Ha-ras oncoprotein and the c-jun protein. *EMBO J*. 1989;8:823-829.

## ARTIGO EM INGLÊS\*

# FREQUENCY ANALYSIS AND IMMUNOHISTOCHEMICAL DETERMINATION OF ESTROGEN RECEPTOR-NEGATIVE AND PROGESTERONE RECEPTOR- POSITIVE BREAST CANCER

Rosana Pellin De Nardi<sup>1</sup>, Andréa Pires Souto Damin<sup>2</sup>

### Abstract

**Context:** The determination of estrogen receptors (ER) and progesterone receptors (PR) in breast cancer represents important prognostic and predictive tool of response to hormone therapy. The presence of PR-positive (+) in ER-negative (-) tumors is infrequent. Previous studies show that these tumors exhibit worse response to hormonal therapy compared to tumors with both positive receptors. The identification of ER-/PR+ tumors with traits of triple-negative tumors provides a better therapeutic selection, avoiding the unnecessary use of anti-hormone drugs.

---

<sup>1</sup> Médica. Mestranda do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brasil. E-mail: rpdnardi@gmail.com

<sup>2</sup> Médica. Professora do Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde: Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre (RS), Brasil. E-mail: adamin@hcpa.edu.br

\*Artigo para publicação na Revista *The Breast Journal*

**Material and methods:** Retrospective study which investigated immunohistochemical results from 1188 invasive breast carcinomas diagnosed between December 2012 and December 2016 at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre. The ER-/PR+/HER2 negative results were selected for specific immunohistochemistry (IHC) with TFF1, CK5 and EGFR antibodies, as well as for prevalence and clinicopathologic features. When available in a new sample, the immunohistochemistry for ER and PR was repeated.

**Results:** The ER-/PR+ phenotype was present in 3.19% of our sample. In 30 cases available for analysis, immunohistochemistry of TFF1, EGFR and CK5 classified 27 cases (90%) as basal-like triple-negative, one case as luminal-like (3.3%) and two cases as inconclusive (6.7%). When repeating immunohistochemistry for ER and PR in the available samples, 75% of the cases (12/16) were reclassified as ER- and PR-. Patients had clinicopathologic features similar to triple-negative tumors with early recurrences.

**Conclusions:** Despite the use of endocrine therapy for ER-/PR+ tumors, these tumors exhibit an aggressive behavior, resembling triple-negative tumors. An appropriate categorization of these tumors should be made to improve therapeutic planning. Therefore, in addition to the repetition of the IHC for RE and RP in a new sample, the accomplishment of IHC for TFF1, EGFR and CK5 is an important diagnostic tool.

**Keywords:** Breast cancer, Immunohistochemistry, Estrogen Receptor-negative and Progesterone Receptor-positive, Triple-negative, Basal-like.

## Introduction

Breast cancer is divided into 4 main groups by immunohistochemistry analysis for ER and PR, Ki67 and HER2: Luminal A, Luminal B, enriched-HER2 and Triple-negative<sup>1,2</sup>. This classification predicts the molecular classification based on gene expression profile, and since each group presents different clinical and prognostic features, it can guide therapeutic decisions<sup>1,3,4,5</sup>.

Luminal tumors present positivity in hormone receptors, with luminal A being classified as: ER-positive and PR-positive, HER2 negative, Ki67 < 14%; and Luminal B as: ER-positive and/or PR-positive, HER2 positive/negative, Ki67 ≥14%. Luminal tumors respond to hormone therapy, and there is better response and better prognosis for the Luminal A group as compared to the Luminal B one<sup>6,7</sup>. The other two groups, which have a worse prognosis in relation to the first two, are the HER2-positive, without the positivity in steroidal receptor, and triple-negative with ER, PR and HER2 negatives. Most of these group (70-80%) at the molecular level are represented by basal carcinomas<sup>8,9,10</sup>.

Even though ER-negative and PR-positive tumors, which account for 1 to 5%<sup>11-17</sup> of all breast cancer cases, are still classified as luminal and could be subject to hormone therapy, data suggest that they have worse response to this treatment as compared to ER-positive tumors, clinically resembling triple-negative tumors<sup>11,12,16,18,19</sup>. Itoh et al. (2014) have shown for the first time, through gene expression, that this group of tumors actually have a mixed behavior, since 65% of ER-negative and PR-positive tumors in this study were genetically basal triple-negative and 20% were luminal<sup>17</sup>. Recently, it has also been demonstrated through gene expression by PAM 50 that 60% of this subgroup of tumors have triple-

negative behavior, that is, with little response to hormonal therapy and a worse prognosis. An immunohistochemical method to evaluate three markers – TFF1, EGFR and CK5 – was developed in this study and that has been shown to be an independent prognostic factor for recurrence. TFF1 (Trefoil factor 1) immunohistochemical expression of 10% or more has been shown to be significantly associated to luminal-like molecular profile, whereas CK5 and/or EGFR expression in any amount was associated to the basal-like subtype<sup>16</sup>. TFF1 is an estrogen-dependent protein, and its expression in breast tumor cells is related to ER expression and response to hormone therapy<sup>20,21</sup>. EGFR or HER1 is a member of the family of transmembrane receptors of epidermal growth factor and it is involved in several cellular functions such as proliferation, differentiation, motility, survival and tissue development, and CK5 is part of the high molecular weight cytokeratins found in breast basal cells. These markers present variable expression in basal-like triple-negative tumors – 50% to 70% – and for this reason they are used together, with sensitivity to IHC = 76% and specificity = 100% regarding histogenetic classification<sup>8,9,22</sup>.

Our study assessed the prevalence of ER-negative and PR-positive tumors, determining by immunohistochemical expression of TFF1, EGFR and CK5 which of them have basal-like triple-negative behavior. Hence, we intend to contribute to a better selection of patients who will benefit from hormone-blocking therapy.

## **Material and methods**

### **Study population and patients**

We selected all cases with histopathological diagnosis of invasive breast carcinoma at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), in South of Brazil, between December 2012 and December 2016. The initial date refers to the beginning of the implementation of the automated system for performance of immunohistochemistry at the Pathology Laboratory of the HCPA.

All samples with ER-/PR+ immunohistochemical profile were included in the study. HER2-positive tumors were not included, because they represent a biologically distinct subgroup<sup>5</sup>. In the selected cases, immunohistochemistry of TFF1, EGFR and CK5 was performed. Tumors that showed positivity for TFF1, regardless of the outcome for EGFR and CK5, were classified as luminal-like. Those which did not present positive staining for TFF1, but showed positivity for EGFR and/or CK5 were considered basal-like triple negative. When the three markers were negative, the results were classified as inconclusive.

