

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS**

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM
CARCINOMAS MAMÁRIOS BASAIS E PENTANEGATIVOS - ESTUDO EM UMA
SÉRIE DE TUMORES TRIPLONEGATIVOS**

DIEGO DE MENDONÇA UCHÔA

**PORTO ALEGRE
2012**

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS EM
CARCINOMAS MAMÁRIOS BASAIS E PENTANEGATIVOS - ESTUDO EM UMA
SÉRIE DE TUMORES TRIPLONEGATIVOS**

DIEGO DE MENDONÇA UCHÔA

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, UFRGS, como requisito para obtenção do título de Doutor em Medicina: Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Albano Edelweiss

**PORTO ALEGRE
2012**

CIP - Catalogação na Publicação

Uchôa, Diego de Mendonça

EXPRESSÃO DE MARCADORES DE CÉLULAS-TRONCO TUMORAIS
EM CARCINOMAS MAMÁRIOS BASAIS E PENTANEGATIVOS -
ESTUDO EM UMA SÉRIE DE TUMORES TRIPLONEGATIVOS /
Diego de Mendonça Uchôa. -- 2012.
138 f.

Orientador: Edelweiss Maria Isabel Albano.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de Pós-
Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2012.

1. câncer de mama. 2. CD44. 3. CD24. 4. célula-
tronco. I. Maria Isabel Albano, Edelweiss, orient.
II. Título.

Dedico essa tese a todas as pacientes com câncer de mama que lutam bravamente pela vida e que se entregam confiantes à ciência médica.

AGRADECIMENTOS

Mesmo sem jamais ter pensado em desistir, nunca teria encontrado a luz do fim deste caminho sem a ajuda fundamental de cada um dos que abaixo merecem o meu mais profundo apreço.

A uma professora que conheci há alguns anos, ainda nos tempos da graduação, e que mais tarde, por essas coisas da vida, se tornaria minha colega patologista, orientadora e amiga. Professora Doutora Maria Isabel Albano Edelweiss, meu muito obrigado por nunca ter desistido, apesar das minhas várias recusas imaturas. Sem a sua perseverança em me iniciar na pesquisa, eu não teria chegado até aqui. No ocaso, a sua longa e plena vida acadêmica acende uma flama duradoura dentro de mim. Dizem que o verdadeiro professor nunca desiste do aluno e acredito que com ela e comigo tenha sido assim.

À colega e amiga, Professora Doutora Marcia Silveira Graudenz, pesquisadora experta, pelas ideias luminosas e fundamentais para a finalização deste trabalho, meu reconhecimento e admiração.

À colega e amiga, Doutora Carolina Rigatti Hartmann, cujo humor e determinação pessoal muitas vezes me renovaram o espírito, a certeza de ter me auxiliado na conclusão dessa etapa.

À nossa funcionária do Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Sra. Zeli Fogaça Pacheco, meu agradecimento especial pela amizade e auxílio na separação das lâminas e dos blocos de parafina desta tese.

Ao colega Doutor Ermani Cadore, a quem sutilmente conheci no decorrer desta pesquisa, e cuja humildade me fez sentir pequeno, a certeza de ter conhecido um homem verdadeiro.

À doutoranda Bruna Pellini Ferreira, agradeço a disponibilidade e a jovialidade, características vitais para o difícil trabalho de coleta dos dados.

Ao colega Doutor Clóvis Klock e a toda a equipe do Laboratório Medicina Diagnóstica, em especial ao biólogo Rudinei Paulo Barbieri Cella, meu reconhecimento e gratidão pelo preparo primoroso dos TMAs e de todas as lâminas histológicas, alicerces desta pesquisa.

Ao Sr. Clóvis de Souza Prates, funcionário da Documentação Científica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, meu reconhecimento pelo esmero e dedicação quanto às fotografias qualificadas.

À Professora Sídia Maria Callegari Jacques, meu agradecimento pelas “aulas particulares” ao executar junto comigo as análises estatísticas.

À Professora Laci Maria Butzke Coelho, meu reconhecimento pela amizade e por aceitar o desafio da revisão gramatical com competência e agilidade.

A todos os colegas do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, em especial aos do Serviço de Patologia que, de uma forma ou de outra, suportaram minha imersão nesta pesquisa, agradeço a compreensão e o respeito pelo momento vivenciado.

Ao Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, meu reconhecimento pela gentileza de proporcionar parte do trabalho desta pesquisa.

Ao Grupo de Pesquisa e Pós-Graduação do Hospital de Clínicas de Porto Alegre, o agradecimento pelo investimento e apoio financeiro.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, meu reconhecimento pelo acolhimento como aluno e pelo auxílio financeiro.

A todos os meus amigos pessoais que me doaram parte do seu tempo com palavras de incentivo, apesar do meu constante afastamento em todo este período, minha amizade e gratidão.

Aos meus queridos pais, Doutor João Helmuth de Mendonça Uchôa, médico e Professor aposentado da Universidade Federal do Rio Grande do Sul e Hospital de Clínicas de Porto Alegre e Ana Inez Martins Uchôa, Professora aposentada, minha admiração e reconhecimento pelo exemplo de vida, pelo eterno amor incondicional e por terem me feito forte para chegar aonde jamais imaginei.

À minha querida irmã, Professora Taís de Mendonça Uchôa, todo o meu carinho por estar sempre ao meu lado com a mão estendida nos momentos em que dela precisei.

Aos meus queridos sogros, Ivan Luiz Toniuzzi e Evaniza Bertuol Toniuzzi, minha admiração e reconhecimento pelo interesse em sempre me ajudar e pelo apoio fundamental quando o tempo era o que eu menos tinha.

Finalmente agradeço à minha esposa amada, Natacha Toniuzzi Uchôa, médica pediatra de raro talento, por cujo coração virtuoso me encantei e, desde então, dele nunca mais me separei. Vi-te sofrendo, juntamente com nossa querida filha, Helena Toniuzzi Uchôa, a mais difícil das minhas ausências: a de estar perto em corpo, porém longe em mente. Natacha e Helena, a presença do nosso amor, maior fulcro da relação familiar, sempre suportará nossas dificuldades. Muito obrigado a vocês duas, de coração!

***Na ciência, a maior riqueza é o conhecimento.
Compartilhar o conhecimento é servir o mais próximo.
(Diego de Mendonça Uchôa)***

RESUMO

INTRODUÇÃO: o câncer de mama é uma doença heterogênea. Há necessidade de critérios diagnósticos e prognósticos mais refinados. O emprego da imuno-histoquímica, através do painel prognóstico, fez despontar a figura do carcinoma triplonegativo e, da mesma forma, a histogenética trouxe à evidência o carcinoma basal. Paralelamente, o conhecimento sobre a origem biológica das neoplasias e da sua heterogeneidade vem sendo acentuadamente debatido através do tema das células-tronco tumorais. **OBJETIVOS:** investigar a prevalência de carcinomas basais e pentanegativos, numa amostra de carcinomas triplonegativos, e estabelecer associações com a expressão de células-tronco tumorais nestes tumores. Verificar diferenças entre estes subtipos com as variáveis clinicopatológicas. **MÉTODOS:** 94 carcinomas mamários triplonegativos foram testados para CK5/6, HER1, CD44 e CD24. As expressões desses marcadores por imuno-histoquímica automatizada foram avaliadas através de escore simples de positividade (porcentagem de células) e correlacionadas com os dados clínico-patológicos e análise de sobrevivência. **RESULTADOS:** carcinomas basais apresentam maior grau tumoral que carcinomas pentanegativos ($p=0,004$). A negatividade para CD44 ($p=0,007$) e o perfil CD44⁻CD24⁺ ($p=0,013$) foram associados com maior invasão vascular entre carcinomas triplonegativos. A expressão de CD44 foi associada aos carcinomas basais ($p=0,007$). O perfil CD44⁻CD24^{-/low} foi associado aos carcinomas pentanegativos ($p=0,04$). Nenhuma das variáveis em estudo foi associada com os desfechos clínicos. **CONCLUSÃO:** Carcinomas mamários basais e pentanegativos são subtipos tumorais bastante próximos. Nosso estudo é o primeiro desenhado especificamente para avaliar a presença células tronco-tumorais mamárias entre carcinomas basais e pentanegativos, onde o perfil CD44⁻CD24^{-/low} foi associado ao subtipo pentanegativo, e o perfil CD44⁻CD24⁺ à invasão vascular, resultados que merecem confirmação por histogenética em estudos de maior porte.

PALAVRAS-CHAVE: câncer de mama, basal, triplonegativo, pentanegativo, célula-tronco, CD44 e CD24

ABSTRACT

INTRODUCTION: Breast cancer is a heterogeneous disease, and there is a need for more refined diagnostic and prognostic criteria. Immunohistochemistry, as a breast prognostic panel, has given rise to triple-negative carcinoma, as well as histogenetics highlighted basal carcinoma. Concomitantly, the understanding of the biological origins of neoplasia and its heterogeneity has been strongly debated through the theme of cancer stem cells. **OBJECTIVES:** To investigate the prevalence of basal and penta-negative carcinomas in a sample of triple-negative carcinomas and to establish associations with cancer stem cells (CD44/CD24 expression profiles) and the clinicopathological variables within these tumors. **METHODS:** Ninety-four triple-negative breast carcinomas were tested for CK5/6, HER1, CD44 and CD24. The expression of these markers was evaluated by automated immunohistochemistry using a simple positivity score (percentage of cells) and was correlated with the clinicopathological and survival analysis data. **RESULTS:** Basal carcinomas had higher tumor grades than penta-negative carcinomas ($p=0.004$). CD44 negativity ($p=0.007$) and the CD44⁻CD24⁺ phenotype ($p=0.013$) were associated with increased vascular invasion amongst the triple-negative carcinomas. CD44 expression was associated with basal carcinomas ($p=0.007$). The CD44⁻CD24^{-/low} phenotype was associated with penta-negative carcinomas. None of the variables in the study were associated with clinical outcome. **CONCLUSION:** Basal and penta-negative breast carcinomas are closely related tumor subtypes. Our study is the first to be specifically designed to assess the presence of breast cancer stem cells in basal and penta-negative carcinomas. The CD44⁻CD24^{-/low} phenotype was associated with the penta-negative subtype, and the CD44⁻CD24⁺ phenotype was associated with vascular invasion. These results require histogenetic confirmation in larger studies.

KEYWORDS: Breast cancer, basal, triple-negative, penta-negative, stem cells, CD44 and CD24

LISTA DE TABELAS DO ARTIGO EM INGLÊS

Table 1: Antibodies used in the immunohistochemistry reactions.	90
Table 2: Score values (CK5/6, HER1, CD44 and CD24).....	91
Table 3: Clinicopathological parameters of the triple-negative series.....	94
Table 4: Frequency of basal carcinoma in 94 triple-negative invasive breast tumors.	95
Table 5: Clinicopathological parameters and tumor subtypes.	98
Table 6: Clinicopathological parameters and CD44 and CD24 expression.	105
Table 7: Clinicopathological parameters according to CD44/CD24 phenotypes.	106
Table 8: CD44 and CD24 expression according to tumor group.	111

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: carcinomas triplonegativos e basais.....	25
Figura 2: sobrevida entre os diferentes subtipos tumorais por IH (adaptado de Cheang e cols.).....	28
Figura 3: classificação IH dos carcinomas mamários (adaptado de Blows e cols.)...	30
Figura 4: sobrevida entre subtipos tumorais, por IH, em 15 anos (adaptado de Blows e cols.).....	32
Figura 5: carcinomas triplonegativos, basais e pentanegativos.	32
Figura 6: modelos de carcinogênese.	35
Figura 7: CD24, P-selectina e PSGL-1.....	38
Figura 8: CD44.....	41
Figura 9: lâminas de TMA desta tese (CK5/6, HER1, CD44 e CD24).....	53

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO EM INGLÊS

Figure 1: cytoplasmic CK5/6 expression	96
Figure 2: membranous HER1 expression	97
Figure 3: Kaplan-Meier survival curve in triple-negative patients.	99
Figure 4: Kaplan-Meier survival curve among basal and penta-negative tumors. . .	100
Figure 5: Kaplan-Meier disease-free survival curve among basal and penta-negative tumors.	101
Figure 6: CD44 membranous staining	102
Figure 7: CD24 mainly membranous staining	103
Figure 8: CD24 mainly cytoplasmic staining	104
Figure 9: Kaplan-Meier survival curve according to CD44 expression	107
Figure 10: Kaplan–Meier survival curve according to CD24 expression.	108
Figure 11: Kaplan–Meier survival curve according to CD44/CD24 phenotypes.	108
Figure 12: Kaplan–Meier disease-free survival curve according to CD44/CD24 phenotypes.	109

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

IH	imuno-histoquímica
RE	receptor de estrógeno
RP	receptor de progesterona
HER2	receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2
TN	triplonegativo
CTTs	células-tronco tumorais
CD	<i>cluster designation</i> ou <i>cluster of differentiation</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
DNA	<i>deoxy-ribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
HER1/EGFR	receptor do fator de crescimento epidérmico humano 1
CK	<i>cytokeratin</i> (citoqueratina)
CBP	<i>core basal phenotype</i> (basal real - fenótipo IH)
TMA	<i>tissue microarray</i> (coleções microscópicas de tecido)
PN	pentanegativo
Alfa-SMA	actina de músculo liso - alfa
P-caderina	caderina placentária
LMA	leucemia mieloide aguda
PSGL-1	P-selectina glicoproteína ligante-1
AH	ácido hialurônico
LYVE-1	<i>lymphatic vessel endothelial hyaluronan receptor</i>
RHAMM	<i>hyaluronan-mediated motility receptor</i>
CD44v	variante (isoforma) do CD44
CD44s	CD44 standard
ESA	antígeno epitelial específico
Lin	anticorpos marcadores de linhagem hematopoiética

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	20
2.1 Os carcinomas mamários triplonegativos, basais e pentanegativos	20
2.2 As células-tronco e a oncologia	34
2.3 O antígeno de superfície celular CD24	37
2.4 O antígeno de superfície celular CD44	40
2.5 Os antígenos de superfície celular CD44 e CD24.....	44
2.6 As células-tronco tumorais da mama e o perfil CD44 ⁺ /CD24 ^{-low}	45
2.7 As células-tronco tumorais CD44 ⁺ /CD24 ^{-low} e o subtipo basal	47
2.8 As “coleções microscópicas de tecido” (<i>tissue microarrays</i>)	52
3. JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO ESTUDO.....	55
4. OBJETIVOS.....	57
4.1 Primários	57
4.2 Secundários	57
5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS	85
ABSTRACT	86
INTRODUCTION.....	87
MATERIALS AND METHODS.....	88
Samples	88
Clinicopathological data	89
Tissue microarrays	89
Immunohistochemistry	89
Sequence analysis	91
Statistical analysis	92
RESULTS.....	93
Expression of CK5/6 and HER1 in triple-negative carcinomas.....	95
Basal and penta-negative carcinomas and clinicopathological variables	97
Basal and triple-negative carcinomas and survival analyses.....	98
Expression of CD44 and CD24 and clinicopathological variables	101
CD44/CD24 phenotype and clinicopathological variables	105

CD44 and CD24 expression and survival analyses.....	106
CD44 and CD24 and the basal and penta-negative groups	110
DISCUSSION.....	111
CONCLUSION	122
REFERENCES.....	125
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS	136
8. ANEXOS.....	137
8.1 EDITORIAL CERTIFICATE.....	137
8.2 FICHA DE COLETA DE DADOS.....	138

1. INTRODUÇÃO

O câncer de mama é uma doença heterogênea. A apresentação clínica, o potencial biológico, a resposta ao tratamento e o prognóstico podem ser bastante diferentes. (1-13)

A avaliação anatomopatológica apurada, considerando aspectos histológicos e biológicos do carcinoma primário de mama, ainda representa o instrumento de maior utilidade, embora imperfeito, para a predição dos desfechos clínicos da doença e sua resposta a intervenções clínicas. Ainda hoje, os achados morfológicos e imuno-histoquímicos da patologia tradicional espelham, com grande precisão, a expressão de centenas de genes que podem ser avaliados em uma simples verificação histológica associada ao correspondente estudo imuno-histoquímico. (5) Contudo, os fatores prognósticos anatomopatológicos tradicionalmente utilizados no câncer de mama como o diâmetro tumoral, o grau histológico e o número de metástases nos linfonodos regionais, associados mais recentemente à determinação imuno-histoquímica (IH) do “painel prognóstico”, têm se demonstrado insuficientes em alguns casos. Não há dúvida de que existe uma grande necessidade de critérios diagnósticos mais refinados, bem como parâmetros prognósticos mais precisos, para que se possa tratar o carcinoma de mama de maneira mais eficaz e estabelecer mais claramente a probabilidade de recorrência, sobretudo quando há controvérsia quanto à aplicação das diferentes modalidades de tratamento disponíveis. (14-18)

A avaliação imuno-histoquímica do câncer de mama - através de um painel com receptor de estrógeno (RE), de progesterona (RP) e receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER2) - não é recente, e atualmente, tornou-se fundamental. (19, 20) Em função da negatividade para esses três marcadores IHS,

recentemente surgiu um subtipo tumoral controverso chamado carcinoma mamário triplonegativo (TN). Atualmente, o carcinoma TN é de conhecido mau prognóstico e as pacientes que desenvolvem este subtipo tumoral não se beneficiam de importantes modalidades terapêuticas como a terapia antiestrogênica e a anti-HER2. (7, 21-26)

Na busca de novas formas de classificação do câncer de mama, no final do século 20 e início do século 21, surgiram várias publicações abordando e correlacionando os aspectos genéticos dos tumores mamários com os clínicos e imuno-histoquímicos já estabelecidos, algumas dessas trazendo importantes contribuições para o conhecimento científico atual sobre o assunto. (1-4, 6, 27-29)

O estudo da genética tumoral - mesmo que por meio de um número ainda limitado de genes - provou constituir-se numa possibilidade real de reclassificação do câncer de mama, permitindo categorizar e observar clinicamente diferentes genótipos tumorais, com possibilidades concretas de evolução em direção à futura personalização das intervenções terapêuticas. O estudo dos genes tumorais mostrou que é possível avançar sobre a atual classificação dos carcinomas mamários, propiciando separar tumores que até então eram idênticos do ponto de vista histopatológico, imuno-histoquímico e clínico. O maior desafio futuro é estabelecer para cada um desses “tumores semelhantes”, perfis biológicos bem distintos, de onde poderão ser extraídas importantes inferências preditivas de sensibilidade tumoral às terapias disponíveis, bem como informações prognósticas.

Os estudos de Perou e Sorlie e cols., do início dos anos 2000, são fundamentais no contexto da genética do câncer de mama (1-4). Nesses trabalhos, e de maneira indelével, surge uma nova classificação subdividindo o câncer de mama a partir da expressão de diferentes grupos de genes. Essa nova classificação

redistribuiu os cânceres de mama em cinco subtipos, assim chamados: *luminal A*, *luminal B*, *normal breast-like*, *HER2* e *basal-like*. Dentre esses cinco principais grupos, o carcinoma mamário basal apresenta um dos piores prognósticos. O interesse neste subtipo é ainda maior, pois, à semelhança do carcinoma triplonegativo, a maioria dos carcinomas basais também não responde às terapias antiestrogênicas e anti-HER2. (4, 6, 30)

Até muito pouco tempo, outro assunto de extrema importância na oncologia humana - o conhecimento sobre a origem biológica das neoplasias e da sua heterogeneidade (fenotípica e genotípica) - esteve represado por muitos anos, principalmente devido à carência tecnológica. Durante tal período, duas teorias tentavam explicar a heterogeneidade tumoral, assim como o seu crescimento e recidiva.

Uma teoria - chamada "modelo estocástico" - versava sobre uma probabilidade pequena, mas igual a de que qualquer célula dentro de uma massa tumoral heterogênea poderia gerar uma nova neoplasia, com igual padrão de heterogeneidade, uma vez semeada em outro local do organismo, com condições idênticas ao seu nicho de origem. (31-34) A outra teoria, seguindo um modelo de hierarquização das células neoplásicas, postulava a existência de diversas classes distintas de células dentro de uma massa tumoral, porém apenas poucas delas, denominadas células-tronco tumorais (CTTs), teriam a real capacidade de manter ou de reiniciar o crescimento de uma neoplasia num nicho idêntico ao original. (35-39)

A teoria das CTTs foi muito bem revista e discutida na publicação de Stewart Sell, em 2004, que imputa parte dessa ideia inicial ao alemão Julius Friedrich Cohnheim, um patologista experimental que, pouco depois da metade do século 19, concebeu as primeiras conjecturas sobre a teoria das origens do câncer. (37)

Também há revisões interessantes sobre essa teoria abordando especificamente o câncer de mama. (35, 40-46)

Devido ao avanço global da ciência em todas as áreas de conhecimento, a partir da segunda metade do século 20, a literatura médica foi “invadida” por centenas de publicações envolvendo a teoria das células-tronco tumorais, muitas, inclusive, fundamentadas em modelos experimentais, e hoje tal teoria está virtualmente comprovada, embora ainda necessitando de maior reprodutibilidade e, principalmente, aplicabilidade clínica com propósito terapêutico (terapias-alvo). (41, 47-50)

Sobre os carcinomas mamários e as células-tronco tumorais, já existem estudos bastante elucidativos. (42, 46, 50-53) Poucos e recentes trabalhos, porém, abordam especificamente os subtipos triplonegativos e basais de conhecido mau prognóstico e os correlacionam com as diferentes expressões imuno-histoquímicas de CD44 e CD24, marcadores que atualmente são os mais utilizados na identificação das células-tronco tumorais no câncer de mama. (48, 54-66)

O conhecimento médico científico tem ainda um longo e desafiador caminho até futuramente determinar pela imuno-histoquímica, genética tumoral ou, quem sabe por outra futura técnica, quais são, exatamente, as células tronco-tumorais mantenedoras de cada um dos vários tipos de tumores malignos pertencentes ao heterogêneo grupo dos carcinomas da mama.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Os carcinomas mamários triplonegativos, basais e pentanegativos

Desde o desenvolvimento do microscópio, da histologia e da patologia - dos séculos 16 e 17 até a metade do século 20 - o tratamento do carcinoma de mama vinha sendo fundamentado numa classificação neoplásica relativamente simples, baseada no tipo histológico, no grau tumoral e nos estágios patológico e clínico da doença. A partir da segunda metade do século 20, a expressão de receptores hormonais (estrógeno e progesterona) e de outros marcadores como o HER2 instituiu a biologia molecular como ferramenta fundamental em patologia mamária (19, 20, 67-71). Hoje, a pesquisa desses três fatores por meio da técnica imuno-histoquímica denomina-se “painel prognóstico do câncer de mama” e é indicação obrigatória após o diagnóstico anatomopatológico dos carcinomas da mama.

Neste contexto do uso contemporâneo massivo do painel prognóstico, surge, em um resumo apresentado por Carey e cols., em 2004 no 27^o *San Antonio Breast Cancer Symposium*, e no trabalho de Brenton e cols., em 2005, o termo triplonegativo para identificar aqueles carcinomas mamários que se mostram ao exame imuno-histoquímico negativos para os receptores de estrógeno, progesterona e HER2. (72) Posteriormente, estudos específicos sobre o subtipo triplonegativo demonstraram que esse é um grupo heterogêneo de tumores de prognóstico ruim, com diferentes fatores de risco, apresentações clínicas, padrões histopatológicos, comportamentos clínicos e respostas à quimioterapia, quando comparados com os carcinomas mamários positivos para estrogênio, por exemplo. (7, 8, 23, 73-89)

Em sua grande maioria, os carcinomas triplonegativos desenvolvem-se em

pacientes mais jovens (abaixo dos 50 anos) e são mais prevalentes em mulheres afro-descendentes e hispânicas. (78-80, 84-87) O pico de recidiva dos carcinomas TNs parece ocorrer entre o primeiro e o terceiro ano após o diagnóstico, e boa parte dos pacientes morre após cinco anos do tratamento inicial, o que é acentuadamente diferente do comportamento clínico esperado para os casos de carcinomas estrógeno positivos. (8, 80, 90-93) Por outro lado, passados os primeiros cinco anos, o subtipo triplonegativo parece ter menor chance de recidiva que os carcinomas estrógeno positivos. (23, 92)

Do ponto de vista histopatológico, a maioria dos carcinomas triplonegativos é do tipo não especial e de alto grau, isto é, grau 3 da classificação de Nottingham. (8) O índice proliferativo médio (Ki-67) é de 35%, variando de 10 a 90%. (94) Pela classificação histológica pode-se, todavia, perceber claramente a heterogeneidade deste grupo, pois carcinomas metaplásicos, mioepiteliais e adenoide-císticos também são preferentemente triplonegativos. (26, 95-97)

Alguns anos após o surgimento da imuno-histoquímica, estudos utilizando outras técnicas inovadoras, como a *polymerase chain reaction* (PCR) e o sequenciamento genético (capazes de verificar o conteúdo genético celular), apareceram com bastante repercussão. Mais recentemente, os estudos utilizando análise tumoral histogenética por múltiplos genes (*DNA microarray*) têm permitido a identificação e a classificação dos carcinomas mamários de uma forma diferente da clássica. (1-4) A técnica diagnóstica e prognóstica revela, em parte, por que pacientes com tumores de mesmas características patológicas (tamanho, tipo, grau e estágio) podem mostrar evoluções clínicas diferentes. Os estudos de *DNA microarray* têm demonstrado que a heterogeneidade clínica e biológica do câncer de mama pode ser explicada por diferenças na composição genética dessas

neoplasias, mesmo que se pareçam muito semelhantes à luz dos clássicos métodos de diagnóstico e estadiamento.

Por meio da análise tumoral pela técnica histogenética, é possível identificar diferentes carcinomas de mama dentro de um mesmo “tipo histológico de câncer” e delinear uma nova classificação baseada em grupos de genes expressos à semelhança do tecido mamário normal. Nos primeiros estudos, utilizando *DNA microarray*, demonstrou-se que é possível separar carcinomas mamários em pelo menos cinco subgrupos, de acordo com a expressão de diversos genes relacionados aos receptores hormonais (estrógeno e progesterona), ao crescimento celular (HER2 e HER1/EGFR), ao ciclo celular e à “origem no tecido mamário” (2-4). A partir desses elementos, o grupo de Perou formulou uma nova classificação “molecular” para os carcinomas de mama em cinco grupos principais: *luminal A*, *luminal B*, *normal breast-like*, *HER2* e *basal-like*; permanecendo ainda um grupo menor de tumores não classificáveis pelos genes testados. Dentre os cinco principais grupos genéticos, o carcinoma mamário subtipo basal apresentou um dos piores prognósticos e representou 15% dos carcinomas mamários estudados (2). Deve-se ressaltar que as publicações recentes com *DNA microarray*, no início dos anos 2000, não foram as primeiras a tentar entender o significado dos “tumores basais de mama”, pois alguns anos antes, por técnica imuno-histoquímica, já havia trabalhos neste contexto. (28, 29, 98)

A heterogeneidade do câncer de mama, que historicamente já era demonstrada pela histopatologia e corroborada pela imuno-histoquímica, foi exposta como nunca pela nova “classificação molecular”. Não resta mais dúvida de que o câncer de mama é, portanto, doença de múltiplas faces e que engloba várias entidades geneticamente distintas. Reconhece-se que cada paciente, por si só, já

contribui para a variabilidade da resposta aos tratamentos (heterogeneidade clínica), contudo, mesmo com parâmetros patológicos e prognósticos semelhantes, devemos esperar comportamentos clínicos diferentes também em função das características genéticas distintas de cada subtipo histopatológico (heterogeneidade tumoral).