IHC was repeated in new sample, when available, according to the 2010 American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists (ASCO/CAP) Guideline recommendations<sup>22</sup>.

Clinicopathological features, such as age, race, histological type, tumor grade, lymphovascular invasion, tumor size and axillary involvement, percentage of Ki67, treatment, response to neoadjuvant chemotherapy and disease-free survival were assessed. The study began after the approval by the Committee of Ethics in Research from the HCPA (Approval Number: 1464984).



## **Immunohistochemical analysis**

Immunohistochemical reactions were performed on the automation platform Benchmark® ULTRA (Ventana Medical Systems, Tucson, Arizona). The samples were cut into 3µm and each slide received a positive control. Deparaffinization was performed with the equipment using reagent EZ PREP. The antigenic recovery was done with CC1 cap (cell conditioning 1), alkaline pH, for 64 minutes, at 95°C. The blocking of peroxidase was accomplished by using reagent Ultra View Universal DAB Inhibitor, from the detection system.

The sections were incubated for 4 minutes at 36°C in the ready-to-use anti-PR monoclonal antibody (clone 1E2, Ventana). In the ready-to-use anti-ER antibody (clone SP1, Roche) the incubation occurred for 16 minutes at 37°C. The cuts remained for 32 minutes at 37°C in the TFF1 antibody (clone EPR3972, Abcam) in a 1:800 dilution. As for the CK5 antibody (clone EP1601Y, Cell Marque) in a dilution of 1:50, it stayed for 32 minutes at 42°C, and in the ready-to-use EGFR antibody (clone 5B7, Roche), the slides remained for 16 minutes at 37°C.

Reactions were detected with the Ultra View Universal DAB detection kit, using the diaminobenzidine (DAB) chromogen from the kit. The slides were counterstained with Mayer hematoxylin, differentiated with bluing reagent (Li<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> + Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>), and examined after dehydration and assembly.

In ER-/PR+ tumors, the nuclear staining was considered positive for ER and/or PR in at least 1% of tumor cells of any intensity<sup>23</sup>. The cut-off point for TFF1 positivity was 10% of staining observed in the neoplastic cellular cytoplasm, as described by Yu et al<sup>16</sup>. The reaction was considered positive for CK5 and EGFR if ≥ 1% weak, moderate or strong staining on the cell membrane and/or cytoplasm

was observed<sup>22</sup>. The reading of the slides was made by a pathologist specialized in breast pathology.

### **Statistical Analysis**

The quantitative variables were described by mean and standard deviation or median and range between percentiles, and categorical variables by absolute and relative frequencies. The relation between categorical variables was assessed with Fisher's exact test. Medians were compared using Mann-Whitney test. To assess the association between numeric and ordinal variables, Spearman's correlation test was applied. Recurrence-free survival curves were estimated with the Kaplan-Meier method. To control for confounding factors, Poisson Regression analysis was applied. Relative Risk (RR) and a confidence interval of 95% were used as the effect measure. The significance level adopted was 5% ( $p \leq 0.05$ ) and the analyses were run in the SPSS program version 21.0.

### **Results**

From December 2012 to December 2016, 1188 cases of invasive breast carcinoma were selected. Thirty-eight cases had immunohistochemical results ER-/PR+, corresponding to a prevalence of 3.19%. Eight cases were excluded due to the unavailability of paraffin blocks for IHC. Immunohistochemistry for TFF1, EGFR and CK5 was performed in 30 cases. The samples were from core biopsy in 28 cases and from surgical specimen in 2 cases.

In 16 cases, immunohistochemistry for ER and PR was repeated in a new sample, 7 (23.3%) at diagnosis. The blocks from patients who underwent neoadjuvant chemotherapy were excluded. From the 16 cases (53.3%) where immunohistochemistry for ER and PR was repeated, 3 cases (18.7%) confirmed the ER-/PR+ phenotype, one case became ER+/PR+ (6.3%) and 12 were ER and PR negative (75%).

Figure 1 shows tumor classification after IHC of TFF1, CK5 and EGFR.

Clinicopathological features of the sample and treatment information can be found in table 1. Chemotherapy treatment, when it was performed, was based on anthracyclines and taxanes. There was loss in the follow-up of two patients right after diagnosis.

The average patient follow-up time was 27.7 months (lowest: 2.7, highest: 50). Two patients lost follow-up at 2.7 and 7 months, respectively, showing no recurrences in this period.

In total, 6 patients had recurrences (23.1%). Two patients had local recurrence ( $2/26 = 7,7\%$ ). One of them after 12.9 months and another after 12.7 months of follow-up. Out of the five patients that had systemic recurrence (19.2%), three of them were on the contralateral axillary, one of them in the lungs and the other in the lungs and in the central nervous system (CNS). The average time to total recurrence was 17.3 months and to systemic recurrence was 18.5 months (8; 8.4; 14; 24 and 38 months). The probability of disease-free survival at 3.1 years was 64% (Figure 2). In the assessed follow-up period, 3 patients died, only 2 due to breast cancer (7,4%).

In total, four patients (14.3%) had primary neoplasms in other places. The only patient with positive TFF1 presented endometrial and peritoneum cancer prior to the breast cancer diagnosis, with no recurrences. One patient developed lung cancer with metastasis in the CNS, another patient had squamous-cell carcinoma of uterine cervix and a patient at the time of diagnosis of breast cancer had melanoma with liver metastasis.

The percentage of stained nuclei and the intensity of staining for progesterone receptors in the 30 evaluated cases can be found in table 2. Most cases presented low staining percentage and intensity for PR. The percentage of nuclei stained by PR was not a prognostic factor ( $p=0.4$ ).

Two cases expressed staining for TFF1. One of them had a 5% staining and was therefore considered negative. The only case considered positive had a 10% staining for TFF1 and presented positivity for EGFR (85% weak) and negativity for CK5 (Figure 3). Twenty-eight cases expressed EGFR and/or CK5, and two cases were negative for all three markers.

In table 3, we present the clinicopathological features of the only tumor with TFF1+ and 3 tumors in which the repetition of the specimen confirmed ER- and PR+.