O subtipo tumoral basal (*basal-like*), que apresenta um perfil genético similar ao das células basais ou mioepiteliais da mama, é um bom exemplo da heterogeneidade do câncer mamário. (2, 4) Os carcinomas basais, assim como os carcinomas triplonegativos, também gozam de grande interesse no momento, pois possuem prognóstico desfavorável. Quando comparados aos luminais, usualmente não respondem à hormonioterapia, visto que grande parte é negativa para RE e RP, assim como também não expressam o HER2. (99-102)

Com relação ao exame anatomopatológico, são características dos carcinomas basais: tipo histológico não especial, alto grau, alto índice mitótico, necrose tumoral geográfica, cicatriz central, células neoplásicas fusiformes, bordas tumorais arredondadas (não infiltrativas) e resposta inflamatória linfocítica. (103-107)

Analisando conjuntamente os carcinomas triplonegativos e basais, podemos observar que a prevalência dos carcinomas TNs varia entre 10 e 17% entre os carcinomas de mama em geral. (6, 8, 24, 73, 74, 90, 108-112) Já os basais perfazem entre 7 e 19% dos carcinomas mamários, estatística muito semelhante à observada para os TNs. (6, 29, 110, 113-116) Tais prevalências, com percentuais variáveis em cada um dos dois grupos, devem-se, além da variabilidade populacional normal, a métodos e critérios diagnósticos distintos utilizados pelos autores. No caso dos carcinomas TNs, os pontos de corte (positividade na IH) relatados para o RE e o RP variam desde menos de 1% até 20%. (8, 24, 75, 78, 87, 117) As discrepâncias aumentam em relação ao HER2, pois, em 2007, um consenso

mundial determinou a elevação no nível de positividade (10% para 30%), o que certamente dificultará qualquer tentativa de comparação com os dados anteriores a essa data. (20) Da mesma forma, diferentes níveis de positividade e diferentes “painéis de anticorpos” ou “painéis de genes” utilizados no diagnóstico dos carcinomas basais também são um obstáculo à comparação dos dados. (102)

Do ponto de vista clínico, tanto carcinomas basais quanto triplonegativos preferentemente fazem disseminação hematogênica precoce para pulmões e sistema nervoso central, e disseminam-se pouco para o esqueleto e o fígado, em comparação com os tumores RE positivos (luminais). (23, 118-123) Clinicamente, os carcinomas basais também afetam mais as mulheres jovens e as de descendência afro-hispânica. (103) Carcinomas mamários basais e triplonegativos também estão associados com mutações do BRCA e baixa expressão de claudinas. (124-131) Devido às fortes semelhanças, alguns estudos têm considerado o carcinoma triplonegativo e o basal como sinônimos de uma mesma “entidade tumoral”. (94, 117, 132) Mas isso não parece ser a fiel realidade. Em primeiro lugar, carcinomas triplonegativos são definidos por um painel imuno-histoquímico, enquanto os carcinomas basais, por diagnóstico histogenético. Ainda assim, aproximadamente 70 a 80% dos carcinomas basais, definidos por *DNA microarray*, apresentam fenótipo triplonegativo pela IH e cerca de 70 a 80% dos carcinomas triplonegativos, definidos pelo painel prognóstico imuno-histoquímico negativo, apresentam genótipo basal por *DNA microarray*. (111, 133-136) Por outro lado, índices entre 18 e 40% dos carcinomas basais, definidos por *DNA microarray*, não demonstram um fenótipo triplonegativo pela IH. (109, 134, 135) Assim, embora haja grande intersecção entre esses dois grupos de carcinomas (triplonegativos e basais), definitivamente existe uma boa parte de ambos que não é afim (figura 1).

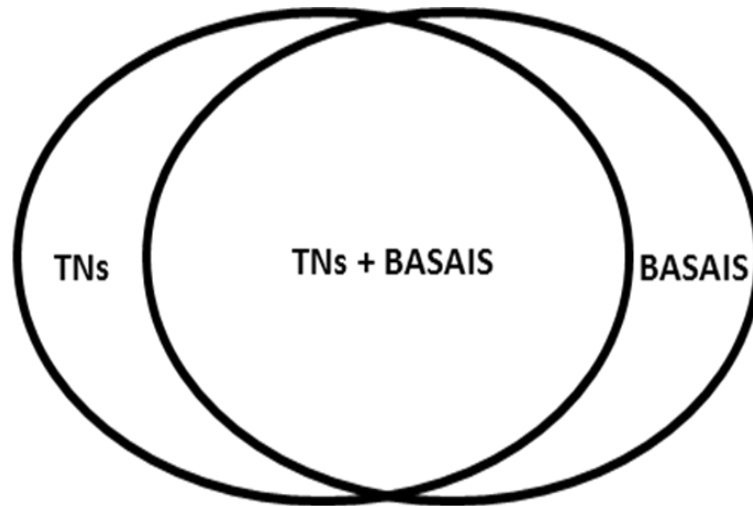


Figura 1: carcinomas triplonegativos e basais.

Nielsen e cols., em 2004, estudaram 21 carcinomas mamários basais (por *DNA microarray*) e utilizaram como painel imuno-histoquímico inicial para a caracterização deste subtipo os marcadores CK5/6, o CK17, o CD117 e o EGFR (HER1). No refinamento dos resultados, praticamente todos os carcinomas basais (CK5/6, CK17 e HER1 positivos) também foram positivos para CD117 e, como o anticorpo HER1 foi mais sensível que o CK17, o “painel basal” final considerou apenas CK5/6 e/ou HER1 (a partir de 1% de positividade) como fatores determinantes para o diagnóstico imuno-histoquímico do carcinoma basal de mama. Por meio desse painel, os autores obtiveram 76% de sensibilidade e 100% de especificidade. (6) Os grupos de Carey e Tischkowitz utilizaram a mesma definição IH do grupo de Nielsen para carcinoma basal de mama, cabendo ao último a primeira utilização do termo *core basal phenotype* (CBP) para denominar os carcinomas basais que eram concomitantemente negativos para RE, RP e HER2 e positivos para CK5/6 e/ou EGFR. (90, 103)

A partir do estudo do grupo de Nielsen, diversos trabalhos científicos surgiram

utilizando variados marcadores imuno-histoquímicos disponíveis, numa tentativa de determinar o melhor perfil de anticorpos para os carcinomas basais e comprovar, através deste, o pior prognóstico desse subtipo tumoral. Faz-se, todavia, necessário lembrar aqui que grupos de carcinomas mamários caracterizados pela expressão de citoqueratinas de alto peso molecular, assim como pela negatividade para estrógeno, progesterona e HER2, já tinham sido descritos há mais de dez anos (28, 98, 137). As recentes pesquisas através das técnicas genéticas apenas deram a estes carcinomas mais visibilidade, batizando-os de “basais”.

Na imuno-histoquímica, os carcinomas basais se caracterizam pela expressão variável de citoqueratinas de alto peso molecular (CK5/6, CK14 e CK17), do EGFR, de marcadores mioepiteliais (vimentina, p63, CD10, α -SMA), do CD117 e da P-caderina e diversos outros. (6, 102, 105, 113, 114, 119, 120, 138-143) Devido ao emprego dessa gama variada de anticorpos e diferentes pontos de corte para positividade, há notável discussão científica no afã de se estabelecer um consenso na literatura quanto à melhor “definição imuno-histoquímica” para o diagnóstico dos carcinomas basais.

Há, contudo, alguns trabalhos recentes na literatura que merecem ser examinados com maior atenção. Em um destes, Rakha e cols. estudaram 1.872 carcinomas invasores de mama por imuno-histoquímica e observaram que o subtipo basal, identificado pela positividade para CK5/6 e/ou CK14 em mais de 10% das células, representou 18% do total (335 casos). Dentre estes carcinomas basais, 42% foram positivos para HER1 (com ponto de corte para positividade também em 10%), 31% positivos para RE, 24,5% para RP, 33% para HER2, demonstrando que, definidos apenas pela imuno-histoquímica das citoqueratinas “basais”, há efetivamente carcinomas mamários positivos para receptores esteroides femininos e

para HER2, com expressão concomitante de marcadores basais. Dentre os 335 carcinomas basais deste estudo, os autores identificaram 170 casos negativos para RE e HER2. Entre os 170, 53 foram adicionalmente positivos para HER1. A avaliação estatística do HER1 não se mostrou, no entanto, significativa para os parâmetros prognósticos do estudo, com exceção da presença de metástase nos linfonodos axilares. (110)

Conforti e cols, em um estudo sobre quimioterapia e subtipos de câncer de mama, estudaram 823 casos por *tissue microarray* (TMA), obtidos a partir de dois estudos randomizados. O critério para o diagnóstico de carcinoma basal foi a identificação de pelo menos uma célula positiva para CK5/6 e/ou HER1. Foram observados 98 carcinomas basais e 109 negativos para RE, HER2, CK5/6 e HER1. (144)

Em 2008, Cheang e cols. publicaram um estudo com 3.744 casos de câncer de mama, utilizaram os anticorpos CK5/6 ou HER1, com “qualquer positividade”, como critério de carcinoma basal e adotaram o termo *core basal* para denominar os carcinomas triplonegativos positivos para CK5/6 e/ou HER1. Os autores foram também os pioneiros na utilização do termo pentanegativo (PN) para designar os carcinomas de mama negativos para esses cinco marcadores IHS. (142) Os resultados mostraram que 336 casos (~9,0%) foram considerados como triplonegativos basais e outros 303 (~8,0%) como pentanegativos (RE, RP, HER2, HER1 e CK5/6 negativos). Entre os basais, a positividade para EGFR (13,3%) foi maior que para o CK5/6 (8,4%). Os pacientes do grupo basal (*core basal*) apresentaram menor sobrevida global (26% menos) em 10 anos, quando comparados com o grupo pentanegativo, mesmo depois de ajustadas as covariáveis (idade, tamanho e grau tumorais, invasão vascular e linfonodos axilares). Ao dividir o

grupo triplonegativo em dois subgrupos, os autores demonstram que, em cerca de três anos de acompanhamento, as curvas dos tumores basais e pentanegativos tendem a se separar e que, ao longo de 15 anos de acompanhamento, a curva do subtipo basal aproxima-se dos tumores de prognóstico ruim (casos HER2 positivos do estudo) e a curva dos tumores pentanegativos aproxima-se dos carcinomas luminais (figura 2).

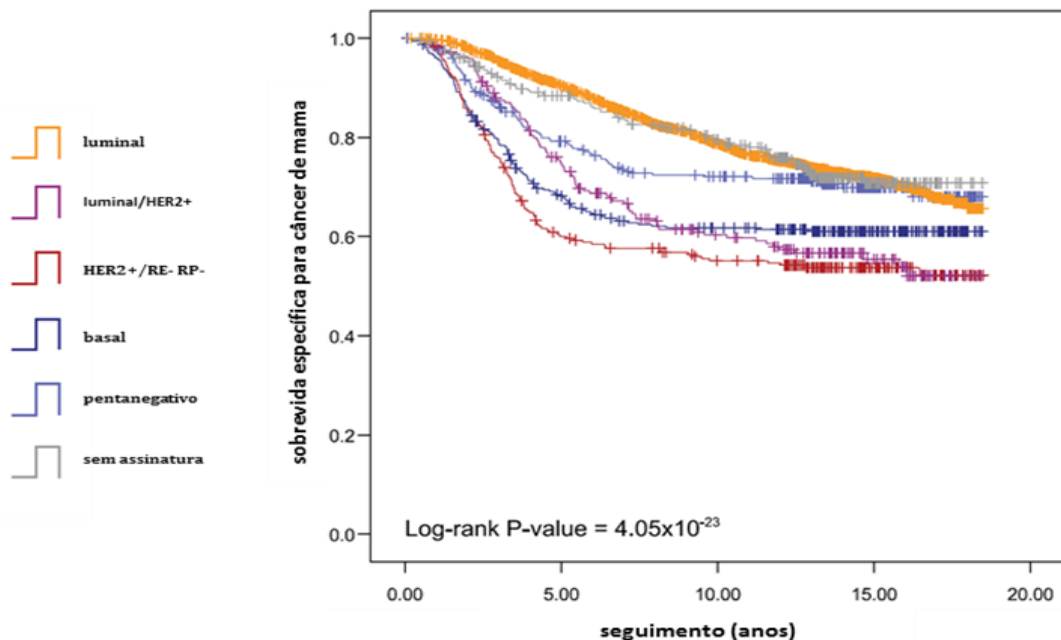


Figura 2: sobrevida entre os diferentes subtipos tumorais por IH (adaptado de Cheang e cols.).

Os autores deduzem que o prognóstico negativo dos carcinomas triplonegativos é determinado quase que exclusivamente pela presença dos casos de carcinomas basais dentro do próprio grupo de TNs (figura 5). Neste mesmo estudo entre os carcinomas mamários basais e pentanegativos tratados com regimes quimioterápicos sem antraciclinas não houve, entretanto, diferença nas análises de sobrevivência. As características clinicopatológicas dos tumores basais

e pentanegativos foram semelhantes nos dois tipos de regimes quimioterápicos. Não há dados disponíveis para comparação da sobrevida livre de doença entre os grupos tumorais desse estudo.

Em 2009, Rakha e cols. publicaram um estudo envolvendo 1.277 tumores de mama. Após a revisão dos arquivos, foram identificados 232 (18%) triplonegativos, sendo que desses, 165 tumores (71%) foram positivos para os marcadores basais do estudo (CK5/6, CK17, CK14 e/ou EGFR). (66) Os anticorpos basais foram considerados positivos com pontos de corte em 10%. Dentro do estudo, os 67 casos negativos para esses sete anticorpos (heptanegativos), quando comparados com o grupo basal, não mostraram associação com BRCA1, apresentaram maior prevalência de metástase em linfonodos axilares e maiores sobrevidas livre de doença e global em cinco anos. Ao final do acompanhamento do estudo (10 anos), apenas a sobrevida global se manteve diferente entre os dois grupos (basal e heptanegativo). Quando ocorreram metástases, os carcinomas basais apresentaram mais frequentemente dois sítios distintos (cérebro e pulmões), diferente do que foi observado nos heptanegativos, com um sítio isolado e geralmente em linfonodo. (66)

Em 2009, o grupo de Nofech-Mozes utilizou o exame IH para diagnosticar carcinomas basais de mama a partir de um grupo de 132 carcinomas TNs. Com ponto de corte em 1% para CK5/6 e/ou HER1, os autores observaram 116 (87,8%) tumores basais e 16 chamados *normal-like* (pentanegativos). Na análise de sobrevivência não houve diferença entre os grupos basal e *normal-like*. (145)

O grupo de Liu - também em 2009 - publicou um estudo envolvendo uma série de 112 carcinomas triplonegativos. Através da expressão de CK5/6 e CK14, com qualquer positividade, foram diagnosticados 52 carcinomas basais, correspondendo a 46,4% da amostra. Na análise multivariada, a expressão de

CK5/6 foi significativa para a diferença de sobrevida global e livre de doença, enquanto a expressão conjunta de CK5/6 e CK14 foi significativa apenas para a diferença de sobrevida livre de doença. (146)

Thike e cols., em 2010, aplicaram extenso painel basal (CK5/6, CK14, CK17, EGFR, CD117, p63, alfa-SMA e CK34 β E12) em um grupo de 653 carcinomas mamários triplonegativos e obtiveram 549 casos (84%) basais, considerados positivos através de escore semelhante ao de Allred para receptores hormonais de mama. (93) Na análise multivariada de sobrevivência, os carcinomas basais apresentaram idade mais precoce de início da neoplasia, maior grau histológico e maior expressão de CK17 e de CD117, todos se correlacionando com um pior prognóstico.

Em 2010, Blows e cols. publicaram uma meta-análise relevante devido à sua grande amostra (10.149 carcinomas), pelo uso da técnica imuno-histoquímica e pelas conclusões que obtiveram. (92) Baseando-se em cinco marcadores imuno-histoquímicos (RE, RP, HER2, HER1 e CK5/6), os autores delinearam uma classificação conforme a ilustrativa figura abaixo (figura3).

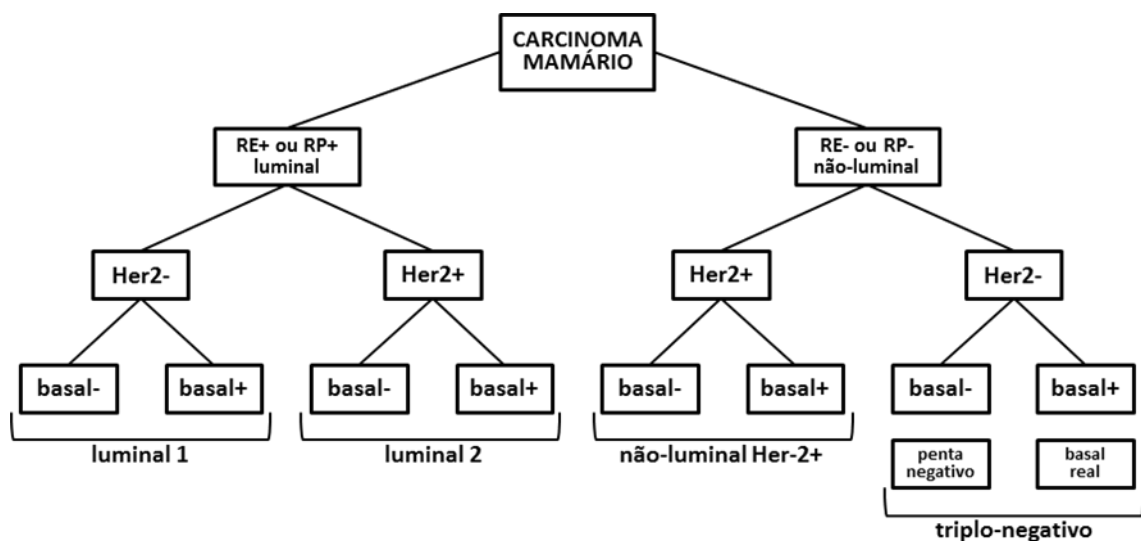


Figura 3: classificação IH dos carcinomas mamários (adaptado de Blows e cols.).

O grupo de Blows também utilizou o termo *core basal phenotype* (CBP) para denominar os carcinomas basais que eram concomitantemente negativos para RE, RP e HER2 e positivos para CK5/6 e/ou EGFR, bem como usaram também o termo pentanegativo para os tumores negativos a todos estes cinco anticorpos. O critério de positividade para os dois marcadores basais, entre os diferentes centros participantes da meta-análise, variou de maior que 0% a maior que 10%. Nos resultados, os autores evidenciaram que os carcinomas triplonegativos perfaziam 16% do total da amostra (1645 casos) e, destes, 58% (962 casos) eram basais (CK5/6 e/ou HER1 positivos) e 42% (683 casos) pentanegativos. Outra conclusão importante foi a de que os carcinomas basais apresentaram prognóstico pior que os carcinomas pentanegativos e os carcinomas luminais (RE e RP positivos) com expressão concomitante de marcadores basais. A curva de sobrevida para os carcinomas basais é bastante semelhante à de Cheang e cols., podendo-se verificar que os dois grupos tumorais se separam em torno de três anos de acompanhamento e ainda se mantêm separados após quinze anos, no encerramento da observação (figura 4). Neste estudo, a pior sobrevida global do grupo basal não foi dependente dos regimes de quimioterapia e, no grupo de carcinomas positivos para HER2, a expressão de marcadores basais não teve influência no prognóstico.

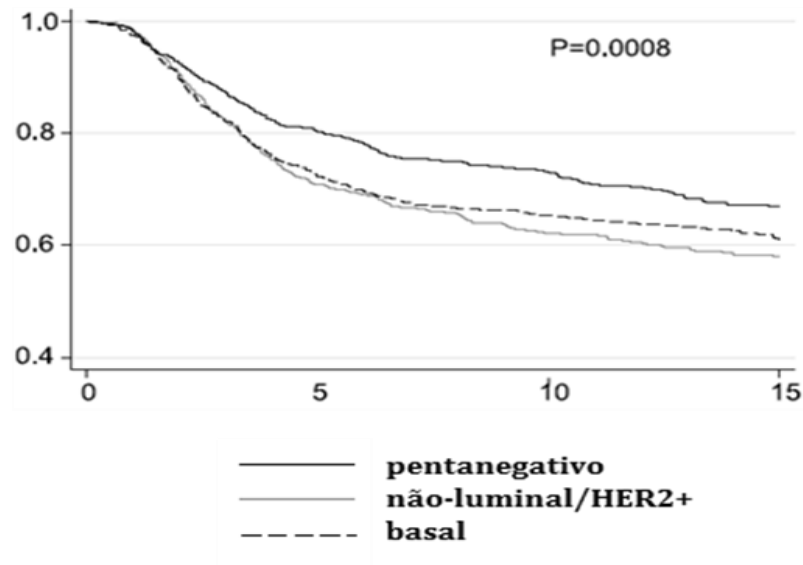


Figura 4: sobrevida entre subtipos tumorais, por IH, em 15 anos (adaptado de Blows e cols.).

Abaixo, conforme a classificação de Blows e cols. (figura 5), uma releitura figurada dos carcinomas triplonegativos e basais, evidenciando os carcinomas pentanegativos.

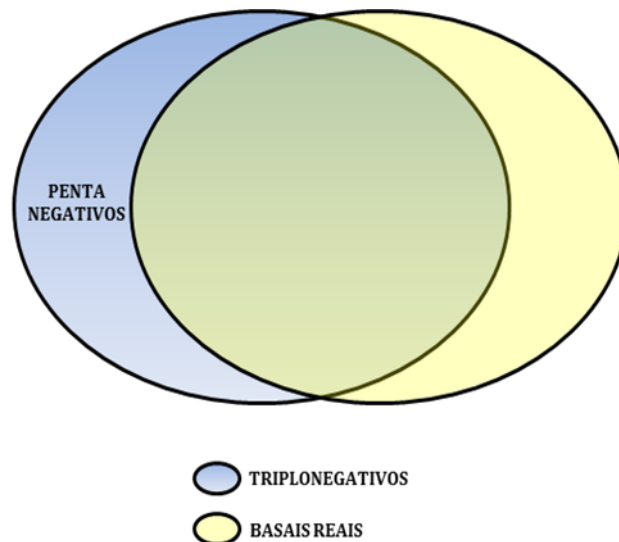


Figura 5: carcinomas triplonegativos, basais e pentanegativos.

Os estudos mais robustos e recentes, vistos anteriormente demonstram, através de indicadores de prognóstico (recidiva e sobrevida global), que o painel

inicialmente utilizado por Nielsen e cols., em 2004, realmente parece ser um ótimo perfil imuno-histoquímico para os carcinomas basais de mama, utilizando índices iniciais de positividade em 1%. (147) Apesar do HER1 não ser propriamente um marcador basal por excelência, a prevalência da sua positividade nestes tumores, associada ao CK5/6, faz que ele se torne um marcador basal adjudicado. Mesmo assim e a despeito de todos os esforços, ainda permanece a histogenética como o teste padrão-ouro para o diagnóstico do carcinoma basal de mama (110). Atualmente, já há testes genéticos sendo comercializados para o diagnóstico histogenético do câncer de mama como o PAM50, o Oncotype-DX e o MammaPrint. (134, 148-151)

A técnica de diagnóstico genético por *DNA microarray* é, no entanto, onerosa e está longe de se tornar uma rotina na esmagadora maioria dos laboratórios de patologia, mesmo nos países de ponta em pesquisa. Assim, embora muitas “assinaturas imuno-histoquímicas” tenham sido descritas em diferentes estudos, a maioria sem correlação concomitante com histogenética (padrão-ouro), particularmente acredito que o melhor perfil imuno-histoquímico parece ainda ser o inicial, do grupo de Nielsen (2004), o qual vem sendo testado e corroborado pelos estudos mais contundentes e de maiores amostras publicados até agora, todos confirmando que as pacientes portadoras de carcinomas triplonegativos basais (RE, RP e HER2 negativos e CK5/6 e/ou HER1 positivos) apresentam sobrevida livre de doença menor que aquelas pacientes cujos carcinomas são triplonegativos não basais ou pentanegativos. (6, 90, 92, 110, 142)

Afora esta discussão, está claro que o subgrupo imuno-histoquímico dos carcinomas triplonegativos pode ser subdividido entre carcinomas basais e pentanegativos. Carcinomas basais apresentam prognóstico distinto dos

triplonegativos e pentanegativos. Mesmo que esses três tipos IHS apresentem muitas semelhanças histopatológicas e clínicas, não devem ser considerados como sinônimos de uma mesma doença.

2.2 As células-tronco e a oncologia

A suposta relação entre as células-tronco e o câncer não é nova. Embora tal conceito tenha sido desenvolvido há cerca de meio século, limitações técnico-científicas certamente impediram, durante muitos anos, o desenvolvimento de estudos comprobatórios e a consequente confirmação desse importante paradigma oncológico. Nesta hipótese, os tumores malignos não se originariam a partir das numerosas células somáticas maduras e diferenciadas, mas sim a partir de raras células-tronco localizadas estrategicamente em cada um dos tecidos maduros. (36, 152-154)

As células progenitoras primitivas ou células-tronco apresentam duas características fundamentais: a capacidade de autorreplicação e a capacidade de diferenciação. Segundo a teoria, as alterações genéticas que hoje identificamos nas células tumorais aconteceriam inicialmente nas células-tronco teciduais, ocasionando o descontrole dos mecanismos de regulação delas e as transformando em células-tronco tumorais (CTTs). (42, 154-157)

Sob esse conceito de carcinogênese, a capacidade de autorrenovação seria responsável pela manutenção (multiplicação e imortalidade) tumoral e a capacidade de diferenciação pela heterogeneidade (polimorfismo) de uma neoplasia desenvolvida. Vistos sob essa teoria, os tumores malignos devem conter vários tipos de células, desde células-tronco tumorais, em pequena quantidade, até células

cancerígenas em diversos graus de maturação, as quais comporiam a maior parte da massa celular de uma neoplasia. (48, 153, 158, 159)

A despeito da estimulante teoria, acreditou-se durante muito tempo que praticamente qualquer célula de uma neoplasia maligna seria capaz de originar um novo tumor (secundário), desde que colocada em um microambiente biologicamente satisfatório (modelo estocástico).

Na figura abaixo, de acordo com as duas teorias, podemos observar um desenho esquemático representando os dois modelos de carcinogênese (figura 6).

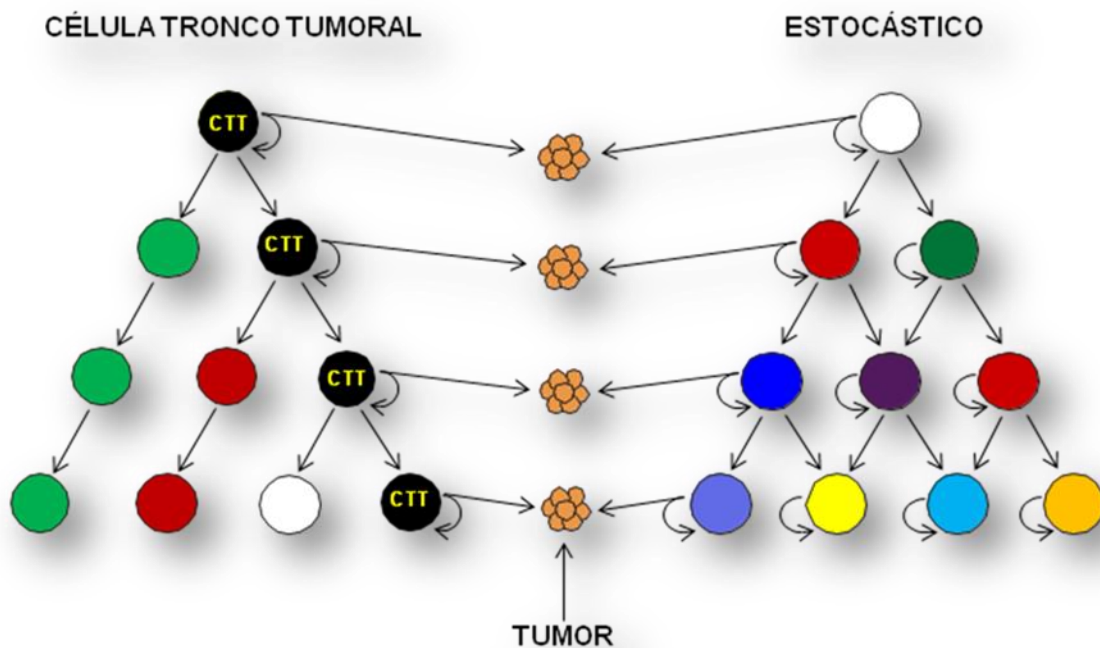


Figura 6: modelos de carcinogênese.

Todavia, ao se tentar reproduzir o modelo estocástico em tumores sólidos e de forma *in vitro*, já se demonstrou que nem todas as células tumorais são capazes de produzir o fenômeno neoplásico, ou seja, formar colônias ou clones de células tumorais, regenerando o tumor primário. (48, 153, 160)

Em relação aos tumores “não sólidos” como as leucemias, por exemplo, em 1994 houve a primeira comprovação científica *in vivo* da existência das CTTs, associadas ao desenvolvimento de leucemia mieloide aguda (LMA) em ratos imunossuprimidos. (47) Nesse trabalho pioneiro, células da LMA foram pré-selecionadas por imunofluorescência pelos marcadores CD34 e CD38. Apenas as células tumorais com o perfil CD34⁺/CD38⁻ foram capazes de desenvolver a LMA, mesmo em pequenas quantidades, enquanto as demais células neoplásicas, mesmo em quantidade milhares de vezes superior, não obtiveram o mesmo efeito neoplásico.

Após essa descoberta inicial, outras evidências científicas foram sendo acumuladas. Nesse contexto, surgiram várias publicações envolvendo células-tronco tumorais, algumas já envolvendo tumores sólidos como gliomas, adenocarcinomas de cólon, pâncreas, pulmão, mama, fígado e próstata. (153, 161-166)

Na mama, a investigação das CTTs é uma consequência natural, mas que ocorreu praticamente em paralelo, a partir dos estudos de células-tronco mamárias em animais (167-173) e células-tronco mamárias em humanos (50, 53, 155, 158, 174-177). Às publicações de Stingl e cols. e de Shackleton e cols. são atribuídas as primeiras demonstrações *in vivo* da evidência de células-tronco mamárias não neoplásicas de ratos adultos, descritas, respectivamente, sob os perfis CD31⁻/CD45⁻/TER119⁻/LIN⁻/CD49f^{high}/CD24^{med} e CD31⁻/CD45⁻/TER119⁻/LIN⁻/CD29^{high}/CD24⁺, as quais se constituem, após a purificação, em bem menos de 10% do volume total das células mamárias. (178, 179)

Em um interessante estudo de Sleeman e cols., células epiteliais mamárias de ratos, purificadas e em suspensão, foram testadas e separadas a partir da expressão de CD24. (180) Demonstrou-se que as células com perfil CD24^{low},

representando cerca de 22% do total em suspensão, eram positivas (95%) para citoqueratina 14 (clássico marcador basal/mioepitelial), e que as CD24^{high}, constituindo cerca de 70% do total das células, eram positivas para CK8/18 (típico marcador luminal) o qual se expressou em 99% delas. Nessa mesma publicação, as células do grupo CD24^{low} foram capazes de reconstituir o tecido mamário com muito mais capacidade que as de perfil CD24^{high}.

2.3 O antígeno de superfície celular CD24

Proposta em 1982, na primeira Conferência Internacional sobre os Antígenos Humanos de Diferenciação Leucocitária (sigla inglesa HLDA), a classificação molecular “CD” (*cluster designation* ou *cluster of differentiation*) é um sistema de classificação (nomenclatura) inicialmente desenvolvido para o “sistema” leucocitário humano, diferenciando e identificando os leucócitos a partir de determinadas proteínas de superfície assim chamadas de “CDs”. (181, 182) Atualmente, os CDs são em número de 363 e já foram identificados em diversas células humanas não pertencentes ao sistema hematopoiético.

O CD24 é uma pequena molécula (sialoglicoproteína) constituída por 24 aminoácidos, ancorada à superfície celular e de localização genética em 6q21. Foi originalmente descrita em linfócitos pré-B (em amadurecimento), mas também é naturalmente expressa em granulócitos maduros. (183) O CD24 é um importante fator específico de ligação para a P-selectina, a qual participa da adesão dos leucócitos às plaquetas e ao endotélio ativado. A principal proteína de superfície expressa nos leucócitos e que se liga à P-selectina é a P-selectina glicoproteína ligante-1 (PSGL-1). (184, 185) Além do carcinoma de mama, a expressão de CD24 também já está demonstrada em alguns outros cânceres humanos. (186-188)

Em 1998, Aigner e cols. demonstraram em linhagem de carcinoma mamário KS, que caracteristicamente é positiva para CD24 e negativa para PSGL-1, que o CD24 foi capaz de substituir a PSGL-1 na capacidade de adesão. (189) Dessa forma, inferiu-se que células de carcinoma mamário CD24⁺ teriam maior capacidade de se ligarem às plaquetas e ao endotélio, facilitando o processo de metástase e, conseqüentemente, indicando um mau prognóstico (figura 7).

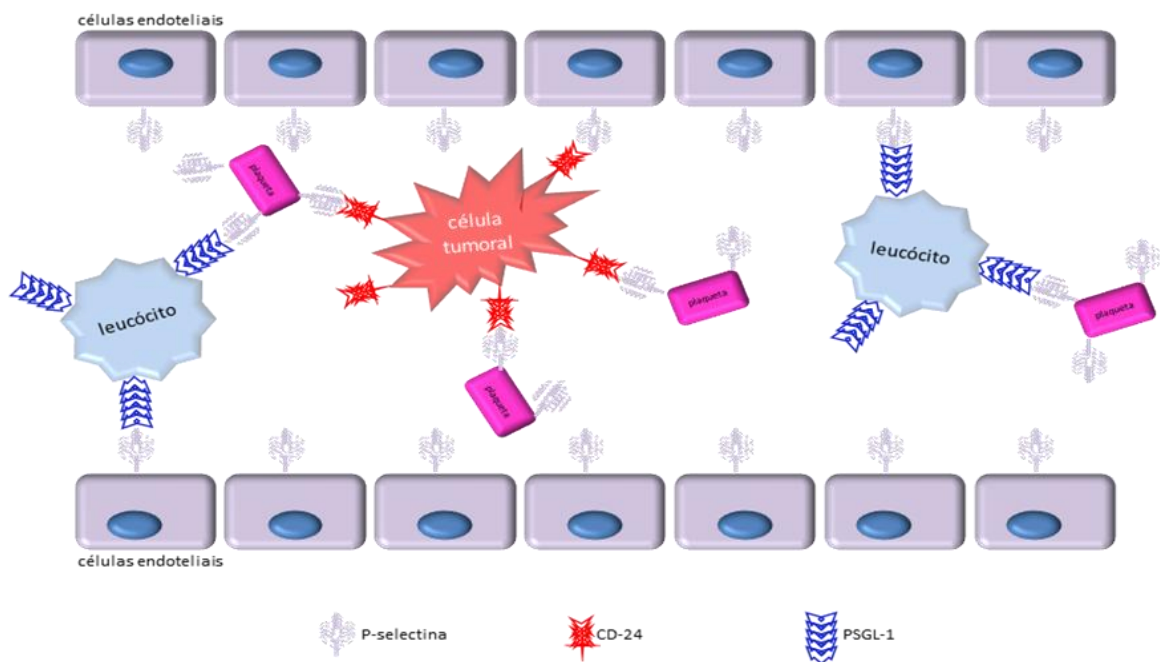


Figura 7: CD24, P-selectina e PSGL-1.

Em 1999, Fogel e cols. concluíram, por citometria de fluxo, que a intensidade da positividade imuno-histoquímica para este anticorpo se correlacionou com o aumento do grau histológico tumoral. (190)

Utilizando técnicas genéticas para correlacionar o CD24 com a invasibilidade do carcinoma mamário, Schindelman e cols., em 2002, identificaram expressão fraca ou negativa do CD24 em nove das 12 (75%) linhagens de carcinomas invasivos e em três das 13 (23%) linhagens não invasivas (191).

Em 2003, Kristiansen e cols. estudaram 201 casos de câncer de mama e deduziram que a positividade IH para o CD24 (em qualquer nível), o grau tumoral e as metástases nos linfonodos regionais foram fatores prognósticos negativos independentes (análise multivariada) para a sobrevida livre de doença. (192)

Baumann e cols., em 2005, observaram por meio de modelos experimentais e imunofluorescência, a associação positiva da expressão do CD24 com o crescimento tumoral e maior capacidade invasora e metastática dos carcinomas mamários. (188)

Bircan e cols., em 2006, estudando a expressão imuno-histoquímica do CD24 (qualquer positividade) no tecido mamário normal e nos carcinomas (invasores e *in situ*) de mama, identificaram um claro aumento da expressão de CD24 com a transformação e a progressão biológica maligna tumoral. (193)

Surowiak e cols, em 2006, através da expressão imuno-histoquímica de CD24 em carcinomas mamários, encontraram uma associação positiva entre a expressão de CD24 e a negatividade para receptores de estrógeno, sendo o CD24 indicativo de baixa sobrevida global na análise multivariada. Neste estudo, o ponto de corte para a positividade imuno-histoquímica do CD24 foi 10%. (194)

Em um estudo grego de 2009, qualquer positividade tumoral para o CD24 na imuno-histoquímica também foi associada a um efeito negativo na sobrevida. (195)

Em 2010, estudando 183 casos de carcinoma de mama, Kristiansen e cols. identificaram a associação positiva da expressão imuno-histoquímica de CD24 (definida como fraca, moderada ou forte) com a presença de metástase nos linfonodos regionais. (196)

Em 2012, em um estudo brasileiro, Bernardi e cols. identificaram que a expressão imuno-histoquímica de CD24 foi a mais frequente em carcinomas RE e

RP positivos. Além disso, observaram que essa expressão correlacionou-se positivamente com o índice proliferativo (Ki-67) e negativamente com a sobrevida livre de doença. (197)

2.4 O antígeno de superfície celular CD44

No início da década de 90, ao mesmo tempo em que se iniciavam os estudos com o CD24, também surgiam trabalhos envolvendo o CD44, uma glicoproteína de membrana, com localização genética em 11p13, que atua como uma molécula de adesão e se constitui no maior receptor para o ácido hialurônico (AH). (198, 199). O AH está presente na matriz extracelular de vários tecidos e tem papel importante na migração celular, na angiogênese, na inflamação, na cicatrização e no remodelamento. (200) Esses efeitos são mediados através de receptores de superfície como o CD44, o LYVE-1, a Lialina e o RHAMM. (201-203) Entre eles, o CD44 atua ativamente em diversos processos biológicos e patológicos como a cinética dos linfócitos, a ativação de linfócitos T, a cicatrização, a angiogênese e a capacidade metastática tumoral. (204-206)

A porção extracelular da molécula do CD44 é capaz de intermediar uma adesão flexível das células com a matriz extracelular e a arquitetura do tecido, sendo que a sua porção intracitoplasmática interage e regula o citoesqueleto celular. Já se verificou também que tumores - com acentuada taxa de crescimento e alta capacidade invasora - têm apresentado altas concentrações de AH, o que tem sido correlacionado ao CD44 e à maior agressividade tumoral. (207-212)

O CD44 é uma molécula com diversas isoformas e todas essas estão codificadas em apenas um gene do cromossomo 11. (213) Este gene que codifica o

CD44 humano é composto por 20 exons; a porção extracelular do CD44 pelos exons 1 a 17, a porção transmembrana pelo exon 18 e a porção intracitoplasmática pelos exons 19 e 20. (214) Os exons 6 a 14 são os que codificam, através de sequências variáveis de proteínas do gene CD44, as isoformas CD44v2 a CD44v10, que são as formas variantes do CD44 (CD44v). Várias dessas isoformas têm sido exhaustivamente estudadas na literatura, algumas delas associadas a neoplasias humanas, inclusive o câncer de mama. (214-232) A maioria das células humanas e os carcinomas mamários expressam, contudo, a isoforma do CD44 denominada *standard* (CD44s), na qual não há alterações na porção extracelular da proteína (figura 8). (199, 233)

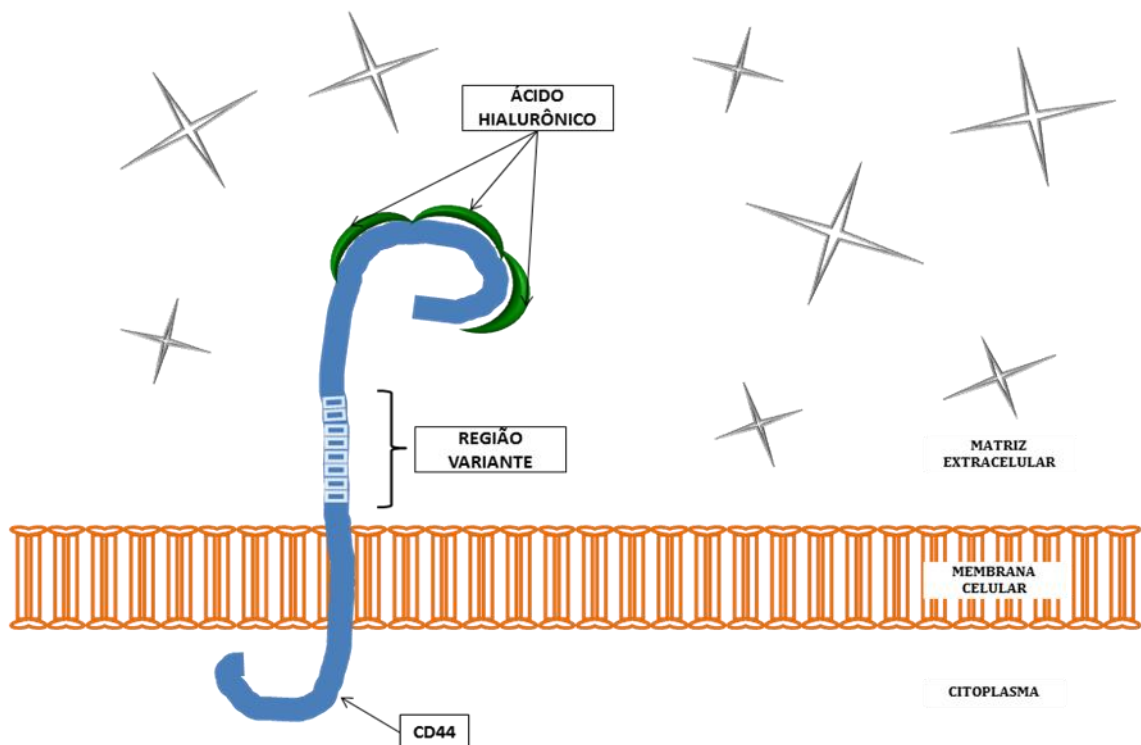


Figura 8: CD44.

A relação do CD44 com a oncogênese não é nova. Em 1991, Hofmann e cols. descreveram uma isoforma do CD44, utilizando PCR, que foi associada com o desenvolvimento de potencial metastático em uma linhagem de carcinomas não metastáticos (inicialmente) em ratos. (234)

Tanabe e cols., em 1993, demonstraram também por PCR que células da linhagem MCF-7 eram capazes de expressar diferentes isoformas do CD44 conforme tratadas com ácido hialurônico. (235)

Joensuu e cols, também em 1993, porém através de técnica imuno-histoquímica, observaram correlação positiva do CD44 (considerada apenas quando mais de 50% das células eram positivas) com tumores mamários humanos de maior agressividade (grau 3, alto índice mitótico e receptor estrogênico negativo). Essa associação não se manteve, entretanto, nos modelos de análise multivariada. (236)

lida e cols, em 1995, identificaram por imuno-histoquímica e confirmação por PCR, que a forma CD44s está hiperexpressa nos carcinomas mamários humanos metastáticos. (237)

Em 1995, de la Torre, através do exame imuno-histoquímico, verificou a expressão de CD44 em 21 dos 52 carcinomas do seu estudo. Não conseguiu, contudo, correlacionar a positividade tumoral para o CD44 com fatores neoplásicos de pior prognóstico e à capacidade metastática ganglionar. (238)

Lizak e cols, em 1997, também utilizando exame imuno-histoquímico para CD44s, identificaram que a expressão de CD44s nos carcinomas mamários precoces (T1a e T1b) com linfonodos axilares positivos foi menor (11%) do que nos tumores de mesmo tamanho, porém com linfonodos negativos (65%). (239) Neste mesmo estudo, a expressão de CD44v6 não divergiu nos dois grupos.

Em 1999, Foekens e cols. verificaram positividade (qualquer expressão)

imuno-histoquímica para CD44 entre 39% e 65% na sua série de 467 carcinomas mamários, demonstrando resultados semelhantes aos do grupo pesquisado por de la Torre. Observaram inclusive melhor prognóstico para os carcinomas mamários positivos para CD44v6 e sem metástases ganglionares, tanto em análise uni quanto multivariada. (240)

Os grupos de Lackner e de Kopp verificaram ainda que a fração sérica solúvel do CD44 (sCD44), quando aumentada, estava associada a carcinoma mamário metastático. (213, 241)

Morris e cols, em 2001, em estudo de coorte com 109 carcinomas de mama em estágio 2 e acompanhados consecutivamente durante cinco anos, não identificaram associação de CD44s e nem do CD44v6, quando positivo em mais de 10% das células, com a sobrevida livre de doença e a sobrevida global. (242)

Em 2003, Berner e cols, estudaram a expressão imuno-histoquímica, controlada por PCR, do CD44s e suas isoformas. Em 110 casos de carcinomas mamários, 66 casos (60%) foram positivos para CD44s, sendo qualquer positividade para o anticorpo aceita, porém subdividido em três níveis de intensidade. Por PCR, houve associação positiva do CD44s com baixo grau tumoral, maior sobrevida livre de doença e maior sobrevida global, contudo, através da imuno-histoquímica, os autores não conseguiram demonstrar os mesmos resultados com nenhum dos anticorpos empregados no estudo. (243)

Diaz e cols, em 2005, estudaram a expressão imuno-histoquímica do CD44s em uma coorte de pacientes com carcinoma mamário negativo para linfonodos axilares. A expressão alta de CD44s (maior que 10% e forte) foi um fator prognóstico favorável nas pacientes estudadas. Na análise multivariada, a expressão alta de CD44 foi associada com maior sobrevida livre de doença e maior sobrevida global.

(244) Com resultados semelhantes, e no mesmo ano, Lopez e cols. publicaram um estudo experimental em que observaram que a expressão de CD44 por imunofluorescência estava associada a um perfil tumoral mais favorável. (245) Nesse estudo, a perda da expressão de CD44 foi associada ao maior número de metástases pulmonares.

Afify e cols., em 2008, estudando o CD44s por imuno-histoquímica e considerando positivo quando pelo menos 10% das células expressavam esse anticorpo, verificaram que na mama normal, na hiperplasia ductal e nos carcinomas mamários *in situ* e invasores, havia a perda progressiva da expressão desta proteína, à medida que aumentava o “desvio da normalidade” das lesões. (246)

2.5 Os antígenos de superfície celular CD44 e CD24

Como se pôde observar, os dados atualmente disponíveis sobre a relação dos receptores CD44 e CD24 com o câncer de mama, especialmente quando estes dois marcadores são estudados isoladamente, têm fornecido resultados contraditórios.

As discrepâncias observadas nesses estudos devem-se, em parte, ao emprego de diferentes técnicas diagnósticas, ao uso de diferentes anticorpos (clones) no exame imuno-histoquímico, a diferentes tamanhos de amostras, à heterogeneidade tumoral e, sobretudo, ao agrupamento de diferentes subtipos de carcinomas mamários (tumores não selecionados), isto é, tumores luminais, basais, HER2 positivos, etc, em uma mesma amostra.

Portanto, como será abordado a seguir, a associação do CD44 e do CD24 com o câncer de mama tem resultado, na última década, em trabalhos reveladores e muito promissores.

2.6 As células-tronco tumorais da mama e o perfil CD44⁺/CD24^{-/low}

Em 2003, um trabalho científico pioneiro utilizando uma pequena população de carcinomas mamários humanos em cultura, pré-selecionadas por citometria de fluxo, a partir do perfil CD44⁺/CD24^{-/low}/B38.1/ESA⁺/Lin⁻, demonstrou, pela primeira vez e de forma prospectiva, o desenvolvimento prospectivo experimental do carcinoma mamário humano (uma “neoplasia sólida”) a partir de CTTs mamárias. O antígeno mamário B38.1, o antígeno epitelial específico (ESA) e os anticorpos marcadores de linhagem (Lin) foram utilizados para purificar as populações de células cancerígenas mamárias. Após essa purificação inicial, estabeleceram-se quatro grupos de acordo com a expressão de CD44 e CD24 e verificou-se que as células-tronco tumorais humanas CD44⁺/CD24^{-/low} foram capazes de gerar novos tumores, com a semelhante heterogeneidade do tumor original, a partir de um transplante (inoculação) em ratos imunossuprimidos (*NOD/SCOD mice*). (48) Neste mesmo estudo, as populações celulares com perfis diferentes do CD44⁺/CD24^{-/low} praticamente não resultaram em crescimentos tumorais. As linhagens de carcinoma humanos utilizadas pelos autores não foram submetidas a teste de perfil genético.

A partir do estudo de Al-Hajj e cols., observou-se enriquecimento rápido da literatura médica sobre o tema das CTTs e o câncer de mama, sendo o perfil CD44⁺/CD24⁻ invariavelmente utilizado como “assinatura” para as CTTs mamárias. (39, 52, 54-57, 59-65, 247-253)

Cerca de três anos após a publicação de Al-Hajj e cols., Sheridan e cols., em outro estudo experimental envolvendo modelos animais (ratos), linhagens de células tumorais e citometria de fluxo, utilizaram essa mesma “configuração” de CTTs (CD44⁺/CD24⁻), porém sem a graduação *low* para o CD24, e correlacionaram-na com um incremento da capacidade invasora tumoral, sugerindo um primeiro passo

em direção à metástase. (55) Observou-se também que o perfil dos tumores dos sítios tumorais primários era semelhante ao dos sítios metastáticos, isto é $CD44^+/CD24^-$. Neste estudo, a propriedade invasiva das neoplasias não pareceu ter correlação com a atividade do gene que regula a molécula do CD24, cuja negatividade, obviamente, sugere a inatividade tanto do referido gene regulador quanto da molécula CD24. Verificou-se também que numa mesma linhagem celular neoplásica $CD44^+$, quando o CD24 estava expresso ($CD24^+$), isto é “funcionante”, havia perda da capacidade invasora. Assim, o perfil $CD44^+/CD24^-$ parece ser mais um imunofenótipo das CTTs e os verdadeiros genes que propiciam a capacidade invasora ainda não estão bem determinados.

Filmore e cols., em 2008, utilizando um delineamento muito semelhante ao do estudo do grupo de Sheridan, chegaram a resultados semelhantes, conseguindo demonstrar maior resistência das células com o perfil $CD44^+/CD24^{-/low}$ ao efeito de quimioterápicos. (254)

Em um estudo de Liu e cols., através da pré-seleção e comparação genética de células $CD44^+/CD24^{-/low}$ tumorais mamárias e células mamárias normais, foram identificados 186 genes, denominados “assinatura genética de invasibilidade” e associados fortemente com pior sobrevida livre de doença e maior mortalidade. (52)

Em outro estudo, utilizando técnica de dupla coloração imuno-histoquímica por TMA e controle de observação automatizado, demonstrou-se que 22% dos tumores estudados continham uma quantidade estimada maior ou igual a 10% de células mamárias progenitoras tumorais $CD44^+/CD24^{-/low}$. (54) Nesse mesmo trabalho, os tumores que continham um número “elevado” ($\geq 10\%$) de células mamárias tumorais $CD44^+/CD24^{-/low}$ resultaram em mais metástases a distância. A

sobrevida global, contudo, não foi significativamente diferente no grupo de carcinomas com mais células CD44⁺/CD24^{-/low}.

Em 2008, Mylona e cols. publicaram um estudo controvertido utilizando dupla coloração imuno-histoquímica e análise de imagem computadorizada para identificar e correlacionar o perfil CD44⁺/CD24^{-/low} com os aspectos clínico-patológicos e prognósticos. (57) Neste trabalho, em 155 casos de câncer de mama, o padrão CD44⁺/CD24^{-/low} (com ponto de corte em 10%) foi mais prevalente em carcinomas de melhor apresentação clínica (sem metástases ganglionares e em estágios precoces) e indicou melhor prognóstico associado à presença de CTTs.

Embora não tão avançados como na mama, também há estudos sobre a associação dos marcadores CD44 e CD24 e sua relação com outras linhagens tumorais como carcinomas de pâncreas e vias biliares, estômago, próstata, cólon, ovário e de cabeça e pescoço. (255-268)

2.7 As células-tronco tumorais CD44⁺/CD24^{-/low} e o subtipo basal

Um detalhe do estudo experimental de Sheridan e cols., anteriormente exposto, trouxe importante contribuição em relação ao estudo das células-tronco tumorais e os carcinomas mamários basais. No trabalho, mesmo após a pré-seleção celular (CD44⁺/CD24^{-/low}) de todas as treze linhagens diferentes dos carcinomas mamários estudados, nem todas revelaram capacidade metastática. Algumas linhagens de carcinomas mamários mostraram-se mais metastáticas do que outras, mesmo após a pré-seleção pelos marcadores CD44 e CD24. (55)

Foi verificado que as linhagens cujas CTTs CD44⁺/CD24^{-/low} tinham maior capacidade metastática exibiam a “assinatura genética” de carcinomas mamários não luminais. Das linhagens tumorais mamárias estudadas por Sheridan, as que

continham números significativos de CTTs CD44⁺/CD24^{-/low} eram todas de perfil molecular tipo carcinoma basal, mioepitelial ou mesenquimal, e as que expressavam o padrão CD44⁻/CD24⁺ correspondiam ao perfil luminal. (55) Portanto, o padrão imunofenotípico da célula-tronco tumoral mamária “tipo carcinoma basal” parece realmente ser o CD44⁺/CD24^{-/low}. Neste estudo de Sheridan, as diferentes linhagens de células tumorais não foram submetidas ao exame imuno-histoquímico para essa correlação.