From the 6 cases of total recurrence, two of the systemic recurrences occurred in the two cases considered inconclusive, which was statistically significant, even after multivariate analysis (RR = 6,9; CI 95%: 2.4 -14;  $p=0.046$ ).

Recurrence had no statistically significant relation to age ( $p=0.18$ ), tumor size ( $p=0.35$ ), lymph node involvement ( $p=0.61$ ), tumor grade ( $p=1.00$ ) and lymphovascular invasion (ILV) ( $p=0.16$ ).

From the 27 cases of TFF1- and EGFR+ and/or CK5+, the EGFR presented positivity in 24 cases (88.9%) and the CK5 in 15 cases (55.6%). Both are positive in 44.4% of cases (Figure 3). Positivity for EGFR and CK5 was not related to prognosis ( $p=0.87$  and  $p=0.64$  respectively). Patients with tumors showing a higher number of cells with positive staining for EGFR and CK5 presented more recurrence, but these data were not statistically significant ( $p=0.1$  and  $p=0.058$  respectively).

When we only consider the 27 patients within the basal-like subtype, the complete pathologic response (CPR) rate was 44.4%. However, the complete pathologic response was not a prognostic factor in this study ( $p=1.00$ ).

Chemotherapy, hormone therapy or radiation therapy, whether associated or separate, were not related to recurrence ( $p>0.4$ ).

## **Discussion**

This study investigated the rare tumor phenotype ER-/PR+/HER2-, whose classification, prognosis and therapeutic response are unclear. In our series it was identified in 3.2% of invasive carcinomas, within the frequency of 1 to 5% found in the literature<sup>11-17</sup>.

Our study was the first to reproduce the immunohistochemical panel of TFF1, EGFR and CK5 proposed by Yu et al. (2015). We identified the triple negative

phenotype in 90% of cases. Yu et al. correlated the expression of genes TFF1, CK5 (KRT5) and EGFR through PAM 50 with immunohistochemistry in 64 patients, demonstrating that the combination of the three markers discriminates luminal-like from basal-like tumors<sup>16</sup>.

Since it is a rare subtype, since 2010 the ASCO/CAP has recommended that the immunohistochemistry be repeated in new samples for ER-/PR+ tumors<sup>23</sup>. In our study, it was repeated in 16 cases. In the other fourteen cases, either the paraffin blocks were not available, or the patients did not undergo surgery or neoadjuvant chemotherapy was performed. Neoadjuvant treatment can select tumors clones, modifying their phenotypes<sup>24</sup>. Most of the 16 cases showed both receptors negative (75%). The ER-/PR+ phenotype persisted in only 3 cases (18.7%), and one case became ER+ and PR+, precisely the same that presented TFF1+. In a 2017 publication, 267 tumors that had been classified as ER-/PR+ were analyzed, and the repetition of immunohistochemistry on tissue microarray also showed divergent results, with 34.4% of cases maintaining the same phenotype, 42.6% being reclassified as triple-negative and 20.6% presenting both receptors positive<sup>19</sup>.

In the results from the initial sample and the repetition of the specimen we only identified a disagreement among ER, with ER-negative in the biopsy and weakly positive in the specimen (ER 5% weak). Hodi et al. (2007), when assessing the status of ER in 338 tumors in biopsy and surgical specimen, found disagreement in only 1,2% of the cases, all of them with ER low positivity<sup>25</sup>. In another series, with 336 tumors, while there was a small discrepancy between ER and HER2 (1.8% and 1.2% respectively), there was a discrepancy of 13.3% for PR between biopsy and surgical specimen<sup>26</sup>.

The divergences noted above may be related to false-positive results for PR or false-negative results for ER. The detection of tumor markers through immunohistochemistry depends on several pre-analytical factors. Previous studies emphasize the antibody clone, the antigen retrieval process and the fixation quality of the sample as the most important factors for determining the immunohistochemical findings<sup>27,28</sup>. Another explanation for the disparity in the PR would be intratumoral heterogeneity. Tumor initiation begins in a cell clone, which suffers several mutations, epigenetic influences and influences from the tumor microenvironment, determining biologically different subclones, thus resulting in genotypic and phenotypic diversity within the same tumor<sup>29</sup>. Intratumoral heterogeneity for PR and ER has been identified in 28.9% and 8.8% of tumors, respectively<sup>30</sup>. When we analyzed the percentages of PR in ER-/PR+ cases, we noted that most of them had a small percentage of positive nuclear staining (< 20%), as well as low intensity. In the four cases in which the PR remained positive this percentage was too low (two cases 1% weak, one case 2% weak and one case 20% weak). The ER-/PR+ confirmed cases showed similar clinical characteristics of those triple-negative tumors, with a high recurrence rate among them (66.7%). Heife et al (2013), evaluating the expression of PR mRNA in ER+ tumors, observed that the PR expression is strongly dependent on ER, and in ER- tumors its expression was extremely low or absent<sup>15</sup>. In ER+ tumors, negative PR or < 20% is related to worse response to hormone therapy, and these tumors are already being classified as luminal B<sup>6,14</sup>.

Some authors who question the existence of the ER-/PR+ phenotype also question PR testing, since its clinical utility in ER-positive patients is still uncertain<sup>15,31</sup>, ER+ patients will receive hormone therapy regardless of the PR

status<sup>32</sup>. Studies comparing drugs used as hormone therapy have also failed to demonstrate specific drug association with the results from PR<sup>33</sup>. However, it is important to note that ER+ tumors with low PR rates fit in the luminal subtype B and, therefore, could help choose more aggressive adjuvant therapies<sup>34</sup>.

Other authors claim that this phenotype indeed exists. Yu et al. (2015), noted that the majority of ER-negative and PR-positive tumors (71%) showed low levels of ESR1 RNAm, but variable levels of PGR RNAm, indicating the existence of this phenotype<sup>16</sup>. A study evaluating gene expression of tumors with the ER-/PR+ phenotype using PAM50 demonstrated the expression of 59 genes that are only expressed in this subtype<sup>11</sup>. A breast cancer cell line, the ESVA-T, also present in meningiomas that feature this phenotype, was reported, indicating the existence of a mechanism for PR regulation that is independent from ER<sup>35</sup>.

The repetition of ER and PR in the only case that presented TFF1-positive ( $\geq 10\%$ ) showed that not only was the progesterone receptor positive (20%), but the estrogen receptor was also positive, albeit at low levels (5%), being classified as luminal-like. This tumor also expressed positivity for EGFR, showing worse prognosis factors such as size larger than 2 cm, lymph node involvement, grade 3 and high Ki67. The expression of EGFR, besides being present in triple-negative tumors, is related to luminal B tumors, which, compared to luminal A, have lower expression of ER and PR, higher tumor grade and proliferative index, and more aggressive phenotype<sup>3,6</sup>.

In this study we noted that EGFR presented positivity in the vast majority of cases (88.9%) and CK5 in 15 cases (55.6%). Previous studies show that both EGFR



and CK5 are factors for poor prognosis<sup>36,37</sup>. In our study, tumors that recur had higher expression of EGFR and CK5, but it was not statistically significant.

We noted that 60% of the patients received hormone therapy, which, as in most studies, was not associated with lower disease-free recurrence<sup>11,16,18,19</sup>. These patients were submitted to unnecessary treatment with potential risk of serious effects such as endometrial cancer and venous thromboembolic events for those with tamoxifen and osteoporosis for those with aromatase inhibitors<sup>38</sup>.

From the 27 basal-like cases, 24 were invasive ductal carcinomas, two cases were medullary carcinomas and one was metaplastic. The most common histological type in basal-like breast cancer (BLBC) is invasive ductal carcinoma<sup>39</sup> and medullary and metaplastic carcinomas, albeit rare, are mostly basal-like triple-negative tumors<sup>40</sup>. All cases presented very high Ki67 values, with only one case presenting a value < 14%. Sixty percent of cases presented grade 3, and the others, grade 2. These data correspond to the association of BLBC with high grade and high mitotic index tumors<sup>8</sup>. Lymph node involvement was identified in 38.5% of the cases, and tumor size had a median of 2.3 cm (0.6 to 5.8 cm), similar to a study conducted in 2012 by Dent et al<sup>41</sup>.

In our study, patients with basal-like profile showed 44.4% of PRC. However, these patients did not show better prognosis, as in previous studies, probably due to the small sample size (4 cases with PRC out of 9 patients who underwent neoadjuvant chemotherapy). Seventy to eighty per cent of triple-negative carcinomas respond to chemotherapy with anthracyclines and taxanes, showing higher rates of complete pathologic response compared to luminal tumors (21-45% x 7-8%, respectively)<sup>42,43</sup>.

According to the literature, basal tumors are present in younger women, compared to luminal tumors<sup>8,44</sup>. But in our study only 3 patients presented the disease before they were 40, with an average age of 57.2 years.

Three patients had metastasis in the lungs and one had metastasis in the CNS and no metastasis in other organs besides contralateral lymph nodes. BLBC are associated with metastasis in specific sites such as lungs and brain, with very rare metastasis in liver and bones<sup>45,46</sup>.

In our study we identified early recurrences, with most cases presenting recurrences after about one year of follow-up. Despite responding better to chemotherapy, basal-like tumors have a higher recurrence rate in the first 5 years. Dent et al. (2007) noticed that when compared to other phenotypes, patients with triple-negative tumors present recurrence peaks between 1 to 3 years after diagnosis<sup>41</sup>. Disease-free survival was 64% in 3.1 years, similar to data from the literature for basal-like tumors<sup>6,41</sup>.

Well-known prognostic factors for breast cancer such as tumor size, number of lymph nodes involved, tumor type and grade were not related to prognosis<sup>47</sup>. The presence of lymphovascular invasion was the factor that was most associated with recurrence risk ( $p= 0.1$ ). Homogeneity of the sample with regard to these characteristics, as well as sample size and follow-up time could justify these findings.

Two tumors were classified as having inconclusive outcomes because they were negative for the three markers that were assessed. Negative tumors for ER, PR, HER2, EGFR and CK5 are considered penta-negative at IHC and belong to the non-basal triple negative group<sup>2</sup>. One of these inconclusive cases had the positive

biopsy repeated for PR, showing to be a real case of ER-/PR+. This tumor appeared as an inflammatory carcinoma with systemic recurrence in less than 1 year and death 1.4 months after diagnosis. The other inconclusive case presented ER and PR negative at the repetition of the specimen and also had systemic recurrence in contralateral lymph nodes. Although they do not fit in the basal subtype, both presented recurrence, behaving like aggressive tumors.

Our study was the second to demonstrate that the definition of ER-/PR+ profile with immunohistochemistry panel of markers TFF1, EGFR and CK5 can represent a viable alternative to genetic testing, with lower costs and good sensitivity. The repetition of the IHC test in a new sample, even though it has a good correlation, often cannot be held due to lack of material available for further examination. Further studies are needed to better assess the technique.

## **Conclusions**

A better definition of the phenotypic profile of ER-/PR+ tumors represents an important tool for avoiding unnecessary hormone treatment in tumors that are resistant to this type of therapy.

## **References**

1. Park S, Koo JS, Kim MS et al. Characteristics and outcomes according to molecular subtypes of breast cancer as classified by a panel of four biomarkers using immunohistochemistry. *Breast*. 2012;21:50-57.

2. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK. Subtyping of Breast Cancer by Immunohistochemistry to Investigate a Relationship between Subtype and Short and Long Term Survival: A Collaborative Analysis of Data for 10,159 Cases from 12 Studies. *PLoS Med.* 2010;25:7:e1000279.
3. The Cancer Genome Atlas Network. Comprehensive molecular portraits of human breast tumours. *Nature.* 2012;490:61-70.
4. Tang P, Skinner KA, Hicks DG. Molecular classification of breast carcinomas by immunohistochemical analysis: are we ready? *Diagn Mol Pathol.* 2009;18:125-132.
5. Bastien RR, Rodríguez-Lescure A, Ebbert MT et al. PAM50 breast cancer subtyping by RT-qPCR and concordance with standard clinical molecular markers. *BMC Med Genomics.* 2012;5:44.
6. Ahn HJ, Jung SJ, Kim Th et al. Differences in Clinical Outcomes between Luminal A and B Type Breast Cancers according to the St. Gallen Consensus 2013. *J Breast Cancer.* 2015;18:149-159.
7. Prat A, Pineda E, Adamo B et al. Clinical implications of the intrinsic molecular subtypes of breast cancer. *Breast.* 2015;24:26-35.
8. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology.* 2009;41:40-47.
9. Prat A, Adamo B, Cheang M et al. Molecular characterization of basal-like and non-basal-like triple negative breast cancer. *Oncologist.* 2013;18:123-133.