Em 2008, Honeth e cols. estudaram 240 carcinomas de mama por dupla coloração imuno-histoquímica em TMA, sendo utilizados dois a três cilindros tumorais para cada caso. (59) O ponto de corte para positividade ocorreu a partir de 1% para CD44 e CD24, maior que 10% para EGFR e maior que 20% para um coquetel basal (CK5, CK14 e p63). Dos 240 casos estudados, 44 foram triplonegativos (RE, RP e HER2 negativos) e, destes, 30 (68%) foram positivos para os marcadores basais. A positividade para CD44, isoladamente, foi significativamente maior no subtipo basal, com 19 (63%) casos positivos, quando comparado com o restante dos subtipos tumorais, inclusive os TN não-basais (incluindo a negatividade para CK14). O CD24 foi menos frequente no subtipo basal, com 12 (40%) casos positivos e 18 (60%) negativos, porém não diferiu entre os grupos. Já no subgrupo TN não basal, o CD44 foi positivo em três (21%) casos e negativo em 11 (78%) e o CD24 foi positivo em cinco (36%) casos e negativo em nove (64%). Posteriormente, foi analisado o perfil CD44⁺/CD24⁻ observando-se 19 casos basais positivos (63%) e 11 negativos (37%). Entre os tumores “hexanegativos”, o perfil CD44⁺/CD24⁻ foi positivo em três (21%) casos e negativo em 11 (79%), resultando em diferença significativa. Através de comparação por histogenética (disponível para 69 casos), os autores evidenciaram ainda que o perfil

CD44⁺/CD24⁻ associou-se positivamente com o perfil genético basal, ressaltando-se, porém, que isso aconteceu apenas quando os níveis de positividade imuno-histoquímica foram elevados para 50%. Não houve associação do perfil CD44⁺/CD24⁻ com as variáveis patológicas e os desfechos clínicos importantes.

Em 2010, Park e cols. estudaram 193 casos de carcinomas ductais de mama por dupla coloração imuno-histoquímica em TMA ou cortes inteiros. Utilizando um ponto de corte de 10% para CD44 e CD24, o perfil CD44⁺/CD24⁻ foi expresso em 69% dos casos e em 100% dos carcinomas basais, estes definidos pela expressão de citoqueratinas basais (CK5/6, CK14 e CK17). O grupo de Park não fez comparações prognósticas entre os diferentes grupos. (269)

Giatromanolaki e cols., em 2011, estudaram 139 casos de câncer de mama com relação ao fenótipo imuno-histoquímico CD44⁺/CD24⁻ e triplonegativo. Os casos foram considerados positivos com escore maior que 10% para CD44 e CD24, porém para RE e RP, o escore mínimo de positividade foi de 20%; o ponto de corte para o HER-2 foi de 30%. A expressão isolada de CD44 foi associada à presença de metástase nos linfonodos, independentemente da expressão do CD24. Os autores verificaram forte associação do perfil CD44⁺/CD24⁻ com o fenótipo imuno-histoquímico triplonegativo, porém sem associação com a sobrevida, e não houve investigação específica para subtipo basal. Neste trabalho, o perfil CD44⁻/CD24⁻, o estágio dos linfonodos e o perfil triplonegativo mostraram-se indicadores independentes de mau prognóstico na análise multivariada. (60)

Em um estudo semelhante ao anterior, Kim e cols. analisaram 643 casos de carcinoma de mama por TMA e imuno-histoquímica, e o critério de positividade para CD44 e CD24 foi maior que 10%. Na análise multivariada, o perfil CD44⁺/CD24⁻ e a expressão de CD44, isolada, não se mostraram significativos em relação à

sobrevida livre de doença e à mortalidade. A expressão de CD24, entretanto, foi associada negativamente com a sobrevida global. Não houve investigação específica para os carcinomas basais. (62)

Um grupo de Portugal, liderado por Ricardo, publicou trabalho sobre as CTTs mamárias baseando-se no perfil CD44, CD24 e ALDH1. (63) O ponto de corte para a positividade do CD44 e CD24 - coloração simples na imuno-histoquímica - foi acima de 10%, entretanto, para incluir o nível *low* na contagem do CD24, os casos com até 25% de células positivas foram considerados de baixa expressão. As positivities de CD44 e de CD24 foram controladas por dupla coloração e citometria de fluxo. Neste estudo, foram arrolados 466 tumores de mama, sendo identificados 68 (14,6%) carcinomas basais (positivos para CK5 e/ou EGFR em pelo menos 1% das células) e 22 (4,7%) carcinomas pentanegativos. O CD44, isoladamente, expressou-se em 55 (80,9%) dos carcinomas basais; o CD24 negativo/baixo foi identificado em 64 (94,1%) dos basais. A expressão de CD44 foi associada com a presença de metástase nos linfonodos ($p=0,006$), com a expressão de EGFR ($p=0,006$) e a expressão de CK5 ($p=0,006$). O CD24, ao contrário, não se associou a nenhuma das variáveis em estudo. (63) Em relação ao perfil CD44⁺/CD24^{-/low}, a expressão geral nos 466 tumores do estudo foi de 45,3%, havendo resultado estatisticamente significativo para a negatividade dos linfonodos ($p=0,008$) e para a positividade da CK5 ($p<0,0001$). Para o HER1, não houve associação ($p=0,184$). Na análise univariada e multivariada, o perfil CD44⁺/CD24^{-/low} não mostrou resultado significativo para a sobrevida livre de doença e nem para a sobrevida global.

Recentemente, Idowu e cols. publicaram outro estudo envolvendo a técnica imuno-histoquímica, as CTTs mamárias e os carcinomas triplonegativos de mama. (64) Foram agrupados 50 carcinomas de mama, analisados para o perfil

triplonegativo e para a expressão de CD44 e CD24. O perfil CD44⁺/CD24⁻ foi considerado a partir da positividade do CD44 em 10% das células coradas com intensidade 2+ e CD24 0+ ou 1+. O perfil CD44⁺/CD24^{low} foi considerado a partir da positividade do CD44 e do CD24 em 10% das células coradas com intensidade 2+, porém com razão de 4:1, respectivamente. Após as censuras, dos 45 casos restantes, 15 foram do fenótipo TN. Nos resultados, os autores identificaram associação positiva dos carcinomas TNs com o perfil CD44⁺/CD24^{-/low}, nove casos em 15 (60%), quando comparados com os demais grupos de carcinomas, oito em 30 casos (26,7%). Tanto carcinomas TNs quanto o perfil CD44⁺/CD24^{-/low} foram associados ao grau tumoral 3, à maior recorrência e a mais metástases, quando comparados com o grupo não triplonegativo (RE ou HER2 positivos). Não houve investigação específica para os carcinomas basais. (64)

Ainda mais recentemente, Ahmed e cols. publicaram uma série de 1036 casos de câncer de mama, em que a expressão de CD44 foi de 76,9% (80/104) carcinomas basais e de 78,2% (36/46) triplonegativos não basais. Para os mesmos subtipos tumorais, a expressão de CD24 foi de 93,9 (108/115) e 95,9% (47/49), respectivamente. Ambos os marcadores CD44 e CD24 não se expressaram de forma diferente entre esses subgrupos tumorais e o perfil CD44⁺/CD24^{-/low} foi associado com o melhor prognóstico entre todos os tumores de mama do estudo (carcinomas não selecionados). (270)

Na maioria dos estudos revisados, a expressão de CD44 é comprovadamente menor nas células luminais mais diferenciadas, assim como nos tumores mamários mais bem diferenciados e HER2 positivos. Conseqüentemente, o CD44 positivo em alguns tumores, em princípio, reflete a sua derivação de células indiferenciadas com características de células-tronco (224). Em alguns estudos sobre metástases de

carcinoma mamário, a expressão de CD44 esteve quase sempre presente nas células do sítio metastático. (215-217, 271); em outros, porém, tal situação não se verificou. (247, 272) O papel do CD24 como pré-requisito de uma célula-tronco tumoral, por outro lado, é atualmente mais controverso, pelo menos no que se refere especificamente aos tumores com perfil basal, uma vez que a sua ausência, teoricamente, sugere menor adesão tumoral ao endotélio.

2.8 As “coleções microscópicas de tecido” (*tissue microarrays*)

Antes da aplicação prática na clínica oncológica, um marcador prognóstico e preditivo de resposta à terapêutica necessita obrigatoriamente ser estudado por meio de grandes ensaios clínicos, em larga escala, com a avaliação de centenas ou milhares de amostras de tecido associadas a informações clínicas fidedignas, o que notoriamente consome grande quantidade de tempo e de recursos.

Por meio da introdução de tecnologias genômicas e proteômicas em larga escala, a translação da investigação básica para a aplicação clínica tem obtido grandes vantagens. Por exemplo, em uma única avaliação de *DNA microarray* é possível determinar a expressão de 50.000 genes humanos. (273) Essas avaliações, no entanto, além de consumirem muito tempo e de serem laboriosas, habitualmente necessitam da disponibilidade de tecido fresco, o que é fator limitante da sua utilização em grandes estudos clínicos.

As “coleções microscópicas de tecido” (*tissue microarrays*) têm a vantagem de utilizar pequenas quantidades de tecido fixado com até 4 a 5 micrômetros de espessura e incluir centenas de amostras em um mesmo bloco de parafina, sobrepondo-se facilmente às avaliações da expressão gênica por RNA, em termos de rapidez e de menores custos. Na construção de um bloco de TMA, são colhidos

cilindros de tecido com diâmetros variáveis a partir de muitos blocos primários (doadores) e colocados em um único bloco de *microarray* (receptor). Os cortes obtidos a partir desses blocos podem então ser utilizados para análise simultânea de múltiplos tumores em uma mesma lâmina de imuno-histoquímica. (274-277)



Figura 9: lâminas de TMA desta tese (CK5/6, HER1, CD44 e CD24).

A possibilidade de miniaturizar a análise dos tecidos, além de diminuir o tempo consumido na análise, também facilita a homogeneização e a interpretação dos resultados. Devido à presença de várias amostras de diferentes tumores em uma mesma lâmina, há óbvia facilidade ao patologista na observação e na comparação dos diferentes níveis de expressão dos marcadores tumorais. Somado a isso, a coloração de uma única lâmina de TMA também proporciona maior grau de consistência e homogeneização dos resultados do que a coloração de diversas lâminas individuais, onde pequenas diferenças na técnica podem acarretar discretas flutuações na expressão dos marcadores em nível tecidual. A limitação mais óbvia

da técnica de TMAs é a amostragem de tumores grandes, possivelmente heterogêneos. A heterogeneidade dos tumores é habitualmente observada quer em nível morfológico, quer em nível genético. Essa heterogeneidade representa a instabilidade dos tumores e é um dos conceitos básicos da atual teoria da evolução clonal do câncer e das células-tronco tumorais. (278-281)

3. JUSTIFICATIVA PARA A REALIZAÇÃO DO ESTUDO

Um dos subtipos de cânceres mamários de pior prognóstico é o basal. A técnica de diagnóstico genético por múltiplas comparações (*DNA microarray*) é onerosa, não faz parte do rol de exames oferecidos pelo Sistema Único de Saúde e não está disponível para a grande maioria da população brasileira.

Na prática diária da anatomia patológica no Brasil, dentro dos laboratórios de patologia, o carcinoma mamário basal de mama só pode ser verificado através do exame imuno-histoquímico da neoplasia, verificado pela positividade para a CK 5/6 e/ou o HER1, a partir de um carcinoma triplonegativo. A prevalência do subtipo basal, segundo a literatura, varia entre 7 e 19% o que não é, absolutamente, desprezível. Ainda há um subgrupo menor de carcinomas denominados pentanegativos (“triplonegativos não basais”), cujo prognóstico tem se mostrado melhor que o dos carcinomas basais em estudos de grande porte. Em nosso meio, entre as pacientes atendidas no Hospital de Clínicas de Porto Alegre, não há dados publicados sobre essas frequências.

A determinação do melhor perfil imuno-histoquímico para o diagnóstico do carcinoma basal de mama, separando-o do TN, será um grande avanço no sentido de proporcionar diagnósticos e prognósticos mais corretos, baratos e acessíveis à grande maioria da população, mesmo que ainda não haja uma terapêutica diferenciada. No mesmo sentido, a expressão de marcadores imuno-histoquímicos de células-tronco tumorais mamárias (CD44 e CD24), que comprovadamente estão associados a prognósticos piores nas pacientes com carcinoma basal de mama, ainda não foram adequadamente estudados nos carcinomas pentanegativos. O

conjunto dos resultados buscados neste estudo poderá também contribuir para o melhor entendimento dos carcinomas basais e pentanegativos, cujo manejo oncológico necessita de estratégias diferenciadas de tratamento. Tal conhecimento poderá ser de grande valor na busca de futuras opções terapêuticas.

4. OBJETIVOS

4.1 Primários

Verificar a prevalência de carcinomas basais e pentanegativos, numa amostra de carcinomas mamários triplonegativos.

Verificar a prevalência da expressão de CD44, CD24 e o perfil CD44/CD24 em carcinomas basais e pentanegativos, numa amostra de carcinomas mamários triplonegativos.

4.2 Secundários

Avaliar as associações destes subgrupos de tumores (basais e pentanegativos) com a idade de início da doença e fatores prognósticos anatomopatológicos: tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico tumoral, presença de invasão vascular e estágio dos linfonodos axilares.

Avaliar as associações destes subgrupos de tumores (basais e pentanegativos) com os desfechos clínicos (sobrevida livre de doença e sobrevida global).

Avaliar as associações entre a expressão de CD44, de CD24 e o perfil CD44/CD24 com a idade de início da doença e fatores prognósticos anatomopatológicos: tipo histológico, tamanho do tumor, grau histológico tumoral, presença de invasão vascular e estágio dos linfonodos axilares.

Avaliar associações entre a expressão de CD44, de CD24 e o perfil CD44/CD24 com os desfechos clínicos (sobrevida livre de doença e sobrevida global).

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9212-7. PubMed PMID: 10430922. Epub 1999/08/04. eng.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602. Epub 2000/08/30. eng.
3. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74. PubMed PMID: 11553815. Epub 2001/09/13. eng.
4. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23. PubMed PMID: 12829800. Epub 2003/06/28. eng.
5. Viale G. Histopathology of primary breast cancer 2003. *Breast*. 2003 Dec;12(6):391-6. PubMed PMID: 14659111. Epub 2003/12/09. eng.
6. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5367-74. PubMed PMID: 15328174. Epub 2004/08/26. eng.
7. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):25-32. PubMed PMID: 17146782.
8. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34. PubMed PMID: 17671126. Epub 2007/08/03. eng.
9. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec;6(12):718-30. PubMed PMID: 19942925. Epub 2009/11/28. eng.
10. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010 Jan;220(2):263-80. PubMed PMID: 19927298. Epub 2009/11/21. eng.

11. Carvalho FM, Bacchi LM, Santos PP, Bacchi CE. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics (Sao Paulo)*. 2010;65(10):1033-6. PubMed PMID: 21120307. Epub 2010/12/02. eng.
12. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):192-208. PubMed PMID: 20452298. Epub 2010/05/11. eng.
13. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011 Nov 19;378(9805):1812-23. PubMed PMID: 22098854. Epub 2011/11/22. eng.
14. McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst*. 1991 Feb 6;83(3):154-5. PubMed PMID: 1988696. Epub 1991/02/06. eng.
15. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991 Nov;19(5):403-10. PubMed PMID: 1757079. Epub 1991/11/01. eng.
16. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1992 Jun;20(6):479-89. PubMed PMID: 1607149. Epub 1992/06/01. eng.
17. Reynolds T. Breast cancer prognostic factors--the search goes on. *J Natl Cancer Inst*. 1994 Apr 6;86(7):480-3. PubMed PMID: 8133528. Epub 1994/04/06. eng.
18. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol*. 1999 Aug;31(3):209-23. PubMed PMID: 10532196. Epub 1999/10/26. eng.
19. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jun;134(6):907-22. PubMed PMID: 20524868. Epub 2010/06/09. eng.
20. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18-43. PubMed PMID: 19548375. Epub 2007/01/01. eng.
21. Irvin WJ, Jr., Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer*. 2008 Dec;44(18):2799-805. PubMed PMID: 19008097. Epub 2008/11/15. eng.

22. Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol.* 2007 Mar;8(3):235-44. PubMed PMID: 17329194. Epub 2007/03/03. eng.
23. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 Nov 11;363(20):1938-48. PubMed PMID: 21067385. Epub 2010/11/12. eng.
24. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329-34. PubMed PMID: 17438091. Epub 2007/04/18. eng.
25. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer.* 2009 Sep;45 Suppl 1:27-40. PubMed PMID: 19775602. Epub 2009/09/25. eng.
26. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 2008 Jan;52(1):108-18. PubMed PMID: 18171422. Epub 2008/01/04. eng.
27. Pauletti G, Godolphin W, Press MF, Slamon DJ. Detection and quantitation of HER-2/neu gene amplification in human breast cancer archival material using fluorescence in situ hybridization. *Oncogene.* 1996 Jul 4;13(1):63-72. PubMed PMID: 8700555. Epub 1996/07/04. eng.
28. Dairkee SH, Mayall BH, Smith HS, Hackett AJ. Monoclonal marker that predicts early recurrence of breast cancer. *Lancet.* 1987 Feb 28;1(8531):514. PubMed PMID: 2881076. Epub 1987/02/28. eng.
29. Dairkee SH, Puett L, Hackett AJ. Expression of basal and luminal epithelium-specific keratins in normal, benign, and malignant breast tissue. *J Natl Cancer Inst.* 1988 Jul 6;80(9):691-5. PubMed PMID: 2453676. Epub 1988/07/06. eng.
30. Turner NC, Reis-Filho JS. Genetic heterogeneity and cancer drug resistance. *Lancet Oncol.* 2012 Apr;13(4):e178-85. PubMed PMID: 22469128. Epub 2012/04/04. eng.
31. Niskanen EE, Arley N. A Stochastic Model of Carcinogenesis Compared with Mouse Skin Tumour Enhancement after Gastric Instillation of 9,10-Dimethyl-1,2-Benzanthracene with Subsequent Local Continuous Exposure to 'Tween 40'. *Nature.* 1963 Jul 6;199:83-4. PubMed PMID: 14047957. Epub 1963/07/06. eng.
32. Kreyberg HJ. Empirical relationship of lung cancer incidence to cigarette smoking and a stochastic model for the mode action of carcinogens. *Biometrics.* 1965 Dec;21(4):839-57. PubMed PMID: 5859857. Epub 1965/12/01. eng.
33. Iyer KS, Saksena VN. A stochastic model for the growth of cells in cancer. *Biometrics.* 1970 Sep;26(3):401-10. PubMed PMID: 5480658. Epub 1970/09/01. eng.

34. Walker MR, Patel KK, Stappenbeck TS. The stem cell niche. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):169-80. PubMed PMID: 19089901. Epub 2008/12/18. eng.
35. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1883-90; discussion 95-6. PubMed PMID: 16488983. Epub 2006/02/21. eng.
36. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science.* 1976 Oct 1;194(4260):23-8. PubMed PMID: 959840. Epub 1976/10/01. eng.
37. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Jul;51(1):1-28. PubMed PMID: 15207251. Epub 2004/06/23. eng.
38. Bonnet D, Dick JE. Human acute myeloid leukemia is organized as a hierarchy that originates from a primitive hematopoietic cell. *Nat Med.* 1997 Jul;3(7):730-7. PubMed PMID: 9212098. Epub 1997/07/01. eng.
39. Balic M, Lin H, Young L, Hawes D, Giuliano A, McNamara G, et al. Most early disseminated cancer cells detected in bone marrow of breast cancer patients have a putative breast cancer stem cell phenotype. *Clin Cancer Res.* 2006 Oct 1;12(19):5615-21. PubMed PMID: 17020963. Epub 2006/10/06. eng.
40. Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. Breast cancer stem cells. *Breast Cancer.* 2009 Apr;17(2):80-5. PubMed PMID: 19806428. Epub 2009/10/07. eng.
41. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006 Sep 21;355(12):1253-61. PubMed PMID: 16990388. Epub 2006/09/23. eng.
42. Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer.* 2006 Jun;42(9):1219-24. PubMed PMID: 16624548. Epub 2006/04/21. eng.
43. Polyak K. Breast cancer stem cells: a case of mistaken identity? *Stem Cell Rev.* 2007 Jun;3(2):107-9. PubMed PMID: 17873341. Epub 2007/09/18. eng.
44. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle.* 2007 Oct 1;6(19):2332-8. PubMed PMID: 17786053. Epub 2007/09/06. eng.
45. Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10(4):210. PubMed PMID: 18671830. Epub 2008/08/02. eng.
46. Cariati M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. *Histopathology.* 2008 Jan;52(1):99-107. PubMed PMID: 18171421. Epub 2008/01/04. eng.
47. Lapidot T, Sirard C, Vormoor J, Murdoch B, Hoang T, Caceres-Cortes J, et al. A cell initiating human acute myeloid leukaemia after transplantation into SCID mice. *Nature.* 1994 Feb 17;367(6464):645-8. PubMed PMID: 7509044. Epub 1994/02/17. eng.

48. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Apr 1;100(7):3983-8. PubMed PMID: 12629218. Epub 2003/03/12. eng.
49. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature*. 2012 Jan 19;481(7381):306-13. PubMed PMID: 22258609. Epub 2012/01/20. eng.
50. Dontu G, Al-Hajj M, Abdallah WM, Clarke MF, Wicha MS. Stem cells in normal breast development and breast cancer. *Cell Prolif*. 2003 Oct;36 Suppl 1:59-72. PubMed PMID: 14521516. Epub 2003/10/03. eng.
51. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab*. 2004 Jul;15(5):193-7. PubMed PMID: 15223047. Epub 2004/06/30. eng.
52. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med*. 2007 Jan 18;356(3):217-26. PubMed PMID: 17229949. Epub 2007/01/19. eng.
53. Nakshatri H, Srour EF, Badve S. Breast cancer stem cells and intrinsic subtypes: controversies rage on. *Curr Stem Cell Res Ther*. 2009 Jan;4(1):50-60. PubMed PMID: 19149630. Epub 2009/01/20. eng.
54. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res*. 2005 Feb 1;11(3):1154-9. PubMed PMID: 15709183. Epub 2005/02/15. eng.
55. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res*. 2006;8(5):R59. PubMed PMID: 17062128. Epub 2006/10/26. eng.
56. Fillmore C, Kuperwasser C. Human breast cancer stem cell markers CD44 and CD24: enriching for cells with functional properties in mice or in man? *Breast Cancer Res*. 2007;9(3):303. PubMed PMID: 17540049. Epub 2007/06/02. eng.
57. Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol*. 2008 Jul;39(7):1096-102. PubMed PMID: 18495204. Epub 2008/05/23. eng.
58. Li W, Liu F, Lei T, Xu X, Liu B, Cui L, et al. The clinicopathological significance of CD44+/CD24-/low and CD24+ tumor cells in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract*. 2010 Dec 15;206(12):828-34. PubMed PMID: 20977976. Epub 2010/10/28. eng.

59. Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R53. PubMed PMID: 18559090.
60. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24- phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2011 Sep;28(3):745-52. PubMed PMID: 20405247. Epub 2010/04/21. eng.
61. Horiguchi K, Toi M, Horiguchi S, Sugimoto M, Naito Y, Hayashi Y, et al. Predictive value of CD24 and CD44 for neoadjuvant chemotherapy response and prognosis in primary breast cancer patients. *J Med Dent Sci.* 2010 Jun;57(2):165-75. PubMed PMID: 21073135. Epub 2010/11/16. eng.
62. Kim HJ, Kim MJ, Ahn SH, Son BH, Kim SB, Ahn JH, et al. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status. *Breast.* 2011 Feb;20(1):78-85. PubMed PMID: 20810282. Epub 2010/09/03. eng.
63. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol.* 2011 Nov;64(11):937-46. PubMed PMID: 21680574. Epub 2011/06/18. eng.
64. Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, et al. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol.* 2012 Mar;43(3):364-73. PubMed PMID: 21835433. Epub 2011/08/13. eng.
65. Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZ, Benhasouna A, Nolan C, et al. A CD44(-)/CD24 (+) phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(3):979-95. PubMed PMID: 22119938. Epub 2011/11/29. eng.
66. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 1;15(7):2302-10. PubMed PMID: 19318481. Epub 2009/03/26. eng.
67. Cobleigh MA, Vogel CL, Tripathy D, Robert NJ, Scholl S, Fehrenbacher L, et al. Multinational study of the efficacy and safety of humanized anti-HER2 monoclonal antibody in women who have HER2-overexpressing metastatic breast cancer that has progressed after chemotherapy for metastatic disease. *J Clin Oncol.* 1999 Sep;17(9):2639-48. PubMed PMID: 10561337. Epub 1999/11/24. eng.
68. Fisher B, Redmond C, Brown A, Wolmark N, Wittliff J, Fisher ER, et al. Treatment of primary breast cancer with chemotherapy and tamoxifen. *N Engl J Med.* 1981 Jul 2;305(1):1-6. PubMed PMID: 7015139. Epub 1981/07/02. eng.

69. Fisher B, Redmond C, Brown A, Wickerham DL, Wolmark N, Allegra J, et al. Influence of tumor estrogen and progesterone receptor levels on the response to tamoxifen and chemotherapy in primary breast cancer. *J Clin Oncol.* 1983 Apr;1(4):227-41. PubMed PMID: 6366135. Epub 1983/04/01. eng.
70. Slamon DJ, Leyland-Jones B, Shak S, Fuchs H, Paton V, Bajamonde A, et al. Use of chemotherapy plus a monoclonal antibody against HER2 for metastatic breast cancer that overexpresses HER2. *N Engl J Med.* 2001 Mar 15;344(11):783-92. PubMed PMID: 11248153. Epub 2001/03/15. eng.
71. Vogel CL, Cobleigh MA, Tripathy D, Gutheil JC, Harris LN, Fehrenbacher L, et al. Efficacy and safety of trastuzumab as a single agent in first-line treatment of HER2-overexpressing metastatic breast cancer. *J Clin Oncol.* 2002 Feb 1;20(3):719-26. PubMed PMID: 11821453. Epub 2002/02/01. eng.
72. Brenton JD, Carey LA, Ahmed AA, Caldas C. Molecular classification and molecular forecasting of breast cancer: ready for clinical application? *J Clin Oncol.* 2005 Oct 10;23(29):7350-60. PubMed PMID: 16145060. Epub 2005/09/08. eng.
73. Harris LN, Broadwater G, Lin NU, Miron A, Schnitt SJ, Cowan D, et al. Molecular subtypes of breast cancer in relation to paclitaxel response and outcomes in women with metastatic disease: results from CALGB 9342. *Breast Cancer Res.* 2006;8(6):R66. PubMed PMID: 17129383. Epub 2006/11/30. eng.
74. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol.* 2006 Dec 20;24(36):5652-7. PubMed PMID: 17116942. Epub 2006/11/23. eng.
75. Mersin H, Yildirim E, Berberoglu U, Gulben K. The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. *Breast.* 2008 Aug;17(4):341-6. PubMed PMID: 18450442. Epub 2008/05/03. eng.
76. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol.* 2008 Mar 10;26(8):1275-81. PubMed PMID: 18250347. Epub 2008/02/06. eng.
77. Kang SP, Martel M, Harris LN. Triple negative breast cancer: current understanding of biology and treatment options. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 2008 Feb;20(1):40-6. PubMed PMID: 18197004. Epub 2008/01/17. eng.
78. Viale G, Bottiglieri L. Pathological definition of triple negative breast cancer. *Eur J Cancer.* 2009 Sep;45 Suppl 1:5-10. PubMed PMID: 19775600. Epub 2009/09/25. eng.
79. Sasaki Y, Tsuda H. Clinicopathological characteristics of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer.* 2009;16(4):254-9. PubMed PMID: 19657711. Epub 2009/08/07. eng.