10. Bertucci F, Finetti P, Cervera N et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008;123:236-240.
11. Schroth W, Winter S, Bütter F et al. Clinical outcome and global gene expression data support the existence of the estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive invasive breast cancer phenotype. *Breast Cancer Res Treat*. 2016;155:85-97.
12. Fan Y, Ding X, Xu B et al. A comparison Study of Estrogen Receptor Negative/Progesterone Receptor Positive/Her2 Negative Primary Breast Cancer With Triple Negative Breast Cancer. *Medicine*. 2015;94:1-7.
13. Ng CH, Pathy NB, Taib NA et al. Do Clinical Features and Survival of Single Hormone Receptor Positive Breast Cancers Differ from Double Hormone Receptor Positive Breast Cancers? *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15:7959-7964.
14. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, et al. Biologic and clinical characteristics of breast cancer with single hormone receptor positive phenotype. *J Clin Oncol*. 2007;25:4772-4778.
15. Heife MM, Hu R, Knoblauch N et al. Estrogen receptor negative/progesterone receptor positive breast cancer is not a reproducible subtype. *Breast Cancer Research*. 2013;15:R68.
16. Yu KD, Jiang YZ, Hao S and Shao JM. Molecular essence and endocrine responsiveness of estrogen receptor-negative, progesterone receptor-positive, and HER2- negative breast cancer. *BMC Medicine*. 2015;13:254-265.

17. Itoh M, Iwamoto T, Matsuoka J et al. Estrogen receptor (ER) mRNA expression and molecular subtype distribution in ER-negative/progesterone receptor-positive breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2014;143:403-409.
18. Bae SY, Kim S, Lee JH et al. Poor prognosis of single hormone receptor-positive breast cancer: similiar of triple-negative breast cancer. *BMC Cancer.* 2015;5:138.
19. Ahmed SS, Thike AA, Zhang K et al. Clinicopathological characteristics of oestrogen receptor negative, progesterone receptor positive breast cancers: re-evaluating subsets within this group. *J Clin Pathol.* 2017;70:320-332.
20. Spyrtos F, Andrieu C, Hacene K et al. pS2 and response to adjuvant hormone therapy in primary breast cancer. *Br J Cancer.* 1994;69:394-397.
21. Markicevic M, Dzodic R, Buta M et al. Trefoil Factor 1 in Early Breast Carcinoma: A Potencial Indicator of Clinical Outcome during the First 3 Years of Follow-Up. *Int J Med Sci.* 2014;11:663-673.
22. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2004;10:5367-5374.
23. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M et al. American Society of Clinical Oncology/ American Society of Clinical Oncology guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *J Clin Oncol.* 2010;28:2784-2795.
24. Dede DS, Gumuskaya B, Guler G et al. Evaluation of changes in biologic markers ER, PR, HER 2 and Ki-67 index in breast cancer with administration of

neoadjuvant dose dense doxorubicin, cyclophosphamide followed by paclitaxel chemotherapy. *J BUON*. 2013;18:366-371.

25. Hodi Z, Chakrabarti J, Lee AH et al: The reliability of assessment of oestrogen receptor expression on needle core biopsy specimens of invasive carcinomas of the breast. *J Clin Pathol*. 2007;60:299-302.

26. Arnedos M, Nerurkar A, Osin P et al: Discordance between core needle biopsy (CNB) and excisional biopsy (EB) for estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PgR) and HER2 status in early breast cancer (EBC). *Ann Oncol*. 2009;20:1948-1952.

27. Rhodes A, Jasani B, Balaton AJ et al: Study of interlaboratory reliability and reproducibility of estrogen and progesterone receptor assays in Europe: Documentation of poor reliability and identification of insufficient microwave antigen retrieval time as a major contributory element of unreliable assays. *Am J Clin Pathol*. 2011;115:44-58.

28. Goldstein NS, Ferkowicz M, Odish E et al: Minimum formalin fixation time for consistent estrogen receptor immunohistochemical staining of invasive breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2003;120:86-92.

29. Rivenbark AG, O'Connor SM, Coleman WB. Molecular and Cellular Heterogeneity in Breast Cancer Challenges for Personalized Medicine. *Am J Pathol*. 2013;183:1113-1124.

30. Torhorst J, Bucher C, Kononen J et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*. 2001;159:2249-2256.

31. Maeyer L, Limbergen EV, Nys K. Does Estrogen Receptor–Negative/Progesterone Receptor–Positive Breast Carcinoma Exist? *Journal of Clinical Oncology*. 2008;26:335-336.
32. Davies C, Godwin J, Gray R et al. Early Breast Cancer Trialists' Collaborative Group (EBCTCG). Relevance of breast cancer hormone receptors and other factors to the efficacy of adjuvant tamoxifen: patient-level meta-analysis of randomised trials. *Lancet*. 2011;15:771-784.
33. Mackey JR. Can quantifying hormone receptor levels guide the choice of adjuvant endocrine therapy for breast cancer? *J Clin Oncol*. 2011;29:1504-1506.
34. Viale G, Regan MM, Maiorano E et al: Chemoendocrine compared with endocrine adjuvant therapies for node-negative breast cancer: Predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors—An International Breast Cancer Study Group. *J Clin Oncol*. 2008;26:1404-1410.
35. Borrás M, Lacroix M, Legros N, Leclercq G. Estrogen receptor-negative/progesterone receptor-positive Evsa-T mammary tumor cells: a model for assessing the biological property of this peculiar phenotype of breast cancers. *Cancer Lett*. 1997;120:23-30.
36. Van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2002;161:1991-1996.
37. Viale G, Rotmensz N, Maisonneuve P et al. Invasive ductal carcinoma of the breast with the "triple-negative" phenotype: prognostic implications of EGFR immunoreactivity. *Breast Cancer Res Treat*. 2009;116:317-328.