80. Billar JA, Dueck AC, Stucky CC, Gray RJ, Wasif N, Northfelt DW, et al. Triple-negative breast cancers: unique clinical presentations and outcomes. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct;17 Suppl 3:384-90. PubMed PMID: 20853062. Epub 2010/10/01. eng.
81. Constantinidou A, Jones RL, Reis-Filho JS. Beyond triple-negative breast cancer: the need to define new subtypes. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010 Aug;10(8):1197-213. PubMed PMID: 20735307. Epub 2010/08/26. eng.
82. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol*. 2010 Dec;7(12):683-92. PubMed PMID: 20877296. Epub 2010/09/30. eng.
83. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Vina JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*. 2010 May;36(3):206-15. PubMed PMID: 20060649. Epub 2010/01/12. eng.
84. Patani N, Barbashina V, Lambros MB, Gauthier A, Mansour M, Mackay A, et al. Direct evidence for concurrent morphological and genetic heterogeneity in an invasive ductal carcinoma of triple-negative phenotype. *J Clin Pathol*. 2011 Sep;64(9):822-8. PubMed PMID: 21676924. Epub 2011/06/17. eng.
85. Yagata H, Kajiura Y, Yamauchi H. Current strategy for triple-negative breast cancer: appropriate combination of surgery, radiation, and chemotherapy. *Breast Cancer*. 2011 Jul;18(3):165-73. PubMed PMID: 21290263. Epub 2011/02/04. eng.
86. Carvalho ST, Stiepcich MM, Fregnani JH, Nonogaki S, Rocha R, Soares FA. Evaluation of prognostic factors in stage IIA breast tumors and their correlation with mortality risk. *Clinics (Sao Paulo)*. 2011;66(4):607-12. PubMed PMID: 21655754. Epub 2011/06/10. eng.
87. Oakman C, Moretti E, Pacini G, Santarpia L, Di Leo A. Triple negative breast cancer: a heterogeneous subgroup defined by what it is not. *Eur J Cancer*. 2011 Sep;47 Suppl 3:S370-2. PubMed PMID: 21944019. Epub 2011/09/29. eng.
88. Podo F, Buydens LM, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS, et al. Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):209-29. PubMed PMID: 20537966. Epub 2010/06/12. eng.
89. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009 Jan;41(1):40-7. PubMed PMID: 19089739. Epub 2008/12/18. eng.
90. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:134. PubMed PMID: 17650314. Epub 2007/07/26. eng.

91. Kaplan HG, Malmgren JA, Atwood M. T1N0 triple negative breast cancer: risk of recurrence and adjuvant chemotherapy. *Breast J.* 2009 Sep-Oct;15(5):454-60. PubMed PMID: 19671105. Epub 2009/08/13. eng.
92. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. 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 May;7(5):e1000279. PubMed PMID: 20520800. Epub 2010/06/04. eng.
93. Thike AA, Iqbal J, Cheok PY, Chong AP, Tse GM, Tan B, et al. Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol.* 2010 Jul;34(7):956-64. PubMed PMID: 20495445. Epub 2010/05/25. eng.
94. Lerma E, Barnadas A, Prat J. Triple negative breast carcinomas: similarities and differences with basal like carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009 Dec;17(6):483-94. PubMed PMID: 19620842. Epub 2009/07/22. eng.
95. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol.* 2008 Oct;216(2):141-50. PubMed PMID: 18720457. Epub 2008/08/23. eng.
96. Reis-Filho JS, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother? *J Pathol.* 2008 Dec;216(4):394-8. PubMed PMID: 18798222. Epub 2008/09/18. eng.
97. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Sep;117(2):273-80. PubMed PMID: 18815879. Epub 2008/09/26. eng.
98. Santini D, Ceccarelli C, Taffurelli M, Pileri S, Marrano D. Differentiation pathways in primary invasive breast carcinoma as suggested by intermediate filament and biopathological marker expression. *J Pathol.* 1996 Aug;179(4):386-91. PubMed PMID: 8869285. Epub 1996/08/01. eng.
99. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, Green AR, Lee AH, Robertson JF, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer.* 2006 Dec;42(18):3149-56. PubMed PMID: 17055256. Epub 2006/10/24. eng.
100. Evans AJ, Rakha EA, Pinder SE, Green AR, Paish C, Ellis IO. Basal phenotype: a powerful prognostic factor in small screen-detected invasive breast cancer with long-term follow-up. *J Med Screen.* 2007;14(4):210-4. PubMed PMID: 18078567.
101. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Impact of basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology.* 2008;75(2):95-103. PubMed PMID: 18544964. Epub 2008/06/12. eng.

102. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008 May 20;26(15):2568-81. PubMed PMID: 18487574. Epub 2008/05/20. eng.
103. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502. PubMed PMID: 16757721. Epub 2006/06/08. eng.
104. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006 Feb;19(2):264-71. PubMed PMID: 16341146. Epub 2005/12/13. eng.
105. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):22-34. PubMed PMID: 16842243. Epub 2006/07/18. eng.
106. Rakha EA, Putti TC, Abd El-Rehim DM, Paish C, Green AR, Powe DG, et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. *J Pathol*. 2006 Mar;208(4):495-506. PubMed PMID: 16429394. Epub 2006/01/24. eng.
107. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2010 Jan;23(1):123-33. PubMed PMID: 19855377. Epub 2009/10/27. eng.
108. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8. PubMed PMID: 12917485. Epub 2003/08/15. eng.
109. Calza S, Hall P, Auer G, Bjohle J, Klaar S, Kronenwett U, et al. Intrinsic molecular signature of breast cancer in a population-based cohort of 412 patients. *Breast Cancer Res*. 2006;8(4):R34. PubMed PMID: 16846532. Epub 2006/07/19. eng.
110. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007 Mar;50(4):434-8. PubMed PMID: 17448018.
111. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1721-8. PubMed PMID: 17387718. Epub 2007/03/28. eng.

112. Morris GJ, Naidu S, Topham AK, Guiles F, Xu Y, McCue P, et al. Differences in breast carcinoma characteristics in newly diagnosed African-American and Caucasian patients: a single-institution compilation compared with the National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results database. *Cancer*. 2007 Aug 15;110(4):876-84. PubMed PMID: 17620276. Epub 2007/07/11. eng.
113. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):1991-6. PubMed PMID: 12466114. Epub 2002/12/06. eng.
114. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell J, Blamey RW, Robertson JF, et al. Expression of luminal and basal cytokeratins in human breast carcinoma. *J Pathol*. 2004 Jun;203(2):661-71. PubMed PMID: 15141381. Epub 2004/05/14. eng.
115. Gusterson BA, Ross DT, Heath VJ, Stein T. Basal cytokeratins and their relationship to the cellular origin and functional classification of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2005;7(4):143-8. PubMed PMID: 15987465. Epub 2005/07/01. eng.
116. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):404; author reply 5. PubMed PMID: 18279542.
117. Kreike B, van Kouwenhove M, Hurlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res*. 2007;9(5):R65. PubMed PMID: 17910759. Epub 2007/10/04. eng.
118. Tsuda H, Takarabe T, Hasegawa F, Fukutomi T, Hirohashi S. Large, central acellular zones indicating myoepithelial tumor differentiation in high-grade invasive ductal carcinomas as markers of predisposition to lung and brain metastases. *Am J Surg Pathol*. 2000 Feb;24(2):197-202. PubMed PMID: 10680887. Epub 2000/02/19. eng.
119. Hicks DG, Short SM, Prescott NL, Tarr SM, Coleman KA, Yoder BJ, et al. Breast cancers with brain metastases are more likely to be estrogen receptor negative, express the basal cytokeratin CK5/6, and overexpress HER2 or EGFR. *Am J Surg Pathol*. 2006 Sep;30(9):1097-104. PubMed PMID: 16931954. Epub 2006/08/26. eng.
120. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R4. PubMed PMID: 17217540. Epub 2007/01/16. eng.
121. Smid M, Wang Y, Zhang Y, Sieuwerts AM, Yu J, Klijn JG, et al. Subtypes of breast cancer show preferential site of relapse. *Cancer Res*. 2008 May 1;68(9):3108-14. PubMed PMID: 18451135. Epub 2008/05/03. eng.

122. Luck AA, Evans AJ, Green AR, Rakha EA, Paish C, Ellis IO. The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008 Feb;20(1):40-5. PubMed PMID: 17981444. Epub 2007/11/06. eng.
123. Foulkes WD, Grainge MJ, Rakha EA, Green AR, Ellis IO. Tumor size is an unreliable predictor of prognosis in basal-like breast cancers and does not correlate closely with lymph node status. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Sep;117(1):199-204. PubMed PMID: 18600446. Epub 2008/07/05. eng.
124. Collins LC, Martyniak A, Kandel MJ, Stadler ZK, Masciari S, Miron A, et al. Basal cytokeratin and epidermal growth factor receptor expression are not predictive of BRCA1 mutation status in women with triple-negative breast cancers. *Am J Surg Pathol*. 2009 Jul;33(7):1093-7. PubMed PMID: 19390427. Epub 2009/04/25. eng.
125. Gonzalez-Angulo AM, Timms KM, Liu S, Chen H, Litton JK, Potter J, et al. Incidence and outcome of BRCA mutations in unselected patients with triple receptor-negative breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2011 Mar 1;17(5):1082-9. PubMed PMID: 21233401. Epub 2011/01/15. eng.
126. Hennessy BT, Gonzalez-Angulo AM, Stemke-Hale K, Gilcrease MZ, Krishnamurthy S, Lee JS, et al. Characterization of a naturally occurring breast cancer subset enriched in epithelial-to-mesenchymal transition and stem cell characteristics. *Cancer Res*. 2009 May 15;69(10):4116-24. PubMed PMID: 19435916. Epub 2009/05/14. eng.
127. Turner NC, Reis-Filho JS, Russell AM, Springall RJ, Ryder K, Steele D, et al. BRCA1 dysfunction in sporadic basal-like breast cancer. *Oncogene*. 2007 Mar 29;26(14):2126-32. PubMed PMID: 17016441. Epub 2006/10/04. eng.
128. Lakhani SR, Reis-Filho JS, Fulford L, Penault-Llorca F, van der Vijver M, Parry S, et al. Prediction of BRCA1 status in patients with breast cancer using estrogen receptor and basal phenotype. *Clin Cancer Res*. 2005 Jul 15;11(14):5175-80. PubMed PMID: 16033833. Epub 2005/07/22. eng.
129. Gorski JJ, James CR, Quinn JE, Stewart GE, Staunton KC, Buckley NE, et al. BRCA1 transcriptionally regulates genes associated with the basal-like phenotype in breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2010 Aug;122(3):721-31. PubMed PMID: 19882246. Epub 2009/11/03. eng.
130. Foulkes WD, Stefansson IM, Chappuis PO, Begin LR, Goffin JR, Wong N, et al. Germline BRCA1 mutations and a basal epithelial phenotype in breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2003 Oct 1;95(19):1482-5. PubMed PMID: 14519755. Epub 2003/10/02. eng.
131. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010;12(5):R68. PubMed PMID: 20813035. Epub 2010/09/04. eng.

132. Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, Wang ZC, Szallasi Z, Li Q, et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2010 Mar 1;28(7):1145-53. PubMed PMID: 20100965. Epub 2010/01/27. eng.
133. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):236-40. PubMed PMID: 18398844. Epub 2008/04/10. eng.
134. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7. PubMed PMID: 19204204. Epub 2009/02/11. eng.
135. de Ronde J, Wessels L, Wesseling J. Molecular subtyping of breast cancer: ready to use? *Lancet Oncol*. 2010 Apr;11(4):306-7. PubMed PMID: 20359657. Epub 2010/04/03. eng.
136. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Feb;113(3):411-22. PubMed PMID: 18327637. Epub 2008/03/11. eng.
137. Malzahn K, Mitze M, Thoenes M, Moll R. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. *Virchows Arch*. 1998 Aug;433(2):119-29. PubMed PMID: 9737789. Epub 1998/09/16. eng.
138. Abd El-Rehim DM, Pinder SE, Paish CE, Bell JA, Rampaul RS, Blamey RW, et al. Expression and co-expression of the members of the epidermal growth factor receptor (EGFR) family in invasive breast carcinoma. *Br J Cancer*. 2004 Oct 18;91(8):1532-42. PubMed PMID: 15480434. Epub 2004/10/14. eng.
139. Makretsov NA, Huntsman DG, Nielsen TO, Yorlida E, Peacock M, Cheang MC, et al. Hierarchical clustering analysis of tissue microarray immunostaining data identifies prognostically significant groups of breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Sep 15;10(18 Pt 1):6143-51. PubMed PMID: 15448001. Epub 2004/09/28. eng.
140. Arnes JB, Brunet JS, Stefansson I, Begin LR, Wong N, Chappuis PO, et al. Placental cadherin and the basal epithelial phenotype of BRCA1-related breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2005 Jun 1;11(11):4003-11. PubMed PMID: 15930334. Epub 2005/06/03. eng.
141. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):10-21. PubMed PMID: 16842242. Epub 2006/07/18. eng.
142. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1368-76. PubMed PMID: 18316557. Epub 2008/03/05. eng.

143. Sutton LM, Han JS, Molberg KH, Sarode VR, Cao D, Rakheja D, et al. Intratumoral expression level of epidermal growth factor receptor and cytokeratin 5/6 is significantly associated with nodal and distant metastases in patients with basal-like triple-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2010 Nov;134(5):782-7. PubMed PMID: 20959661. Epub 2010/10/21. eng.
144. Conforti R, Boulet T, Tomasic G, Taranchon E, Arriagada R, Spielmann M, et al. Breast cancer molecular subclassification and estrogen receptor expression to predict efficacy of adjuvant anthracyclines-based chemotherapy: a biomarker study from two randomized trials. *Ann Oncol*. 2007 Sep;18(9):1477-83. PubMed PMID: 17515403. Epub 2007/05/23. eng.
145. Nofech-Mozes S, Trudeau M, Kahn HK, Dent R, Rawlinson E, Sun P, et al. Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Nov;118(1):131-7. PubMed PMID: 19189211. Epub 2009/02/04. eng.
146. Liu ZB, Wu J, Ping B, Feng LQ, Di GH, Lu JS, et al. Basal cytokeratin expression in relation to immunohistochemical and clinical characterization in breast cancer patients with triple negative phenotype. *Tumori*. 2009 Jan-Feb;95(1):53-62. PubMed PMID: 19366057. Epub 2009/04/16. eng.
147. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(2):157-67. PubMed PMID: 21076464. Epub 2010/11/16. eng.
148. Cobleigh MA, Tabesh B, Bitterman P, Baker J, Cronin M, Liu ML, et al. Tumor gene expression and prognosis in breast cancer patients with 10 or more positive lymph nodes. *Clin Cancer Res*. 2005 Dec 15;11(24 Pt 1):8623-31. PubMed PMID: 16361546. Epub 2005/12/20. eng.
149. Nielsen TO, Parker JS, Leung S, Voduc D, Ebbert M, Vickery T, et al. A comparison of PAM50 intrinsic subtyping with immunohistochemistry and clinical prognostic factors in tamoxifen-treated estrogen receptor-positive breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Nov 1;16(21):5222-32. PubMed PMID: 20837693. Epub 2010/09/15. eng.
150. Galanina N, Bossuyt V, Harris LN. Molecular predictors of response to therapy for breast cancer. *Cancer J*. 2011 Mar-Apr;17(2):96-103. PubMed PMID: 21427553. Epub 2011/03/24. eng.
151. Kelly CM, Bernard PS, Krishnamurthy S, Wang B, Ebbert MT, Bastien RR, et al. Agreement in risk prediction between the 21-gene recurrence score assay (Oncotype DX(R)) and the PAM50 breast cancer intrinsic Classifier in early-stage estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncologist*. 2012;17(4):492-8. PubMed PMID: 22418568. Epub 2012/03/16. eng.

152. Hamburger AW, Salmon SE. Primary bioassay of human tumor stem cells. *Science*. 1977 Jul 29;197(4302):461-3. PubMed PMID: 560061. Epub 1977/07/29. eng.
153. Stingl J. Detection and analysis of mammary gland stem cells. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):229-41. PubMed PMID: 19009588. Epub 2008/11/15. eng.
154. Cairns J. Somatic stem cells and the kinetics of mutagenesis and carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Aug 6;99(16):10567-70. PubMed PMID: 12149477. Epub 2002/08/01. eng.
155. Gudjonsson T, Villadsen R, Nielsen HL, Ronnov-Jessen L, Bissell MJ, Petersen OW. Isolation, immortalization, and characterization of a human breast epithelial cell line with stem cell properties. *Genes Dev*. 2002 Mar 15;16(6):693-706. PubMed PMID: 11914275. Epub 2002/03/27. eng.
156. Villadsen R. In search of a stem cell hierarchy in the human breast and its relevance to breast cancer evolution. *APMIS*. 2005 Nov-Dec;113(11-12):903-21. PubMed PMID: 16480457. Epub 2006/02/17. eng.
157. Villadsen R, Fridriksdottir AJ, Ronnov-Jessen L, Gudjonsson T, Rank F, LaBarge MA, et al. Evidence for a stem cell hierarchy in the adult human breast. *J Cell Biol*. 2007 Apr 9;177(1):87-101. PubMed PMID: 17420292. Epub 2007/04/11. eng.
158. Reya T, Morrison SJ, Clarke MF, Weissman IL. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature*. 2001 Nov 1;414(6859):105-11. PubMed PMID: 11689955. Epub 2001/11/02. eng.
159. Visvader JE. Cells of origin in cancer. *Nature*. 2011 Jan 20;469(7330):314-22. PubMed PMID: 21248838. Epub 2011/01/21. eng.
160. Kelly PN, Dakic A, Adams JM, Nutt SL, Strasser A. Tumor growth need not be driven by rare cancer stem cells. *Science*. 2007 Jul 20;317(5836):337. PubMed PMID: 17641192. Epub 2007/07/21. eng.
161. Yadirgi G, Marino S. Adult neural stem cells and their role in brain pathology. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):242-53. PubMed PMID: 19040211. Epub 2008/12/02. eng.
162. Brabletz S, Schmalhofer O, Brabletz T. Gastrointestinal stem cells in development and cancer. *J Pathol*. 2009 Jan;217(2):307-17. PubMed PMID: 19031475. Epub 2008/11/26. eng.
163. Hermann PC, Huber SL, Herrler T, Aicher A, Ellwart JW, Guba M, et al. Distinct populations of cancer stem cells determine tumor growth and metastatic activity in human pancreatic cancer. *Cell Stem Cell*. 2007 Sep 13;1(3):313-23. PubMed PMID: 18371365. Epub 2008/03/29. eng.

164. Snyder JC, Teisanu RM, Stripp BR. Endogenous lung stem cells and contribution to disease. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):254-64. PubMed PMID: 19039828. Epub 2008/11/29. eng.
165. Alison MR, Islam S, Lim S. Stem cells in liver regeneration, fibrosis and cancer: the good, the bad and the ugly. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):282-98. PubMed PMID: 18991329. Epub 2008/11/11. eng.
166. Lang SH, Frame FM, Collins AT. Prostate cancer stem cells. *J Pathol.* 2009 Jan;217(2):299-306. PubMed PMID: 19040209. Epub 2008/12/02. eng.
167. Hoshino K. Transplantability of mammary gland in brown fat pads of mice. *Nature.* 1967 Jan 14;213(5072):194-5. PubMed PMID: 6030585. Epub 1967/01/14. eng.
168. Hoshino K, Gardner WU. Transplantability and life span of mammary gland during serial transplantation in mice. *Nature.* 1967 Jan 14;213(5072):193-4. PubMed PMID: 6030584. Epub 1967/01/14. eng.
169. Daniel CW, Young LJ. Influence of cell division on an aging process. Life span of mouse mammary epithelium during serial propagation in vivo. *Exp Cell Res.* 1971 Mar;65(1):27-32. PubMed PMID: 5549550. Epub 1971/03/01. eng.
170. Young LJ, Medina D, DeOme KB, Daniel CW. The influence of host and tissue age on life span and growth rate of serially transplanted mouse mammary gland. *Exp Gerontol.* 1971 Feb 1;6(1):49-56. PubMed PMID: 5572739. Epub 1971/02/01. eng.
171. Kordon EC, Smith GH. An entire functional mammary gland may comprise the progeny from a single cell. *Development.* 1998 May;125(10):1921-30. PubMed PMID: 9550724. Epub 1998/06/18. eng.
172. Welm BE, Tepera SB, Venezia T, Graubert TA, Rosen JM, Goodell MA. Sca-1(pos) cells in the mouse mammary gland represent an enriched progenitor cell population. *Dev Biol.* 2002 May 1;245(1):42-56. PubMed PMID: 11969254. Epub 2002/04/24. eng.
173. Smith GH, Chepko G. Mammary epithelial stem cells. *Microsc Res Tech.* 2001 Jan 15;52(2):190-203. PubMed PMID: 11169867. Epub 2001/02/13. eng.
174. Tu SM, Lin SH, Logothetis CJ. Stem-cell origin of metastasis and heterogeneity in solid tumours. *Lancet Oncol.* 2002 Aug;3(8):508-13. PubMed PMID: 12147437. Epub 2002/07/31. eng.
175. Stingl J, Eaves CJ, Kuusk U, Emerman JT. Phenotypic and functional characterization in vitro of a multipotent epithelial cell present in the normal adult human breast. *Differentiation.* 1998 Aug;63(4):201-13. PubMed PMID: 9745711. Epub 1998/09/24. eng.
176. Stingl J, Eaves CJ, Zandieh I, Emerman JT. Characterization of bipotent mammary epithelial progenitor cells in normal adult human breast tissue. *Breast*

Cancer Res Treat. 2001 May;67(2):93-109. PubMed PMID: 11519870. Epub 2001/08/25. eng.

177. Dontu G, Abdallah WM, Foley JM, Jackson KW, Clarke MF, Kawamura MJ, et al. In vitro propagation and transcriptional profiling of human mammary stem/progenitor cells. *Genes Dev.* 2003 May 15;17(10):1253-70. PubMed PMID: 12756227. Epub 2003/05/21. eng.

178. Stingl J, Eirew P, Ricketson I, Shackleton M, Vaillant F, Choi D, et al. Purification and unique properties of mammary epithelial stem cells. *Nature.* 2006 Feb 23;439(7079):993-7. PubMed PMID: 16395311. Epub 2006/01/06. eng.

179. Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, et al. Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature.* 2006 Jan 5;439(7072):84-8. PubMed PMID: 16397499. Epub 2006/01/07. eng.

180. Sleeman KE, Kendrick H, Ashworth A, Isacke CM, Smalley MJ. CD24 staining of mouse mammary gland cells defines luminal epithelial, myoepithelial/basal and non-epithelial cells. *Breast Cancer Res.* 2006;8(1):R7. PubMed PMID: 16417656. Epub 2006/01/19. eng.

181. Nomenclature for clusters of differentiation (CD) of antigens defined on human leukocyte populations. IUIS-WHO Nomenclature Subcommittee. *Bull World Health Organ.* 1984;62(5):809-15. PubMed PMID: 6334575. Epub 1984/01/01. eng

fre.

182. Bernard A, Boumsell L. [Human leukocyte differentiation antigens]. *Presse Med.* 1984 Oct 27;13(38):2311-6. PubMed PMID: 6239187. Epub 1984/10/27. Les antigenes de differenciation leucocytaire humains. fre.

183. Fischer GF, Majdic O, Gadd S, Knapp W. Signal transduction in lymphocytic and myeloid cells via CD24, a new member of phosphoinositol-anchored membrane molecules. *J Immunol.* 1990 Jan 15;144(2):638-41. PubMed PMID: 2153173. Epub 1990/01/15. eng.

184. Aigner S, Stoeber ZM, Fogel M, Weber E, Zarn J, Ruppert M, et al. CD24, a mucin-type glycoprotein, is a ligand for P-selectin on human tumor cells. *Blood.* 1997 May 1;89(9):3385-95. PubMed PMID: 9129046. Epub 1997/05/01. eng.

185. Sammar M, Aigner S, Hubbe M, Schirmacher V, Schachner M, Vestweber D, et al. Heat-stable antigen (CD24) as ligand for mouse P-selectin. *Int Immunol.* 1994 Jul;6(7):1027-36. PubMed PMID: 7524641. Epub 1994/07/01. eng.

186. Lim SC. CD24 and human carcinoma: tumor biological aspects. *Biomed Pharmacother.* 2005 Oct;59 Suppl 2:S351-4. PubMed PMID: 16507407. Epub 2006/03/02. eng.

187. Lim SC, Oh SH. The role of CD24 in various human epithelial neoplasias. *Pathol Res Pract.* 2005;201(7):479-86. PubMed PMID: 16164042. Epub 2005/09/17. eng.
188. Baumann P, Cremers N, Kroese F, Orend G, Chiquet-Ehrismann R, Uede T, et al. CD24 expression causes the acquisition of multiple cellular properties associated with tumor growth and metastasis. *Cancer Res.* 2005 Dec 1;65(23):10783-93. PubMed PMID: 16322224. Epub 2005/12/03. eng.
189. Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J.* 1998 Sep;12(12):1241-51. PubMed PMID: 9737727. Epub 1998/09/16. eng.
190. Fogel M, Friederichs J, Zeller Y, Husar M, Smirnov A, Roitman L, et al. CD24 is a marker for human breast carcinoma. *Cancer Lett.* 1999 Aug 23;143(1):87-94. PubMed PMID: 10465342. Epub 1999/08/28. eng.
191. Schindelmann S, Windisch J, Grundmann R, Kreienberg R, Zeillinger R, Deissler H. Expression profiling of mammary carcinoma cell lines: correlation of in vitro invasiveness with expression of CD24. *Tumour Biol.* 2002 May-Jun;23(3):139-45. PubMed PMID: 12218294. Epub 2002/09/10. eng.
192. Kristiansen G, Winzer KJ, Mayordomo E, Bellach J, Schluns K, Denkert C, et al. CD24 expression is a new prognostic marker in breast cancer. *Clin Cancer Res.* 2003 Oct 15;9(13):4906-13. PubMed PMID: 14581365. Epub 2003/10/29. eng.
193. Bircan S, Kapucuoglu N, Baspinar S, Inan G, Candir O. CD24 expression in ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of breast: an immunohistochemistry-based pilot study. *Pathol Res Pract.* 2006;202(8):569-76. PubMed PMID: 16828238. Epub 2006/07/11. eng.
194. Surowiak P, Materna V, Paluchowski P, Matkowski R, Wojnar A, Maciejczyk A, et al. CD24 expression is specific for tamoxifen-resistant ductal breast cancer cases. *Anticancer Res.* 2006 Jan-Feb;26(1B):629-34. PubMed PMID: 16739331. Epub 2006/06/03. eng.
195. Athanassiadou P, Grapsa D, Gonidi M, Athanassiadou AM, Tsipis A, Patsouris E. CD24 expression has a prognostic impact in breast carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2009;205(8):524-33. PubMed PMID: 19243896. Epub 2009/02/27. eng.
196. Kristiansen G, Machado E, Bretz N, Rupp C, Winzer KJ, Konig AK, et al. Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest.* 2010 Jul;90(7):1102-16. PubMed PMID: 20351695. Epub 2010/03/31. eng.
197. Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunorexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol Rep.* 2012 Jan;27(1):28-38. PubMed PMID: 21956537. Epub 2011/10/01. eng.

198. Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate. *Cell*. 1990 Jun 29;61(7):1303-13. PubMed PMID: 1694723. Epub 1990/06/29. eng.
199. Underhill C. CD44: the hyaluronan receptor. *J Cell Sci*. 1992 Oct;103 (Pt 2):293-8. PubMed PMID: 1282514. Epub 1992/10/01. eng.
200. Lee MC, Alpaugh ML, Nguyen M, Deato M, Dishakjian L, Barsky SH. Myoepithelial-specific CD44 shedding is mediated by a putative chymotrypsin-like sheddase. *Biochem Biophys Res Commun*. 2000 Dec 9;279(1):116-23. PubMed PMID: 11112426. Epub 2000/12/09. eng.
201. Bono P, Rubin K, Higgins JM, Hynes RO. Layilin, a novel integral membrane protein, is a hyaluronan receptor. *Mol Biol Cell*. 2001 Apr;12(4):891-900. PubMed PMID: 11294894. Epub 2001/04/11. eng.
202. Entwistle J, Hall CL, Turley EA. HA receptors: regulators of signalling to the cytoskeleton. *J Cell Biochem*. 1996 Jun 15;61(4):569-77. PubMed PMID: 8806080. Epub 1996/06/15. eng.
203. Banerji S, Ni J, Wang SX, Clasper S, Su J, Tammi R, et al. LYVE-1, a new homologue of the CD44 glycoprotein, is a lymph-specific receptor for hyaluronan. *J Cell Biol*. 1999 Feb 22;144(4):789-801. PubMed PMID: 10037799. Epub 1999/02/26. eng.
204. Naor D, Sionov RV, Ish-Shalom D. CD44: structure, function, and association with the malignant process. *Adv Cancer Res*. 1997;71:241-319. PubMed PMID: 9111868. Epub 1997/01/01. eng.
205. Savani RC, Cao G, Pooler PM, Zaman A, Zhou Z, DeLisser HM. Differential involvement of the hyaluronan (HA) receptors CD44 and receptor for HA-mediated motility in endothelial cell function and angiogenesis. *J Biol Chem*. 2001 Sep 28;276(39):36770-8. PubMed PMID: 11448954. Epub 2001/07/13. eng.
206. Goebeler M, Kaufmann D, Brocker EB, Klein CE. Migration of highly aggressive melanoma cells on hyaluronic acid is associated with functional changes, increased turnover and shedding of CD44 receptors. *J Cell Sci*. 1996 Jul;109 (Pt 7):1957-64. PubMed PMID: 8832418. Epub 1996/07/01. eng.
207. Itano N, Atsumi F, Sawai T, Yamada Y, Miyaishi O, Senga T, et al. Abnormal accumulation of hyaluronan matrix diminishes contact inhibition of cell growth and promotes cell migration. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002 Mar 19;99(6):3609-14. PubMed PMID: 11891291. Epub 2002/03/14. eng.
208. Toole BP. Hyaluronan promotes the malignant phenotype. *Glycobiology*. 2002 Mar;12(3):37R-42R. PubMed PMID: 11971857. Epub 2002/04/25. eng.
209. Toole BP, Hascall VC. Hyaluronan and tumor growth. *Am J Pathol*. 2002 Sep;161(3):745-7. PubMed PMID: 12213700. Epub 2002/09/06. eng.

210. Toole BP, Wight TN, Tammi MI. Hyaluronan-cell interactions in cancer and vascular disease. *J Biol Chem.* 2002 Feb 15;277(7):4593-6. PubMed PMID: 11717318. Epub 2001/11/22. eng.
211. Koopman G, Griffioen AW, Ponta H, Herrlich P, van den Berg F, Manten-Horst E, et al. CD44 splice variants; expression on lymphocytes and in neoplasia. *Res Immunol.* 1993 Nov-Dec;144(9):750-4; discussion 4-62. PubMed PMID: 7512745. Epub 1993/11/01. eng.
212. Knudson W. The role of CD44 as a cell surface hyaluronan receptor during tumor invasion of connective tissue. *Front Biosci.* 1998 Jul 1;3:d604-15. PubMed PMID: 9634543. Epub 1998/06/23. eng.
213. Lackner C, Moser R, Bauernhofer T, Wilders-Truschnig M, Samonigg H, Berghold A, et al. Soluble CD44 v5 and v6 in serum of patients with breast cancer. Correlation with expression of CD44 v5 and v6 variants in primary tumors and location of distant metastasis. *Breast Cancer Res Treat.* 1998 Jan;47(1):29-40. PubMed PMID: 9493973. Epub 1998/03/11. eng.
214. Screatton GR, Bell MV, Jackson DG, Cornelis FB, Gerth U, Bell JI. Genomic structure of DNA encoding the lymphocyte homing receptor CD44 reveals at least 12 alternatively spliced exons. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1992 Dec 15;89(24):12160-4. PubMed PMID: 1465456. Epub 1992/12/15. eng.
215. Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P. CD44 variant exon epitopes in primary breast cancer and length of survival. *Lancet.* 1995 Mar 11;345(8950):615-9. PubMed PMID: 7534855. Epub 1995/03/11. eng.
216. Kaufmann M, Heider KH, Sinn HP, von Minckwitz G, Ponta H, Herrlich P. CD44 isoforms in prognosis of breast cancer. *Lancet.* 1995 Aug 19;346(8973):502. PubMed PMID: 7543643. Epub 1995/08/19. eng.
217. Sinn HP, Heider KH, Skroch-Angel P, von Minckwitz G, Kaufmann M, Herrlich P, et al. Human mammary carcinomas express homologues of rat metastasis-associated variants of CD44. *Breast Cancer Res Treat.* 1995;36(3):307-13. PubMed PMID: 8573713. Epub 1995/01/01. eng.
218. Wielenga VJ, Heider KH, Offerhaus GJ, Adolf GR, van den Berg FM, Ponta H, et al. Expression of CD44 variant proteins in human colorectal cancer is related to tumor progression. *Cancer Res.* 1993 Oct 15;53(20):4754-6. PubMed PMID: 7691404. Epub 1993/10/15. eng.
219. Heider KH, Dammrich J, Skroch-Angel P, Muller-Hermelink HK, Vollmers HP, Herrlich P, et al. Differential expression of CD44 splice variants in intestinal- and diffuse-type human gastric carcinomas and normal gastric mucosa. *Cancer Res.* 1993 Sep 15;53(18):4197-203. PubMed PMID: 7689929. Epub 1993/09/15. eng.
220. Pals ST, Koopman G, Heider KH, Griffioen A, Adolf GR, Van den Berg F, et al. CD44 splice variants: expression during lymphocyte activation and tumor

progression. *Behring Inst Mitt.* 1993 Aug(92):273-7. PubMed PMID: 7504454. Epub 1993/08/01. eng.

221. Koopman G, Heider KH, Horst E, Adolf GR, van den Berg F, Ponta H, et al. Activated human lymphocytes and aggressive non-Hodgkin's lymphomas express a homologue of the rat metastasis-associated variant of CD44. *J Exp Med.* 1993 Apr 1;177(4):897-904. PubMed PMID: 8459220. Epub 1993/04/01. eng.

222. Screatton GR, Bell MV, Bell JI, Jackson DG. The identification of a new alternative exon with highly restricted tissue expression in transcripts encoding the mouse Pgp-1 (CD44) homing receptor. Comparison of all 10 variable exons between mouse, human, and rat. *J Biol Chem.* 1993 Jun 15;268(17):12235-8. PubMed PMID: 8509359. Epub 1993/06/15. eng.

223. Friedrichs K, Franke F, Lisboa BW, Kugler G, Gille I, Terpe HJ, et al. CD44 isoforms correlate with cellular differentiation but not with prognosis in human breast cancer. *Cancer Res.* 1995 Nov 15;55(22):5424-33. PubMed PMID: 7585612. Epub 1995/11/15. eng.

224. Hebbard L, Steffen A, Zawadzki V, Fieber C, Howells N, Moll J, et al. CD44 expression and regulation during mammary gland development and function. *J Cell Sci.* 2000 Jul;113 (Pt 14):2619-30. PubMed PMID: 10862719. Epub 2000/06/23. eng.

225. Jansen RH, Joosten-Achjanie SR, Arends JW, Volovics A, Hupperets PS, Schouten HC, et al. CD44v6 is not a prognostic factor in primary breast cancer. *Ann Oncol.* 1998 Jan;9(1):109-11. PubMed PMID: 9541692. Epub 1998/05/30. eng.

226. Tokue Y, Matsumura Y, Katsumata N, Watanabe T, Tarin D, Kakizoe T. CD44 variant isoform expression and breast cancer prognosis. *Jpn J Cancer Res.* 1998 Mar;89(3):283-90. PubMed PMID: 9600122. Epub 1998/05/26. eng.

227. Kinoshita J, Haga S, Shimizu T, Imamura H, Watanabe O, Kajiwara T. The expression of variant exon v7-v8 CD44 antigen in relation to lymphatic metastasis of human breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 1999 Jan;53(2):177-83. PubMed PMID: 10326795. Epub 1999/05/18. eng.

228. Schumacher U, Horny HP, Horst HA, Herrlich P, Kaiserling E. A CD44 variant exon 6 epitope as a prognostic indicator in breast cancer. *Eur J Surg Oncol.* 1996 Jun;22(3):259-61. PubMed PMID: 8654608. Epub 1996/06/01. eng.

229. Guriec N, Marcellin L, Gairard B, Calderoli H, Wilk A, Renaud R, et al. CD44 exon 6 expression as a possible early prognostic factor in primary node negative breast carcinoma. *Clin Exp Metastasis.* 1996 Oct;14(5):434-9. PubMed PMID: 8871537. Epub 1996/10/01. eng.

230. Nunez MI, Arias JI, Del Rio MC, Martinez MI, Alba A, Allende MT, et al. Cell surface CD44v5 levels correlate with progesterone receptors and a tumor size > 2 cm in infiltrating ductal carcinomas of the breast. *Int J Biol Markers.* 1996 Oct-Dec;11(4):220-2. PubMed PMID: 9017447. Epub 1996/10/01. eng.

231. Guriec N, Gairard B, Marcellin L, Wilk A, Calderoli H, Renaud R, et al. CD44 isoforms with exon v6 and metastasis of primary N0M0 breast carcinomas. *Breast Cancer Res Treat.* 1997 Jul;44(3):261-8. PubMed PMID: 9266106. Epub 1997/07/01. eng.
232. Roca X, Mate JL, Ariza A, Munoz-Marmol AM, von Uexkull-Guldeband C, Pellicer I, et al. CD44 isoform expression follows two alternative splicing pathways in breast tissue. *Am J Pathol.* 1998 Jul;153(1):183-90. PubMed PMID: 9665479. Epub 1998/07/17. eng.
233. Bourguignon LY. CD44-mediated oncogenic signaling and cytoskeleton activation during mammary tumor progression. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 2001 Jul;6(3):287-97. PubMed PMID: 11547898. Epub 2001/09/08. eng.
234. Hofmann M, Rudy W, Zoller M, Tolg C, Ponta H, Herrlich P, et al. CD44 splice variants confer metastatic behavior in rats: homologous sequences are expressed in human tumor cell lines. *Cancer Res.* 1991 Oct 1;51(19):5292-7. PubMed PMID: 1717145. Epub 1991/10/01. eng.
235. Tanabe KK, Nishi T, Saya H. Novel variants of CD44 arising from alternative splicing: changes in the CD44 alternative splicing pattern of MCF-7 breast carcinoma cells treated with hyaluronidase. *Mol Carcinog.* 1993;7(4):212-20. PubMed PMID: 8352881. Epub 1993/01/01. eng.
236. Joensuu H, Klemi PJ, Toikkanen S, Jalkanen S. Glycoprotein CD44 expression and its association with survival in breast cancer. *Am J Pathol.* 1993 Sep;143(3):867-74. PubMed PMID: 8362982. Epub 1993/09/01. eng.
237. Iida N, Bourguignon LY. New CD44 splice variants associated with human breast cancers. *J Cell Physiol.* 1995 Jan;162(1):127-33. PubMed PMID: 7529235. Epub 1995/01/01. eng.
238. de la Torre M, Heldin P, Bergh J. Expression of the CD44 glycoprotein (lymphocyte-homing receptor) in untreated human breast cancer and its relationship to prognostic markers. *Anticancer Res.* 1995 Nov-Dec;15(6B):2791-5. PubMed PMID: 8669866. Epub 1995/11/01. eng.
239. Lyzak JS, Yaremko ML, Recant W, Baunoch DA, Joseph L. Role of CD44 in nonpalpable T1a and T1b breast cancer. *Hum Pathol.* 1997 Jul;28(7):772-8. PubMed PMID: 9224743. Epub 1997/07/01. eng.
240. Foekens JA, Dall P, Klijn JG, Skroch-Angel P, Claassen CJ, Look MP, et al. Prognostic value of CD44 variant expression in primary breast cancer. *Int J Cancer.* 1999 Jun 21;84(3):209-15. PubMed PMID: 10371335. Epub 1999/06/17. eng.
241. Kopp R, Classen S, Wolf H, Gholam P, Possinger K, Wilmanns W. Predictive relevance of soluble CD44v6 serum levels for the responsiveness to second line hormone- or chemotherapy in patients with metastatic breast cancer. *Anticancer Res.* 2001 Jul-Aug;21(4B):2995-3000. PubMed PMID: 11712800. Epub 2001/11/20. eng.

242. Morris SF, O'Hanlon DM, McLaughlin R, McHale T, Connolly GE, Given HF. The prognostic significance of CD44s and CD44v6 expression in stage two breast carcinoma: an immunohistochemical study. *Eur J Surg Oncol*. 2001 Sep;27(6):527-31. PubMed PMID: 11520083. Epub 2001/08/25. eng.
243. Berner HS, Suo Z, Risberg B, Villman K, Karlsson MG, Nesland JM. Clinicopathological associations of CD44 mRNA and protein expression in primary breast carcinomas. *Histopathology*. 2003 Jun;42(6):546-54. PubMed PMID: 12786890. Epub 2003/06/06. eng.
244. Diaz LK, Zhou X, Wright ET, Cristofanilli M, Smith T, Yang Y, et al. CD44 expression is associated with increased survival in node-negative invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2005 May 1;11(9):3309-14. PubMed PMID: 15867228. Epub 2005/05/04. eng.
245. Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6755-63. PubMed PMID: 16061657. Epub 2005/08/03. eng.
246. Afify A, McNiel MA, Braggin J, Bailey H, Paulino AF. Expression of CD44s, CD44v6, and hyaluronan across the spectrum of normal-hyperplasia-carcinoma in breast. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2008 Mar;16(2):121-7. PubMed PMID: 18227732. Epub 2008/01/30. eng.
247. Shipitsin M, Campbell LL, Argani P, Weremowicz S, Bloushtain-Qimron N, Yao J, et al. Molecular definition of breast tumor heterogeneity. *Cancer Cell*. 2007 Mar;11(3):259-73. PubMed PMID: 17349583. Epub 2007/03/14. eng.
248. Tiezzi DG, Valejo FA, Marana HR, Carrara HH, Benevides L, Antonio HM, et al. CD44(+)/CD24 (-) cells and lymph node metastasis in stage I and II invasive ductal carcinoma of the breast. *Med Oncol*. 2011 Jun 29. PubMed PMID: 21713550. Epub 2011/06/30. Eng.
249. Lu X, Xu K, Lu H, Yin Y, Ma C, Liu Y, et al. CD44(+)/CD24(-) cells are transit progenitors and do not determine the molecular subtypes and clinical parameters in breast carcinomas. *Ultrastruct Pathol*. 2011 Apr;35(2):72-8. PubMed PMID: 21299347. Epub 2011/02/09. eng.
250. Nogi H, Suzuki M, Kamio M, Kato K, Kawase K, Toriumi Y, et al. Impact of CD44+CD24- cells on non-sentinel axillary lymph node metastases in sentinel node-positive breast cancer. *Oncol Rep*. 2011 Apr;25(4):1109-15. PubMed PMID: 21308353. Epub 2011/02/11. eng.
251. Oliveira-Costa JP, Zanetti JS, Silveira GG, Soave DF, Oliveira LR, Zorgetto VA, et al. Differential expression of HIF-1alpha in CD44+CD24-/low breast ductal carcinomas. *Diagn Pathol*. 2011;6:73. PubMed PMID: 21824412. Epub 2011/08/10. eng.

252. Fumagalli D, Michiels S, Sotiriou C. CD44+ CD24-/low phenotype and resistance to trastuzumab in HER2-positive breast cancer cell lines. *Pharmacogenomics*. 2011 Jan;12(1):12-3. PubMed PMID: 21213459. Epub 2011/01/11. eng.
253. Badve S, Nakshatri H. Breast-cancer stem cells-beyond semantics. *Lancet Oncol*. 2012 Jan;13(1):e43-8. PubMed PMID: 22225725. Epub 2012/01/10. eng.
254. Fillmore CM, Kuperwasser C. Human breast cancer cell lines contain stem-like cells that self-renew, give rise to phenotypically diverse progeny and survive chemotherapy. *Breast Cancer Res*. 2008;10(2):R25. PubMed PMID: 18366788. Epub 2008/03/28. eng.
255. Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, et al. Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res*. 2007 Feb 1;67(3):1030-7. PubMed PMID: 17283135. Epub 2007/02/07. eng.
256. Lee J, Han DJ, Kim SC. In vitro differentiation of human adipose tissue-derived stem cells into cells with pancreatic phenotype by regenerating pancreas extract. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008 Oct 31;375(4):547-51. PubMed PMID: 18725201. Epub 2008/08/30. eng.
257. Lee CJ, Li C, Simeone DM. Human pancreatic cancer stem cells: implications for how we treat pancreatic cancer. *Transl Oncol*. 2008 Mar;1(1):14-8. PubMed PMID: 18607507. Epub 2008/07/09. eng.
258. Lee CJ, Dosch J, Simeone DM. Pancreatic cancer stem cells. *J Clin Oncol*. 2008 Jun 10;26(17):2806-12. PubMed PMID: 18539958. Epub 2008/06/10. eng.
259. Huang P, Wang CY, Gou SM, Wu HS, Liu T, Xiong JX. Isolation and biological analysis of tumor stem cells from pancreatic adenocarcinoma. *World J Gastroenterol*. 2008 Jun 28;14(24):3903-7. PubMed PMID: 18609717. Epub 2008/07/09. eng.
260. Zhang Y, Wei J, Wang H, Xue X, An Y, Tang D, et al. Epithelial mesenchymal transition correlates with CD24+CD44+ and CD133+ cells in pancreatic cancer. *Oncol Rep*. 2012 May;27(5):1599-605. PubMed PMID: 22322379. Epub 2012/02/11. eng.
261. Zhang C, Li C, He F, Cai Y, Yang H. Identification of CD44+CD24+ gastric cancer stem cells. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Nov;137(11):1679-86. PubMed PMID: 21882047. Epub 2011/09/02. eng.
262. Klarmann GJ, Hurt EM, Mathews LA, Zhang X, Duhagon MA, Mistree T, et al. Invasive prostate cancer cells are tumor initiating cells that have a stem cell-like genomic signature. *Clin Exp Metastasis*. 2009;26(5):433-46. PubMed PMID: 19221883. Epub 2009/02/18. eng.
263. Hurt EM, Kawasaki BT, Klarmann GJ, Thomas SB, Farrar WL. CD44+ CD24(-) prostate cells are early cancer progenitor/stem cells that provide a model for patients

with poor prognosis. *Br J Cancer*. 2008 Feb 26;98(4):756-65. PubMed PMID: 18268494. Epub 2008/02/13. eng.

264. Vermeulen L, Todaro M, de Sousa Mello F, Sprick MR, Kemper K, Perez Alea M, et al. Single-cell cloning of colon cancer stem cells reveals a multi-lineage differentiation capacity. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 9;105(36):13427-32. PubMed PMID: 18765800. Epub 2008/09/04. eng.

265. Yeung TM, Gandhi SC, Wilding JL, Muschel R, Bodmer WF. Cancer stem cells from colorectal cancer-derived cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2010 Feb 23;107(8):3722-7. PubMed PMID: 20133591. Epub 2010/02/06. eng.

266. Shi MF, Jiao J, Lu WG, Ye F, Ma D, Dong QG, et al. Identification of cancer stem cell-like cells from human epithelial ovarian carcinoma cell line. *Cell Mol Life Sci*. 2010 Nov;67(22):3915-25. PubMed PMID: 20549538. Epub 2010/06/16. eng.

267. Oliveira LR, Oliveira-Costa JP, Araujo IM, Soave DF, Zanetti JS, Soares FA, et al. Cancer stem cell immunophenotypes in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2011 Feb;40(2):135-42. PubMed PMID: 21073537. Epub 2010/11/16. eng.

268. Koukourakis MI, Giatromanolaki A, Tsakmaki V, Danielidis V, Sivridis E. Cancer stem cell phenotype relates to radio-chemotherapy outcome in locally advanced squamous cell head-neck cancer. *Br J Cancer*. 2012 Feb 28;106(5):846-53. PubMed PMID: 22333601. Epub 2012/02/16. eng.

269. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 1;16(3):876-87. PubMed PMID: 20103682. Epub 2010/01/28. eng.

270. Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZ, Benhasouna A, Nolan C, et al. A CD44(-)/CD24(+) phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. Jun;133(3):979-95. PubMed PMID: 22119938. Epub 2011/11/29. eng.

271. Tempfer C, Losch A, Heinzl H, Hausler G, Hanzal E, Kolbl H, et al. Prognostic value of immunohistochemically detected CD44 isoforms CD44v5, CD44v6 and CD44v7-8 in human breast cancer. *Eur J Cancer*. 1996 Oct;32A(11):2023-5. PubMed PMID: 8943691. Epub 1996/10/01. eng.

272. Bloushtain-Qimron N, Yao J, Snyder EL, Shipitsin M, Campbell LL, Mani SA, et al. Cell type-specific DNA methylation patterns in the human breast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2008 Sep 16;105(37):14076-81. PubMed PMID: 18780791. Epub 2008/09/11. eng.

273. Torhorst J, Bucher C, Kononen J, Haas P, Zuber M, Kochli OR, et al. Tissue microarrays for rapid linking of molecular changes to clinical endpoints. *Am J Pathol*. 2001 Dec;159(6):2249-56. PubMed PMID: 11733374. Epub 2001/12/06. eng.

274. Horvath L, Henshall S. The application of tissue microarrays to cancer research. *Pathology*. 2001 May;33(2):125-9. PubMed PMID: 11358042. Epub 2001/05/19. eng.
275. Hoos A, Urist MJ, Stojadinovic A, Mastorides S, Dudas ME, Leung DH, et al. Validation of tissue microarrays for immunohistochemical profiling of cancer specimens using the example of human fibroblastic tumors. *Am J Pathol*. 2001 Apr;158(4):1245-51. PubMed PMID: 11290542. Epub 2001/04/06. eng.
276. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Olsen DA, Provost E. Amplification of tissue by construction of tissue microarrays. *Exp Mol Pathol*. 2001 Jun;70(3):255-64. PubMed PMID: 11418004. Epub 2001/06/22. eng.
277. Rimm DL, Camp RL, Charette LA, Costa J, Olsen DA, Reiss M. Tissue microarray: a new technology for amplification of tissue resources. *Cancer J*. 2001 Jan-Feb;7(1):24-31. PubMed PMID: 11269645. Epub 2001/03/28. eng.
278. Simon R. Applications of tissue microarray technology. *Methods Mol Biol*. 2010;664:1-16. PubMed PMID: 20690047. Epub 2010/08/07. eng.
279. Jawhar NM. Tissue Microarray: A rapidly evolving diagnostic and research tool. *Ann Saudi Med*. 2009 Mar-Apr;29(2):123-7. PubMed PMID: 19318744. Epub 2009/03/26. eng.
280. Zhang D, Salto-Tellez M, Putti TC, Do E, Koay ES. Reliability of tissue microarrays in detecting protein expression and gene amplification in breast cancer. *Mod Pathol*. 2003 Jan;16(1):79-84. PubMed PMID: 12527717. Epub 2003/01/16. eng.
281. Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G. Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet*. 2001 Apr;10(7):657-62. PubMed PMID: 11257096. Epub 2001/03/21. eng.

6. ARTIGO ORIGINAL EM INGLÊS

**EXPRESSION OF CANCER STEM CELL MARKERS IN BASAL AND
PENTA-NEGATIVE BREAST CARCINOMAS - A STUDY OF A SERIES
OF TRIPLE-NEGATIVE TUMORS**

ABSTRACT

INTRODUCTION: Breast cancer is a heterogeneous disease, and there is a need for more refined diagnostic and prognostic criteria. Immunohistochemistry, as a breast prognostic panel, has given rise to triple-negative carcinoma, as well as histogenetics highlighted basal carcinoma. Concomitantly, the understanding of the biological origins of neoplasia and its heterogeneity has been strongly debated through the theme of cancer stem cells. **OBJECTIVES:** To investigate the prevalence of basal and penta-negative carcinomas in a sample of triple-negative carcinomas and to establish associations with cancer stem cells (CD44/CD24 expression profiles) and the clinicopathological variables within these tumors. **METHODS:** Ninety-four triple-negative breast carcinomas were tested for CK5/6, HER1, CD44 and CD24. The expression of these markers was evaluated by automated immunohistochemistry using a simple positivity score (percentage of cells) and was correlated with the clinicopathological and survival analysis data. **RESULTS:** Basal carcinomas had higher tumor grades than penta-negative carcinomas ($p=0.004$). CD44 negativity ($p=0.007$) and the CD44⁻CD24⁺ phenotype ($p=0.013$) were associated with increased vascular invasion amongst the triple-negative carcinomas. CD44 expression was associated with basal carcinomas ($p=0.007$). The CD44⁻CD24^{-/low} phenotype was associated with penta-negative carcinomas. None of the variables in the study were associated with clinical outcome. **CONCLUSION:** Basal and penta-negative breast carcinomas are closely related tumor subtypes. Our study is the first to be specifically designed to assess the presence of breast cancer stem cells in basal and penta-negative carcinomas. The CD44⁻CD24^{-/low} phenotype was associated with the penta-negative subtype, and the CD44⁻CD24⁺ phenotype was associated with vascular invasion. These results require histogenetic confirmation in larger studies.