38. Baum M, Budzar AU, Cuzick J et al.: ATAC Trialists' Group. Anastrozole alone or in combination with tamoxifen versus tamoxifen alone for adjuvant treatment of postmenopausal women with early breast cancer: first results of the ATAC randomised trial. *Lancet*. 2002;359:2131-2139.
39. Montagna E, Maisonneuve P, Rotmensz N et al. Heterogeneity of triple-negative breast cancer: histologic subtyping to inform the outcome. *Clin Breast Cancer*. 2013;13:31-39.
40. Weigelt B, Hurlings HM, Kreike B et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol*. 2008;216:141-150.
41. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007;13:4429-4434.
42. Ring AE, Smith IE, Ashley S et al. Oestrogen receptor status, pathological complete response and prognosis in patients receiving neoadjuvant chemotherapy for early breast cancer. *Br J Cancer*. 2004;91:2012-2017.
43. Rouzier R, Perou CM, Symmans WF et al. Breast cancer molecular subtypes respond differently to preoperative chemotherapy. *Clin Cancer Res*. 2005;11:5678-85.
44. Banerjee S, Reis-Filho JS, Ashley S, et al. Basal-like breast carcinomas: clinical outcome and response to chemotherapy. *J Clin Pathol*. 2006;59:729-735.
45. Kennecke H, Yerushalmi R, Woods R et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. *J Clin Oncol*. 2010;28:3271-3277.

46. Smid M, Wang Y, Zhang Y et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res.* 2008;68:3108-3014.

47. Parker JS, Mullins M, Cheang MC et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*, 2009;27:1160-1167.

## Legends – Tables and Figures

<b>Table 1</b> – Clinicopathological features of the sample and treatment performed.....	92
<b>Table 2</b> – Data from PR Immunohistochemistry.....	94
<b>Table 3</b> – Features of PR+ cases on repetead sample.....	95
<b>Figure 1</b> – Immunohistochemical Classification of ER-/PR+ cases.....	97
<b>Figure 2</b> – Kaplan-Meier Desease Free Survival Curve.....	98
<b>Figure 3</b> – Luminal-like and Basal-like Cases.....	99

**Table 1 – Clinicopathological features of the sample and treatment performed.**

<b>Variables</b>	<b>n=30 (%)</b>
Age (Years) – Mean $\pm$ SD	56,7 $\pm$ 12,5
Tumor Size (cm) – median (P25 – P75)	2,4 (1,8 – 3,8)
Lymph nodes (n=28) – n(%)	
N0	16 (57,1)
N1	7 (25,0)
N2	3 (10,7)
N3	2 (7,1)
Hystological subtype – n(%)	
IDC	27 (83,3)
Inflammatory	2 (6,7)
Medullar	2 (6,7)
Metaplastic	1 (3,3)
LVI – n(%)	
Yes	12 (40,0)
No	18 (60,0)
Hystological grade – n(%)	
2	11 (36,7)
3	19 (63,3)
Ki-67 (%) – mean $\pm$ SD	74,2 $\pm$ 19,6
<14%	1 (3,3)
$\geq$ 14%	29 (96,7)

**Table 1 – Clinicopathological features of the sample and treatment performed.**

<b>Variáveis</b>	<b>n=30 (%)</b>
<b>Surgical approach (n=29) – n(%)</b>	
No	3 (10,3)
BCS + SLN	9 (31,0)
BCS + ALND	6 (20,7)
Mastectomy + SLN	5 (17,3)
Mastectomy + ALND	6 (20,7)
<b>Radiotherapy (n=28) – n(%)</b>	
Yes	23 (82,1)
No	5 (17,9)
<b>Chemotherapy (n=28) – n(%)</b>	
Yes	20 (71,4)
Adjuvant	8 (40)
Neoadjuvant	11 (55)
Palliative	1 (5)
No	8 (28,6)
<b>CPR (n=11) – n(%)</b>	
Yes	4 (36,4)
No	7 (63,4)
<b>Hormonal Therapy (n=28) – n(%)</b>	
Yes	17 (60,7)
Tamoxifen	9 (52,9)
Anastrozole	8 (47,1)
No	11 (39,3)

**Table 1 – Legends:** SD - standard deviation; P – Percentile; IDC – Invasive ductal carcinoma; LVI – Lymphovascular invasion; BCS – Breast Conserving Surgery; SLN – Sentinela Lymph Node; ALND – Axillary Lymph Node Dissection; CPR – Complete Pathological Response.

**Table 2 – Data from PR Immunohistochemistry.**

<b>Variables</b>	<b>n=30 (%)</b>
PR biopsy – n(%)	
≥20%	10 (33,3)
<20%	20 (66,7%)
PR (%) – median (P25 – P75)	15 (5 – 22,5)
PR intensity – n(%)	
Weak	23 (76,7)
Moderate	6 (20,0)
Strong	1 (3,3%)

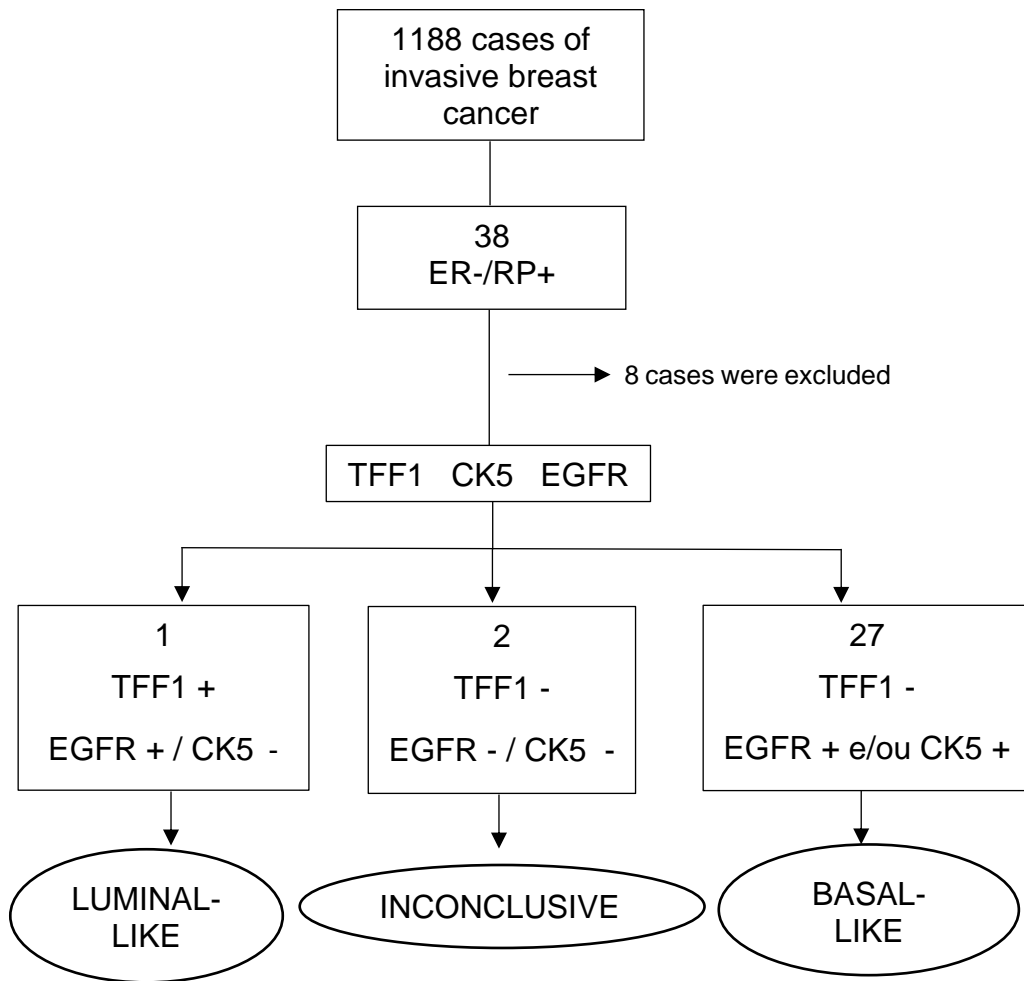
**Table 3 – Features of PR+ cases on repeated sample.**