KEYWORDS: Breast cancer, basal, triple-negative, penta-negative, stem cells, CD44 and CD24

INTRODUCTION

Breast cancer is a heterogeneous disease. Its clinical presentation, biological potential, response to treatment and prognosis can differ significantly. (1-10) The diagnostic and prognostic factors traditionally used in breast cancer have proven insufficient in some cases. There is a clear need for more refined diagnostic criteria, as well as more accurate prognostic parameters so that breast cancer can be treated more effectively and so that the probability of recurrence can be more clearly established. (11-15)

Depending on immunohistochemistry (IH), triple-negative (TN) breast cancer emerged in the literature due to its defined poor prognosis and lack of important therapeutic modalities, such as anti-estrogen and anti-HER2 therapies. (16-23) Likewise, in the histogenetic reclassification of breast tumors, basal carcinoma, which was discovered as a result of DNA microarray research, also exhibits aggressive biological potential. (1-4)

Due to multiple similarities between the two tumor types, some consider triple-negative and basal carcinomas to be synonymous. However, 70-80% of basal carcinomas, as defined by DNA microarrays, show a triple-negative phenotype by IH and 70-80% of triple-negative carcinomas, as defined by a negative IH prognosis panel, show a basal genotype based on DNA microarrays. (24-31) Nevertheless, triple-negative carcinomas are defined by an IH panel and basal carcinomas are defined by histogenetic diagnosis. Despite a considerable overlap between these tumor groups, there is a large component of both tumor groups that is unrelated. Recent studies in triple-negative breast carcinoma, evaluated on a simplified IH

panel, have indicated that basal carcinomas exhibit a worse prognosis than non-basal triple-negative carcinomas (penta-negative). (32-35)

The biological origin of neoplasia through the theory of cancer stem cells (CSCs) has been highlighted in the literature. (36-45) The prospective identification of CSCs through the CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype was demonstrated in breast cancer. (46, 47) Because it was also considered a marker of poor prognosis in breast carcinoma, this CSC phenotype rapidly gained notoriety. (45, 48-52) However, in a few studies, the triple-negative, basal and penta-negative subtypes have been compared for the different immunohistochemical expression of CD44 and CD24. (53-56)

This study was designed to evaluate CSC marker (CD44 and CD24) expression in basal and penta-negative breast carcinomas in a series of triple-negative carcinomas.

MATERIALS AND METHODS

Samples

All triple-negative (i.e., estrogen and progesterone negative and HER2 negative) breast carcinomas were retrieved from the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pathology department database between 2001 and 2006. The sample set included 119 patients, 14 of whom were excluded because the paraffin blocks no longer being available, nine due to lack of or little residual tumor in the block (core biopsy) and two due to inappropriate neoplasia for testing (carcinoma *in situ* and bone marrow metastases). The final sample consisted of 94 patients. This study was

submitted to and approved by the Research Ethics Committee of the Research and Postgraduate Group of the HCPA (GPPG 08446).

Clinicopathological data

Clinical, anatomopathological and follow-up data were collected by searching the HCPA database or from private medical records and by telephone whenever necessary and included the following information: patient age at diagnosis, disease-free interval and death, tumor type and size, histological tumor grading, lymphovascular invasion and axillary lymph node involvement. The histological grading was determined according to the Nottingham criteria. (12) To calculate recurrence, local and distant recurrences were recorded.

Tissue microarrays

Tissue microarray was performed in all cases where there was sufficient tumor for extraction in the donor paraffin blocks with the removal of a 3-mm diameter tumor cylinder from each tumor. The core biopsy samples (23/94 cases) underwent IH analysis were individually assessed.

Immunohistochemistry

All IH reactions were processed on an automated platform Dako Autostainer Link 48 (DAKO, Carpinteria, CA, USA). The IH technique was initiated on a Dako automated device (PT Link model) with a three-stage antigen retrieval process: deparaffinization, rehydration and antigen retrieval using high- and low-pH FLEX

buffers (Dako), depending on the type of antibody used. Primary antibody incubation was performed for 20 minutes at room temperature. Amplification was performed using the FLEX EnVision system (Dako). The secondary antibodies were conjugated to the EnVision polymer for 20 minutes, and the samples were stained using the DAB chromogen combined with FLEX liquid (Dako).

The CK5/6 Dako antibody (D5/16B4 clone, ready to use, retrieval in a high-pH buffer for 20 minutes at 98°C), the Zymed HER1 antibody (EGFR) (31g7 clone, ready to use, with Pepsin Digest-all 3, retrieval for 5 minutes at 37°C), the Cell Marque CD44 antibody (MRQ-13 clone, 1:200 dilution, retrieval in a high-pH buffer for 20 minutes at 98°C) and the Neomarquers CD24 antibody (SN3b clone, 1:50 dilution, retrieval in a low-pH buffer for 20 minutes at 98°C) were used (Table 1).

Table 1: Antibodies used in the immunohistochemistry reactions.

ANTIBODY	CLONE	MANUFACTURER	DILUTION
CYTOKERATIN 5/6	D5/16B4	Dako	Ready to use
HER1 (EGFR)	31G7	Zymed	Ready to use
CD44	MRQ-13	Cell Marque	1:200
CD24	SN3b	Neomarquers	1:50

The slides were assessed by two experienced breast pathologists based on a consensus of diagnostic observations and without prior knowledge of the clinicopathological characteristics of the studied tumors. All cases were diagnosed with respect to the quantity of positive tumor cells, following the scheme shown in Table 2.

Table 2: Score values (CK5/6, HER1, CD44 and CD24).

score 0	score 1	score 2	score 3	score 4	score 5
0%	≤ 1%	≤ 10%	≤ 33%	≤ 66%	≥ 67%

The triple-negative breast carcinomas were considered basal when there was expression of CK5/6 and/or HER1; the penta-negative tumors were those that were negative for both markers. For the CK5/6 marker, the cytoplasmic staining of the neoplastic cells was taken into account; for HER1, membrane staining was considered. All expression scoring of at least 1 (score) was considered positive. (6, 31, 32, 35) For CD44 and CD24, the membrane and cytoplasmic staining of neoplastic cells was considered. CD44 expression was considered positive starting from a score of 1. CD24 scores of 4 and 5 were considered positive. Scores of 0, 1, 2 and 3 were considered negative or low (*-/low*). (51-53, 55, 57)

Sequence analysis

All the triple-negative breast carcinomas were initially tested for CK5/6 and HER1. Subsequently, we divided them into two main groups: basal breast carcinomas and penta-negative breast carcinomas (negative for CK5/6 and HER1). The relationships between these two subtypes with the clinicopathological parameters of the study and tumor recurrence and death were then analyzed within the study sample. During the second stage, the samples underwent CD44 and CD24 testing. The IH phenotypes were also analyzed for their associations with clinicopathological parameters, tumor recurrence and death. In the third and final

stage, we observed the associations of basal and penta-negative carcinomas with the different CD44/CD24 phenotypes.

Statistical analysis

The data are presented as the means and standard deviations or absolute numbers and percentages. The categorical variables were compared using a Chi-squared test, and an exact p -value was obtained for the test. Whenever necessary, an analysis of residuals was also performed.

Survival and recurrence were analyzed using the Survival Analysis method. The date of surgery or biopsy collection was used as the starting point, and the last recorded follow-up or death was used as the final point. Kaplan-Meier curves were compared using the log-rank test.

The analyses were performed using SPSS (PASW Statistics 18.0 [2009]) available at www.spss.com.hk/statistics and WinPEPI. (58) We considered p -values < 0.05 to be statistically significant.

RESULTS

The clinicopathological characteristics are shown in Table 3. The mean age at neoplasia diagnosis was 55.4 years, with the youngest patient being 25 years old and the eldest being 81 years old. The results indicated that 85.1% of triple-negative carcinomas were ductal ductal not otherwise specified (NOS) type (80 cases), and the remaining histological types identified were within the expected range for distribution of breast cancers at a population level. The majority of the tumors (43 cases, 45.7%) belonged to the histological grade 3 carcinomas. A tumor size greater than 2.0 cm was identified in 50 cases (53.4%), of which 15 (15.9%) were larger than 5.0 cm. The mean follow-up time was 71.5 months, ranging from 2 to 353 months. Of the 94 patients studied from the time of identification of the neoplasia up until the final observation, 31 died.

The majority of the tumors (75.5%) analyzed were from surgical specimens (nodulectomies and oncological surgeries), with the objective of obtaining sufficient material to build tissue microarrays (TMAs); the remaining tumors were assessed from core-needle biopsies. Thirteen cases included in the study were selected based on hormone panels performed on material from patients with tumor recurrence, whose biopsies or oncological surgeries took place before the initial date of this study.

Table 3: Clinicopathological parameters of the triple-negative series.

	n	%
Age (years)	77 ^a	81.9
mean (variation)	55.4 (25-81)	
Histologic type		
ductal	80	85.1
lobular	2	2.1
atypical medullary	1	1
metaplastic	1	1
mixed (ductal + lobular)	1	1
NA	9	9.5
Tumor size		
≤ 2.0 cm	21	22.3
2.0 - 4.9 cm	35	37.2
≥ 5.0 cm	15	15.9
NA	23	24.4
Tumor Grade		
grade 1	3	3.1
grade 2	26	27.6
grade 3	43	45.7
NA	22	23.4
Lymphovascular Invasion		
present	21	22.3
absent	26	27.6
NA	47	50
Lymph nodes		
negative	34	36.8
1 - 3 LN+	18	19.1
≥ 4 LN+	22	23.4
NA	20	21.3
Follow-up	75	79.7
mean ^b (variation)	71.5 (2-353)	
Recurrence		
no	26	27.7
yes	37	39.4
NA	31	33.0
Condition at the end of the study		
alive	46	48.9
deceased	31	33.0
NA	17	18.1
Type of material analyzed		
TMA (surgery and nodulectomy)	71	75.5
biopsy (core-needle)	23	24.4

NA = not available; ^a includes surgical patients before 2001; ^b months to death/censored

Expression of CK5/6 and HER1 in triple-negative carcinomas

The expression of CK5/6 was cytoplasmic, and HER1 was expressed in the membrane (Figures 1 and 2). Of the 94 triple-negative tumors studied, 63.8% (60/94) were identified as basal carcinomas, i.e., they expressed at least one of the two basal markers (CK5/6 and/or HER1), and 36.2% (34/94) were identified as penta-negative carcinomas. In the basal group, 32.9% (31) were concomitantly positive for CK5/6 and HER1. Individually, HER1 was the most common basal marker, with 48 positive cases (51.5%) versus 43 (45.7%) CK5/6-positive cases (Table 4).

Table 4: Frequency of basal carcinoma in 94 triple-negative invasive breast tumors.

	n	%
CK5/6 and/or HER1	60	63.8
CK5/6 and HER1	31	32.9
HER1	48	51.5
CK5/6	43	45.7

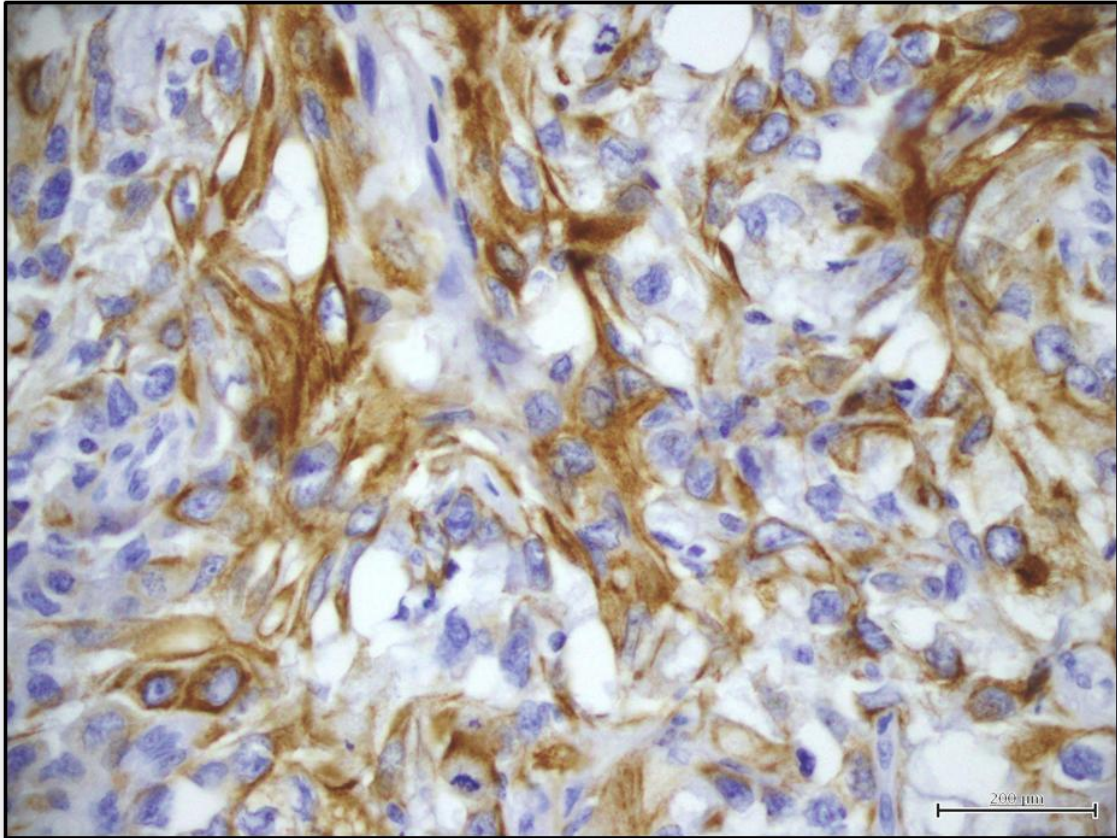


Figure 1: cytoplasmic CK5/6 expression (400X).

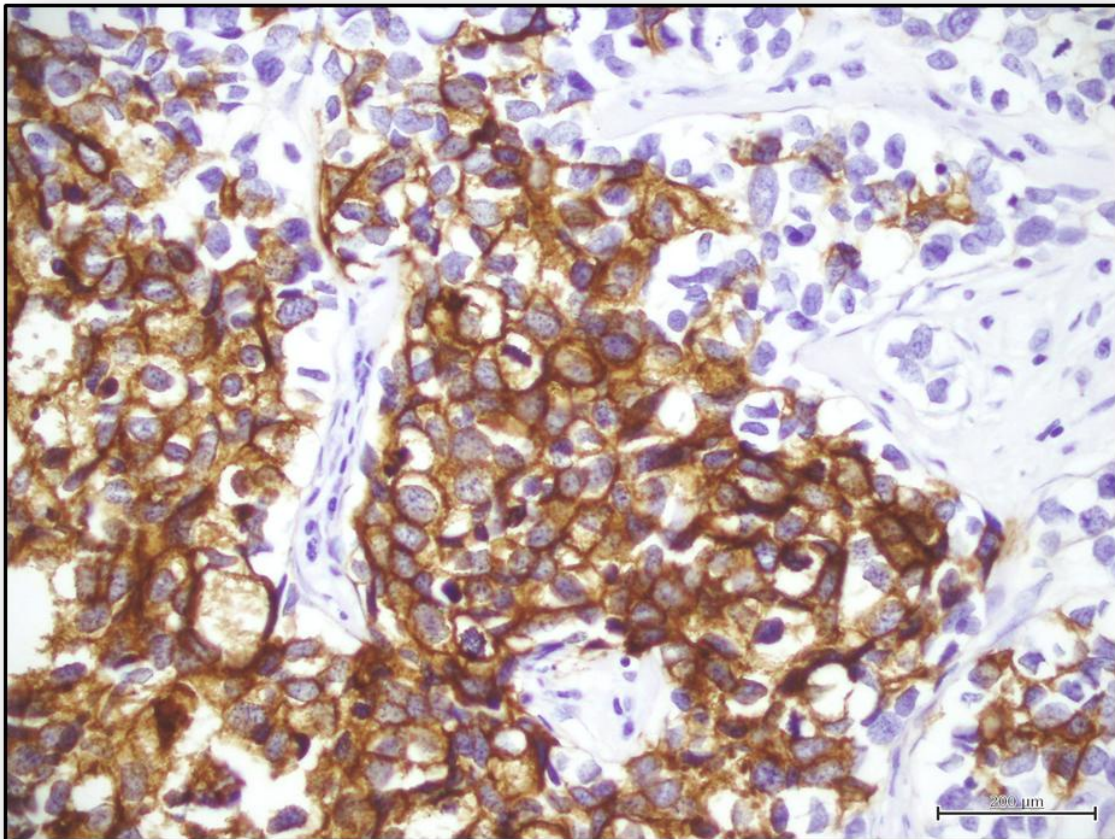


Figure 2: membranous HER1 expression (400X).

Basal and penta-negative carcinomas and clinicopathological variables

There were no significant differences between basal and penta-negative groups for age (with a cut-off point of 40 years), type of carcinoma, tumor size, lymphovascular invasion or axillary lymph node involvement. We also studied age with a cut-off point of 50 years, which yielded no significant results ($p = 0.801$). However, high histological tumor grade (grade 3) was significantly more frequent among basal carcinomas (70.2%) than penta-negatives (40.0%, $p = 0.004$) (Table 5). Among the 94 study cases, there were 43 histological grade 3 carcinomas, with 33 cases belonging to the basal group and 10 to the penta-negative group.

Table 5: Clinicopathological parameters and tumor subtypes.

	Basal	Penta-negative	<i>p</i>
	n (%)	n (%)	
Age (years)			1.000
> 40	45 (90.0)	24 (88.9)	
≤ 40	5 (10.0)	3 (11.1)	
total	50	27	
Carcinoma type			0.769
ductal	52 (94.5)	28 (93.3)	
lobular	1 (1.8)	1 (3.3)	
medullary ^a	1 (1.8)	0 (0)	
metaplastic	1 (1.8)	0 (0)	
mixed ^b	0 (0)	1 (3.3)	
Total	55	30	
Tumor size			0.700
≤ 2.0 cm	14 (28.6)	4 (18.2)	
2.0 - 4.9 cm	25 (51.0)	13 (59.1)	
≥ 5.0 cm	10 (20.4)	5 (22.7)	
total	49	22	
Tumor grade			0.004
grade 1	3 (6.4)	0 (0)	
grade 2	11 (23.4)	15 (60.0)	
grade 3	33 (70.2)	10 (40.0)	
total	47	25	
Lymphovascular invasion			0.342
present	13 (39.4)	8 (57.1)	
absent	20 (60.6)	6 (42.9)	
Lymph nodes			0.902
negative	23 (46.9)	11 (44.0)	
1 - 3 LNs+	11 (22.4)	7 (28.0)	
≥ 4 LNs+	15 (30.6)	7 (28.0)	
total	49	25	

^a atypical; ^b (ductal + lobular)

Basal and triple-negative carcinomas and survival analyses

For survival analysis, the date of oncological surgery was taken as the starting point for the follow-up time. There were 11 patients who underwent oncological surgery before 2001 who entered this study as a result of a triple-negative IH breast panel assessment of tumor recurrence specimens by histological diagnosis between 2001 and 2006. In five other patients, oncological surgical treatment was not performed, and the date of the biopsy was taken as the starting point for follow-up. Patients without clinical follow-up were not included in the survival analysis.

Of the 75 patients who could be evaluated for overall survival, 50% were alive at 96 months (i.e., 8 years) (Figure 3).

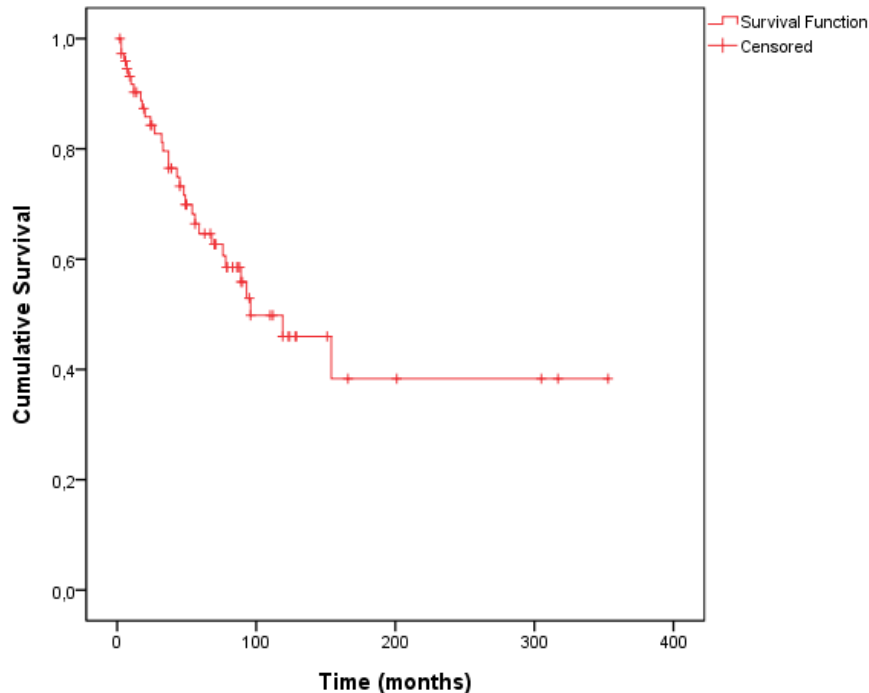


Figure 3: Kaplan-Meier survival curve in triple-negative patients.

Of the 75 patients, 48 belonged to the basal group and 27 belonged to the penta-negative group; there were 19 events and 29 censored in the former and 12 events and 15 censored in the latter. The overall survival analysis curve was not different between the basal and penta-negative groups ($p = 0.642$) (Figure 4). To complement the survival analysis between these two groups, we made two additional observations. First, we created a subgroup of basal carcinomas in which the expression of the two markers (CK5/6 and HER1) was obligatory (i.e., the expression of a single marker was insufficient to establish a basal profile, which required co-expression). There was no difference in survival ($p = 0.593$). Second, we returned to the initial group (75 patients) and excluded all patients who entered the study based

on IH triple-negative testing performed on tumor recurrence material between 2001 and 2006 (13 cases). With the remaining 62 patients, there was no difference in survival between basal and penta-negative patients ($p = 0.591$; data not shown).

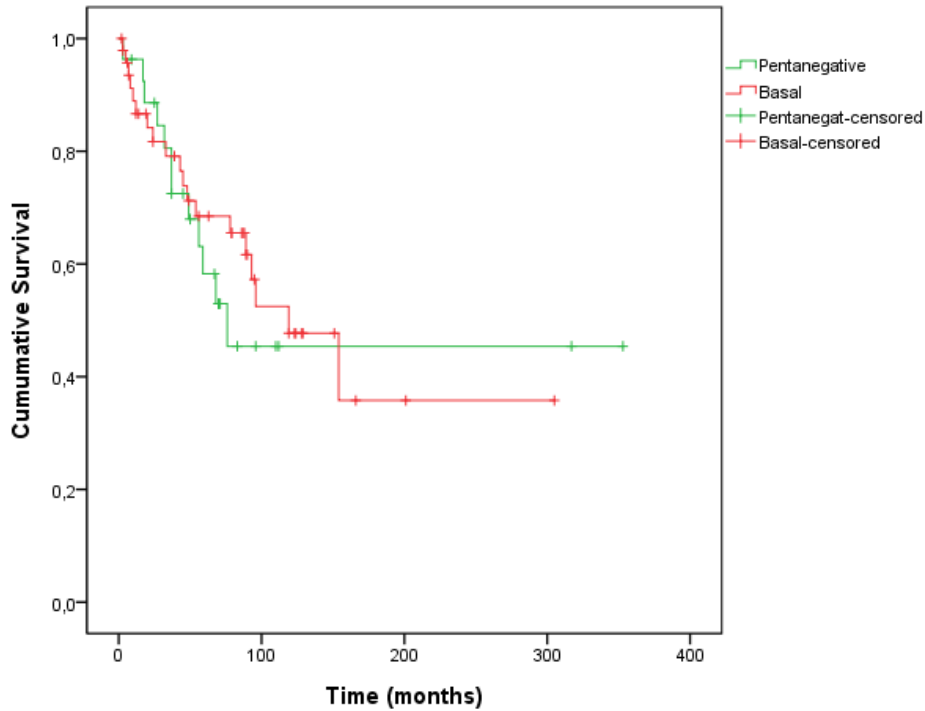


Figure 4: Kaplan-Meier survival curve among basal and penta-negative tumors.

In relation to tumor recurrence, a total of 71 patients could be evaluated; 41 of these patients belonged to the basal tumors and 22 belonged to the penta-negative tumors. There were 24 events and 17 censored in the basal group and 13 events and 9 censored in the penta-negative group. The tumor recurrence curve was not different between the two groups ($p = 0.712$) (Figure 5).

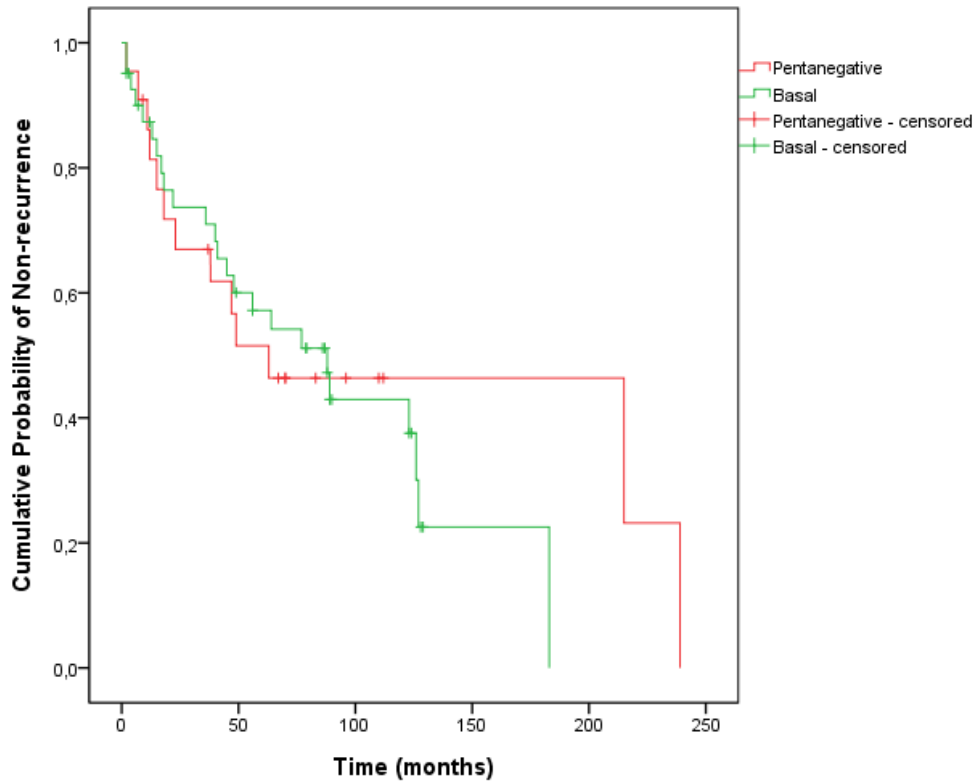


Figure 5: Kaplan-Meier disease-free survival curve among basal and penta-negative tumors.