Variables	Repetition with RP+			
	ER 5%	ER -	ER -	ER -
	PR 20%	PR 1%	PR 2%	PR 1%
PR (%) biopsy	40%	20%	80%	10%
TFF1	10%	5%	0	0
EGFR	85%	100%	100%	0
CK5	0	0	0	0
Tumor Subtype	Luminal	Basal	Basal	Inconclusive
Age (Years)	59	49	62	61
Tumor size (cm)	2,6	1,5	4	9
Lymph Node	N1	N0	N0	N3
Histological Type	IDC	IDC	IDC	IDC
LVI	No	No	No	Yes
Histological Grade	3	3	3	3
Ki-67 (%)	80	80	100	80
Surgery	3	3	3	4
Radiotherapy	Yes	No	No	Yes
Chemotherapy	1	2	2	1
CPR	Yes	-	-	No
Hormonal Therapy	Yes	No	Yes	No
Local Recurrence	No	Yes	No	No
Systemic Recurrence	No	No	No	Yes
Death	No	No	No	Yes

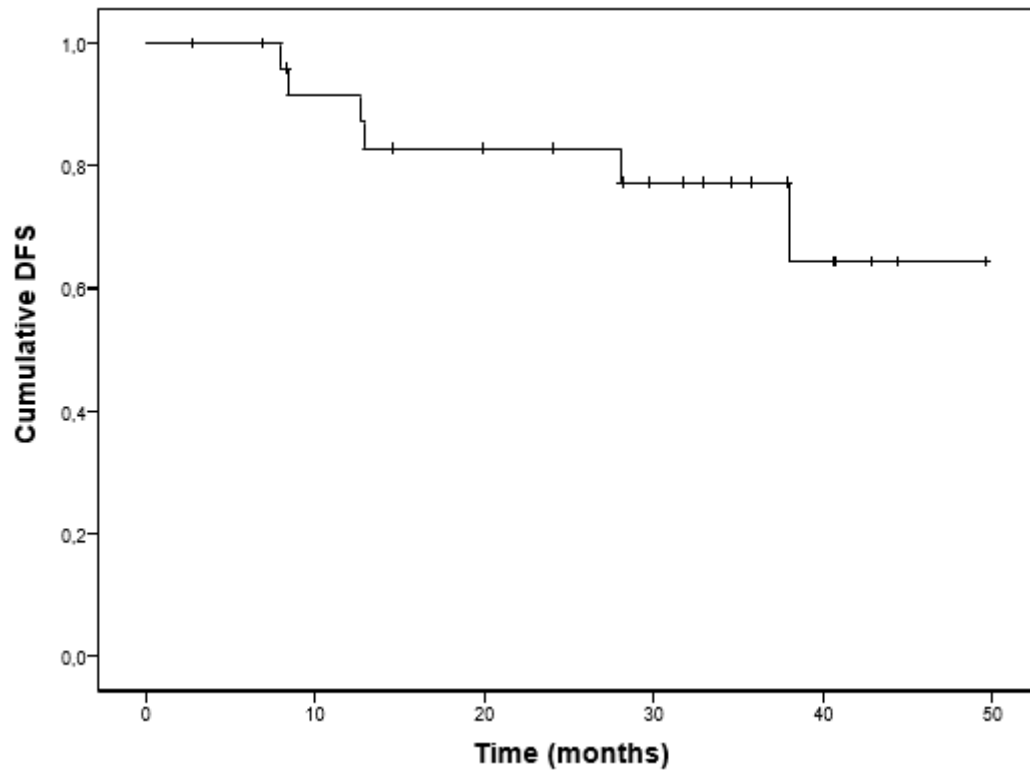
**Table 3 – Legends:** IDC – Invasive Ductal Carcinoma; LVI – Lymphovascular Invasion; Surgery – 3: Mastectomy and Sentinel Lymph Node/4: Mastectomy e Axillary Lymph Node Dissection; Chemotherapy – 1: neoadjuvant/2: adjuvant; CPR: complete pathological response.



**Figure 1 – Immunohistochemical Classification of ER-/PR+ cases.**

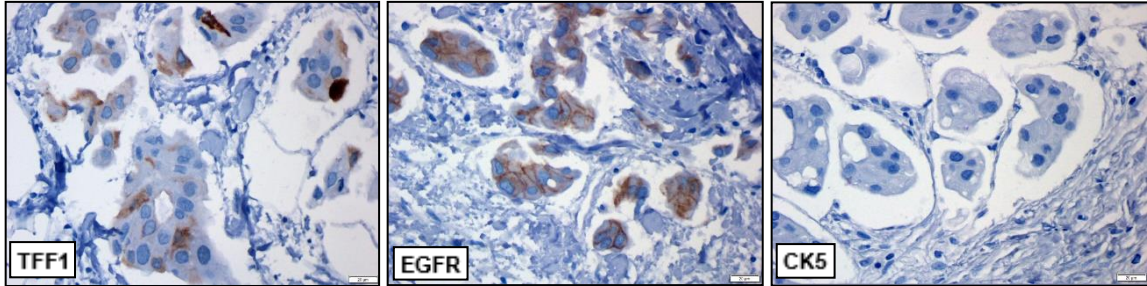


**Figure 2 – Kaplan-Meier Disease Free Survival Curve.**

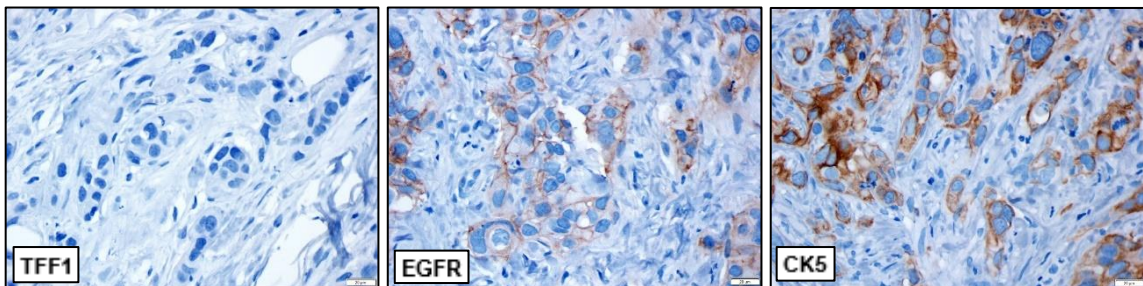


**Figura 3 – Luminal-like and Basal-like Cases.** A = Luminal-like Tumor: TFF1+, EGFR+, CK5-; B: Basal-like tumor: TFF1-, EGFR+, CK5+.

A



B



## CONSIDERAÇÕES FINAIS

A avaliação dos receptores hormonais de estrogênio e de progesterona tem sido realizada há mais de 40 anos, sendo que a positividade para o receptor de estrogênio é considerada como um forte indicador de resposta à terapia endócrina. O receptor de progesterona é reconhecido como uma proteína dependente de estrogênio. Pacientes RE+ com níveis baixos ou ausentes de expressão do receptor de progesterona apresentam pior resposta à hormonioterapia. Dessa forma a expressão de RP estaria relacionada a funcionalidade do receptor de estrogênio. Os tumores RE-RP+ à imuno-histoquímica em sua maioria apresentam baixos níveis de RP, corroborando com a hipótese de possuírem uma via de RE disfuncional. Esse raro fenótipo representa um desafio na prática clínica, uma vez que apresenta comportamento diverso dos tumores com ambos receptores positivos. Apesar de ainda serem alvo de terapias endócrinas, as observações de pior resposta clínica dos tumores RE-/RP+, vem questionando a indicação dessas drogas nesse subgrupo.

Diante desse resultado imuno-histoquímico, esforços devem ser realizados para uma melhor categorização desse subtipo tumoral e orientação terapêutica. Estudos avaliando o perfil de expressão gênica dividem esses tumores em luminal-like e basal-like, com uma maior porcentagem de tumores pertencendo ao último subtipo e, portanto, sem resposta ao tratamento hormonal. A avaliação histogenética, entretanto, é um teste caro, realizado por poucos laboratórios, sendo de difícil acesso à população. Dessa forma, a pesquisa de painéis imuno-histoquímicos que representem a classificação molecular ganha destaque. A

associação dos marcadores TFF1, EGFR e CK5 é o primeiro painel imuno-histoquímico descrito a mostrar correlação prognóstica em tumores RE-/RP+ e, portanto, constitui ferramenta importante no manejo dessas pacientes.

Nosso estudo, apesar de ter avaliado uma pequena amostra, apresenta resultados importantes que podem auxiliar na tomada de decisões. O perfil imuno-histoquímico triplo-negativo basal-like foi encontrado em 90% dos casos que realizaram imuno-histoquímica com TFF1, EGFR e CK5. Os dois casos considerados inconclusivos na avaliação dos três marcadores, ao se repetir o RE e RP, um deles apresentou RE e RP negativos e outro manteve RE negativo e RP em porcentagem muito baixa (2% fraco). Ambos tiveram um prognóstico reservado, apresentando recidivas. As características clínico-patológicas da amostra também foram a favor de tumores mais agressivos, uma vez que a maioria dos casos apresentou alto grau tumoral, altos índices de Ki67 e de invasão linfovascular, assim como altas porcentagens de expressão de EGFR e CK5 e recidivas precoces. O único caso considerado luminal-like foi categorizado como luminal-B e, portanto, mais agressivo e com pior resposta à hormonioterapia e melhor sensibilidade a quimioterapia, em relação aos tumores luminais A.

Provavelmente, o pequeno número de casos impossibilitou correlações com resultados estatisticamente significativos e como somente um caso apresentou perfil luminal-like, não conseguimos realizar comparação entre os grupos.

A repetição dos casos de RE-/RP+ em nova amostra, ao reclassificar 75% dos casos como triplo-negativos, também se destacou como uma estratégia importante. Apesar da recomendação do guideline da ASCO/CAP de 2010, essa conduta foi realizada em somente 7 casos à época do diagnóstico. Ressalta-se que

em pacientes submetidas à quimioterapia neoadjuvante a repetição deveria ser realizada em nova amostra anteriormente ao início do tratamento. Porém nova biópsia previamente à quimioterapia muitas vezes torna-se inviável.

Atenção especial a esse subtipo tumoral é necessária na prática clínica, a fim selecionarmos adequadamente as pacientes que se beneficiarão do tratamento hormonal e aquelas em que a quimioterapia terá um papel mais definido. Nesse sentido, a realização de imuno-histoquímica com os anticorpos TTF1, EGFR e CK5 representa um grande auxílio no manejo dessas pacientes.

Estudos englobando maior número de casos e seguimento a longo prazo devem ser incentivados para validar os nossos achados.

## PERSPECTIVAS

Diante dos resultados do nosso estudo e de acordo com a literatura prévia, fica evidente a necessidade de melhor caracterização dos tumores RE-/RP+.

Tanto a já preconizada repetição da imuno-histoquímica para RE e RP, quanto a utilização dos 3 marcadores empregados no nosso estudo mostram relevância no manejo dos tumores RE-/RP+. Os oncologistas podem se beneficiar com a realização desse teste na escolha da terapia empregada, abandonando na maioria dos casos a terapia endócrina de longa data.

Como o padrão-ouro para classificação desses tumores é a avaliação histogenética, o nosso próximo passo será realizar RT-PCR para identificação da expressão do ESR1, do ESR2 e PGR, correlacionando a expressão gênica com os resultados imuno-histoquímicos do nosso estudo.