Expression of CD44 and CD24 and clinicopathological variables

In our study, we observed expression of CD44 (score of 1 or more) in 34 of the 94 triple-negative tumors (36.17%) and of CD24 (scores of 4 and 5) in 30 of the 94 cases (31.9%). CD44 staining identified in triple-negative tumors was predominantly in the membrane (Figure 6), and CD24 was expressed in both the membrane (Figure 7) and the cytoplasm (Figure 8).

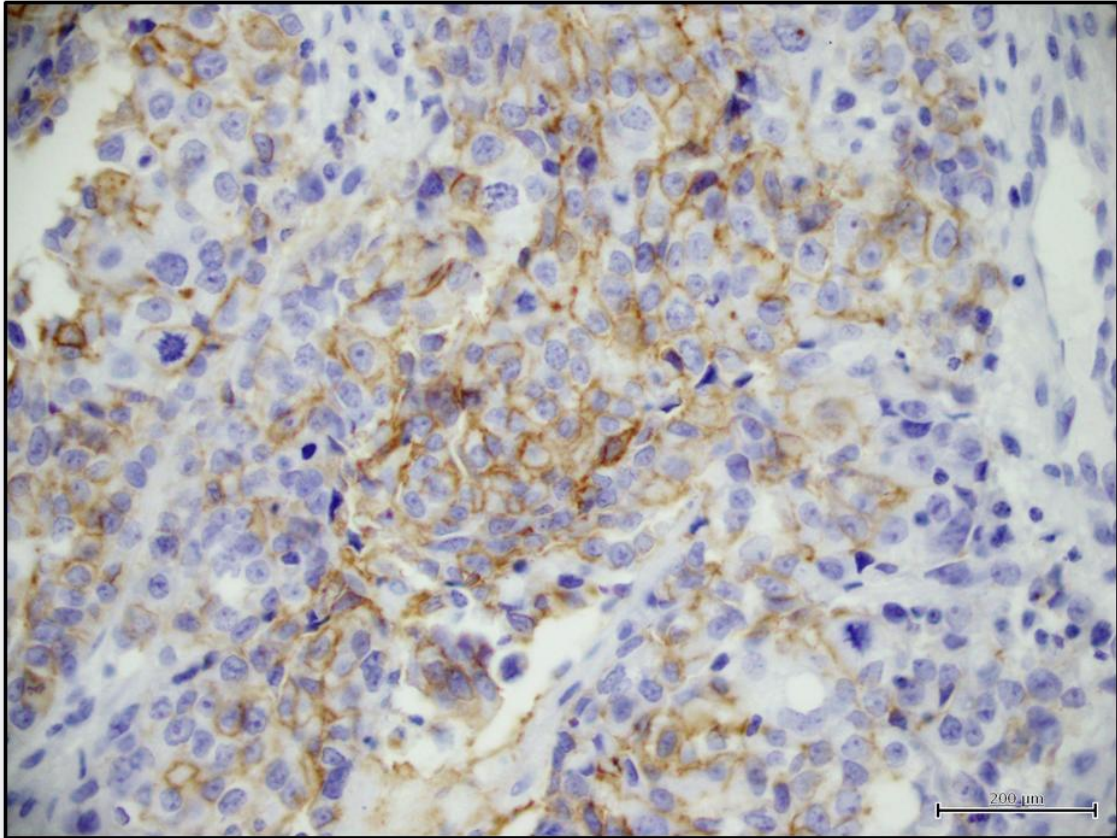


Figure 6: CD44 membranous staining (400X).

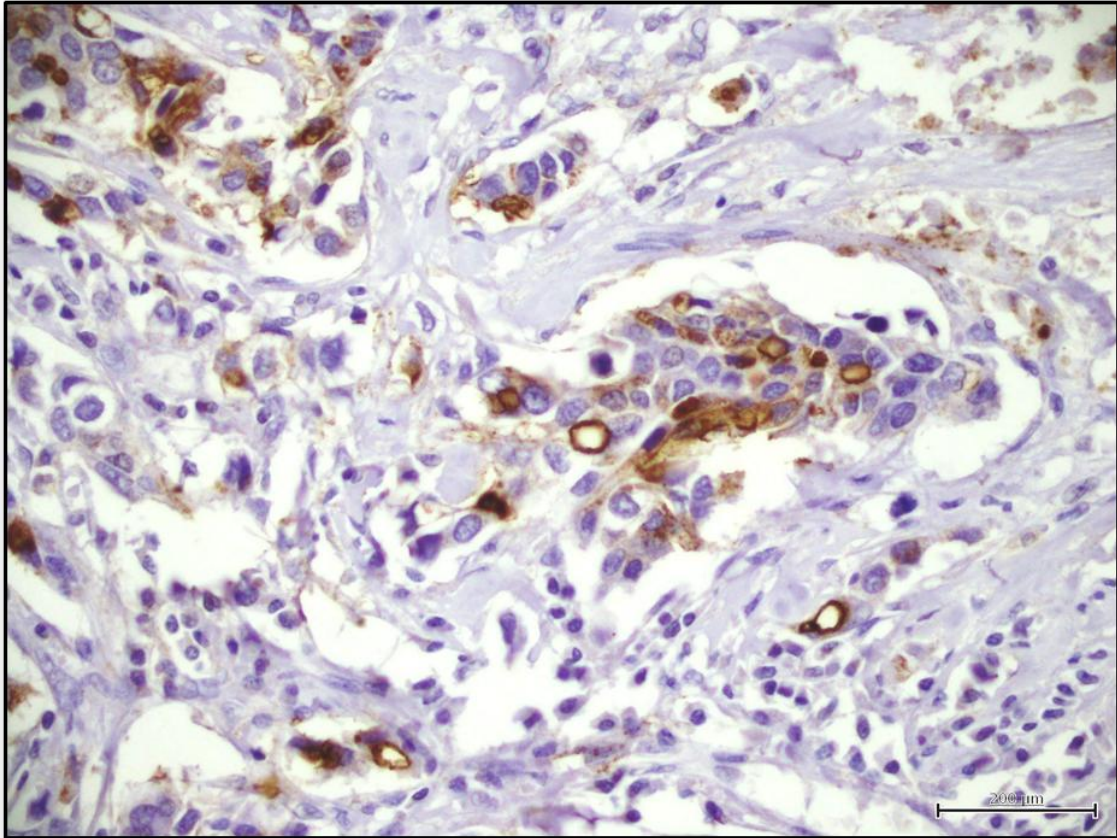


Figure 7: CD24 mainly membranous staining (400X).

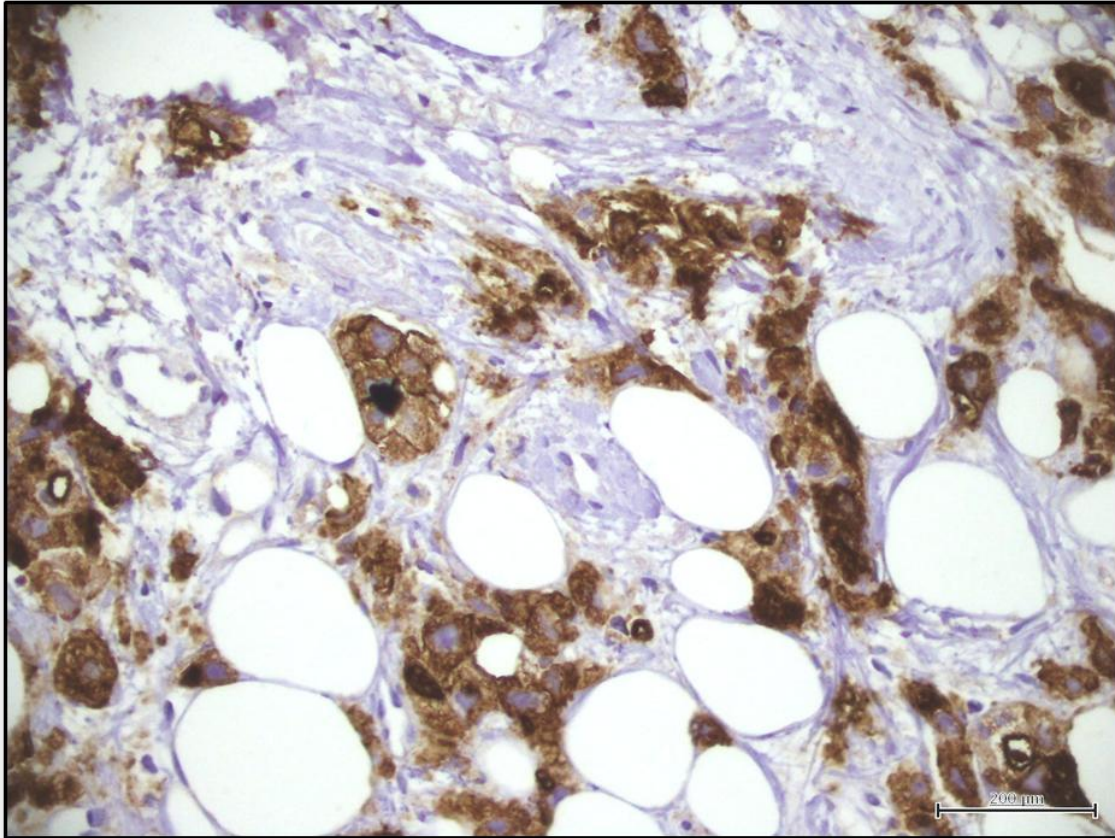


Figure 8: CD24 mainly cytoplasmic staining (400X).

CD44 and CD24 expression and their association with the clinical and pathological variables of this study are shown in Table 6. In relation to CD44 expression, we identified no differences in age, carcinoma type, tumor size and grade or lymph node involvement. However, the presence of lymphovascular invasion was significantly associated with CD44 negativity ($p = 0.007$). CD24 expression did not show any association with the clinicopathological variables of this study.

Table 6: Clinicopathological parameters and CD44 and CD24 expression.

	CD44			<i>p</i>	CD24			<i>p</i>
	n	negative	positive		n	negative	positive	
Age (years)				1.000				0.248
> 40	69	43	26		69	43	26	
≤ 40	8	5	3		8	7	1	
Carcinoma type				0.573				1.000
ductal	80	50	30		80	53	27	
lobular	2	2	0		2	1	1	
medullary ^a	1	0	1		1	1	0	
metaplastic	1	1	0		1	1	0	
mixed ^b	1	1	0		1	1	0	
Tumor size				0.098				0.830
≤ 2.0 cm	18	7	11		18	12	6	
2.0 - 4.9 cm	38	26	12		38	28	10	
≥ 5.0 cm	15	10	5		15	10	5	
Tumor grade				0.751				1.000
grade 1	3	2	1		3	2	1	
grade 2	26	18	8		26	18	8	
grade 3	43	25	18		43	29	14	
LVI				0.007				0.543
present	21	17	4		21	12	9	
absent	26	10	16		26	18	8	
Lymph nodes				0.250				1.000
negative	34	19	15		34	24	10	
1 - 3 LNs+	18	10	8		18	12	6	
≥ 4 LNs+	22	17	5		22	15	7	

a atypical; b (dual + lobular); LVI = lymphovascular invasion

CD44/CD24 phenotype and clinicopathological variables

Combining CD44 and CD24 expression for all sample tumors, we did not observe any differences between the four immunophenotypes for age, carcinoma type, tumor size, tumor grade or lymph node involvement (Table 7). There was a difference between the four phenotypes for lymphovascular invasion ($p = 0.013$). A residual analysis revealed that CD44⁻CD24⁺ was the only immunophenotype associated with vascular invasion ($p = 0.011$).

Table 7: Clinicopathological parameters according to CD44/CD24 phenotypes.

	n	CD44 ⁺ CD24 ^{-/low}	CD44 ⁺ CD24 ⁺	CD44 ⁻ CD24 ⁺	CD44 ⁻ CD24 ^{-/low}	p
Age (years)						0.445
> 40	69	13	13	13	30	
≤ 40	8	3	1	0	4	
Carcinoma type						0.891
ductal	80	17	14	13	36	
lobular	2	0	1	0	1	
medullary ^a	1	1	0	0	0	
metaplastic	1	0	0	0	1	
mixed ^b	1	0	0	0	1	
Tumor size						0.282
≤ 2.0 cm	18	6	1	5	6	
2.0 - 4.9 cm	38	8	6	4	20	
≥ 5.0 cm	15	4	4	1	6	
Tumor grade						0.108
grade 1	3	1	1	0	1	
grade 2	26	2	2	6	16	
grade 3	43	13	9	5	16	
LVI						0.013
present	21	3	8	1	9	
absent	26	10	2	6	8	
Lymph nodes						0.716
negative	34	9	4	6	15	
1 - 3 LNs+	18	5	3	3	7	
≥ 4 LNs+	22	2	4	3	13	

^a atypical; ^b (ductal + lobular); LVI = lymphovascular invasion

CD44 and CD24 expression and survival analyses

Of the 75 patients available for overall survival analysis, we observed that the CD44 expression was positive in 29 cases (38.6%). Among these 29 cases, 11 patients died; among the 46 CD44-negative cases, 20 patients died. There was no significant difference in survival between patients with or without CD44 expression ($p = 0.341$) (Figure 9). CD24 expression (scores 4 and 5) was observed in 27 tumors (36.0%), which were associated with 11 deaths. In the CD24^{-/low} group, which consisted of 48 tumors, there were 20 deaths. There was no difference between CD24⁺ and CD24^{-/low} groups for overall survival in this study ($p = 0.706$) (Figure 10).

Based on the four CD44 and CD24 association profiles (CD44/CD24 phenotypes), there was no difference between groups in for overall survival ($p = 0.401$) (Figure 11).

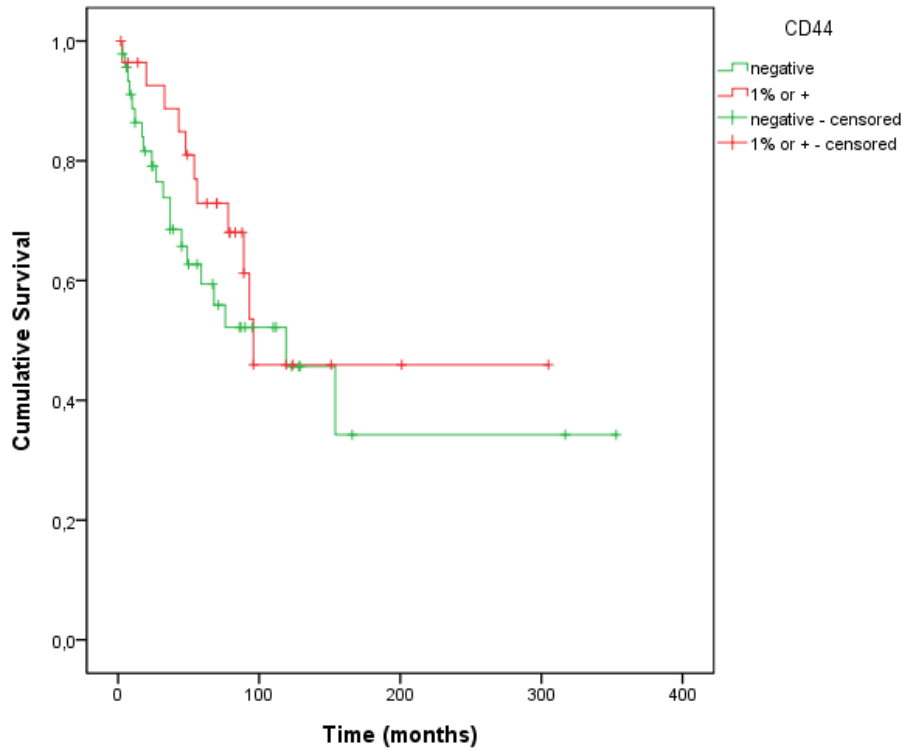


Figure 9: Kaplan-Meier survival curve according to CD44 expression ($p = 0.341$).

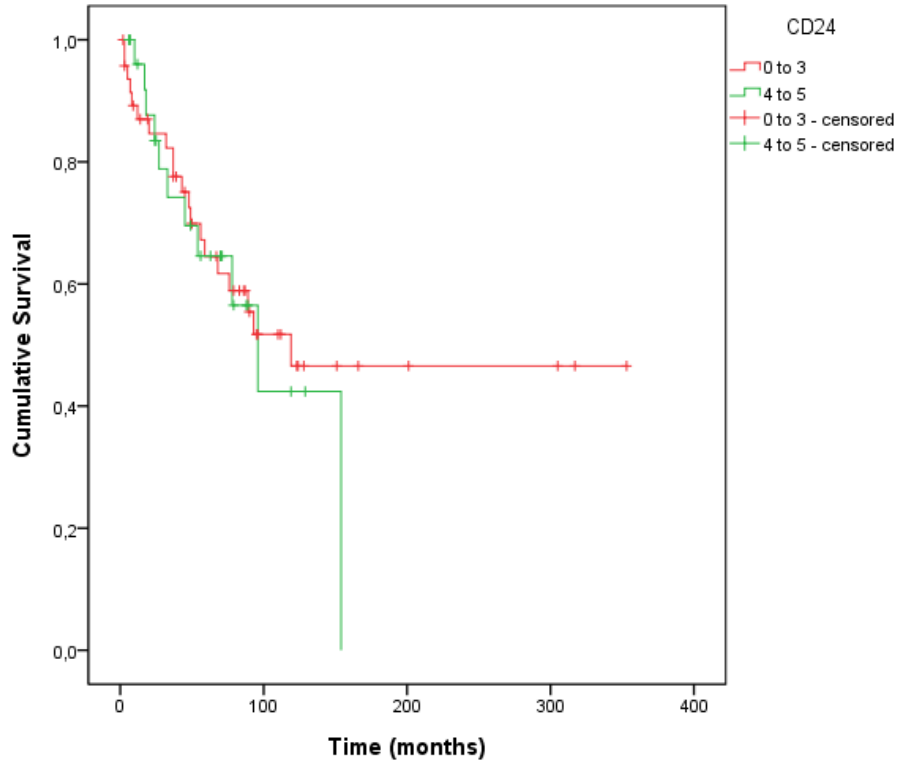


Figure 10: Kaplan–Meier survival curve according to CD24 expression ($p = 0.706$).

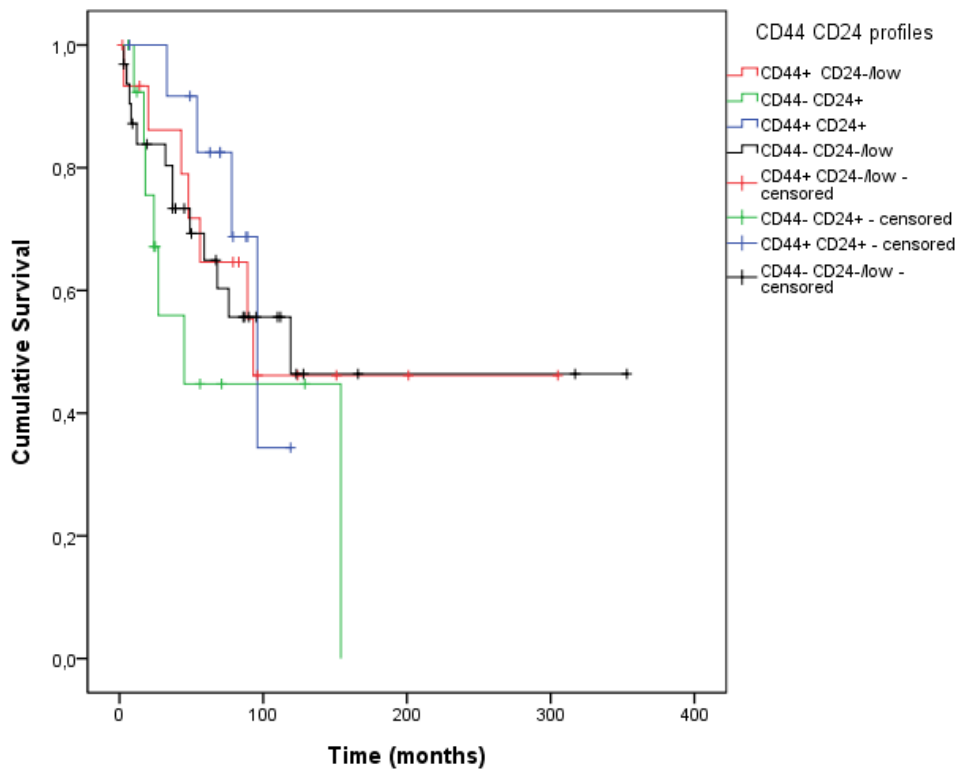


Figure 11: Kaplan–Meier survival curve according to CD44/CD24 phenotypes ($p = 0.401$).

Regarding tumor recurrence, we obtained data for 63 patients for comparison. We found that CD44 expression occurred in 26 tumors (41.2%), with 14 deaths observed in this group. In the CD44-negative group, in which there were 37 cases, there were 23 deaths. There was no significant difference regarding recurrence between CD44-positive and CD44-negative tumors ($p = 0.531$). Among the 20 CD24-positive cases (scores 4 and 5), there were 10 deaths. In the CD24^{-low} group, there were 27 deaths out of a total of 43 tumors. There was neither a difference between the groups for CD24 expression ($p = 0.618$) nor a difference in disease-free survival between the four CD44 and CD24 immunophenotypes ($p = 0.684$) (Figure 12).

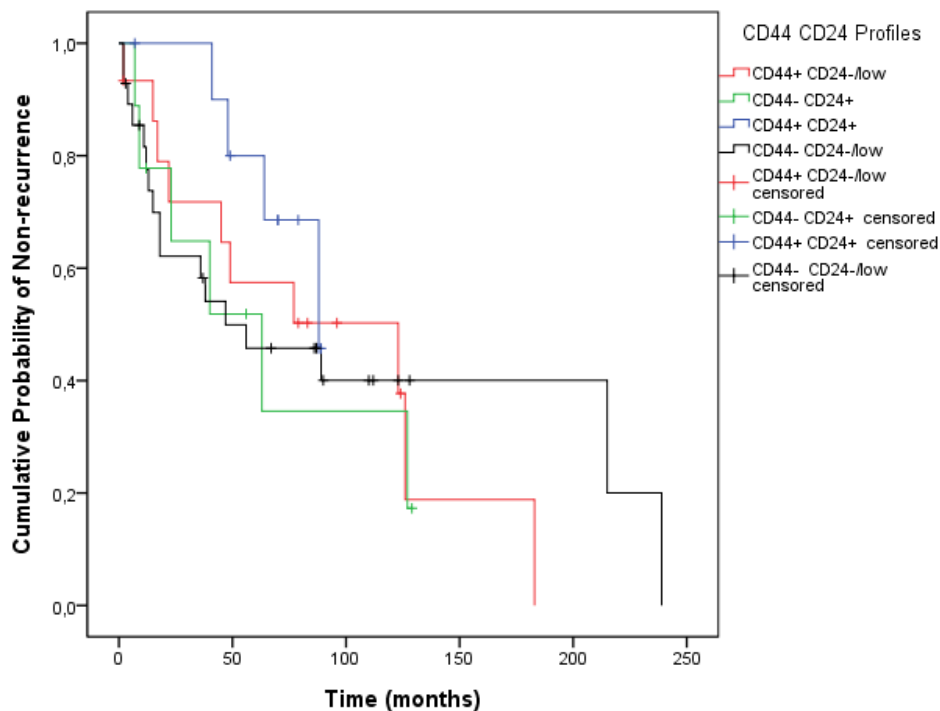


Figure 12: Kaplan–Meier disease-free survival curve according to CD44/CD24 phenotypes ($p = 0.684$).

CD44 and CD24 and the basal and penta-negative groups

The association of the CD44 and CD24 markers with the basal and penta-negative carcinomas is shown in Table 8. The global expression of CD44 for the 94 triple-negative study carcinomas was 36.2% (34 cases), of which 28 cases were in the basal group and only six were in the penta-negative group. This difference was statistically significant ($p = 0.007$). After raising the cut-off point of CD44 positivity to 10%, the difference between these two groups was not maintained ($p = 0.208$). Regarding CD24, positivity was identified in 30 study cases (31.9%), with 21 cases in the basal group and 9 cases in the penta-negative group. The tumors considered negative or of low expression (CD24^{-/low}) made up 68.1% (64 cases). Among these, there were 39 basal and 25 penta-negative carcinomas. There was no significant difference between the basal and the penta-negative groups for CD24 expression ($p = 0.492$).

When assessing the CD44 and CD24 co-expression profiles for the basal and penta-negative groups, we found that there was significant difference between the four groups ($p = 0.04$). Residual analysis revealed that this difference occurred mainly due to the high number of cases negative for both markers (CD44⁻CD24^{-/low} phenotype) ($p = 0.019$). Comparing the three groups in which there was positivity for at least one of the markers (CD44 and/or CD24), the CD44⁺CD24^{-/low} subgroup was near statistical significance ($p = 0.064$) (Table 8).

Table 8: CD44 and CD24 expression according to tumor group.

	TN (n=94)	BASAL (n=60)	PN (n=34)	<i>p</i>
CD44				0.007
positive (> 0%)	34 (36.2%)	28 (46.7%)	6 (17.6%)	
negative	60 (63.8%)	32 (53.3%)	28 (82.4%)	
CD24				0.492
positive (> 33%)	30 (31.9%)	21 (35%)	9 (26.5%)	
negative/low	64 (68.1%)	39 (65%)	25 (73.5%)	
CD44CD24				0.040 ^a
CD44 ⁺ CD24 ^{-/low}	21 (22.3%)	17 (28.3%)	4 (11.8%)	0.064 ^b
CD44 ⁺ CD24 ⁺	13 (13.8%)	11 (18.3%)	2 (5.9%)	0.093 ^b
CD44 ⁻ CD24 ^{-/low}	43 (45.7%)	22 (33.7%)	21 (61.8%)	0.019 ^b
CD44 ⁻ CD24 ⁺	17 (18.1%)	10 (16.7%)	7 (20.6%)	0.635 ^b

^a global heterogeneity test between tumor types regarding CD44CD24 phenotypes; ^b residual analysis.

DISCUSSION

Breast cancer is a heterogeneous disease, and there is a real need to refine diagnostic methods. Immunohistochemistry and histogenetics are two fundamental tools for this purpose. The possibility of genetically classifying breast cancers, which was proposed more than a decade ago, was a crucial step for breast pathology. (1-4) However, the biggest challenge is the consensus readjustment of classic histopathological criteria and the future role of IH, because both of which are inexpensive and more widespread than genetic diagnosis methods. (7, 8, 10)

Among histogenetic tumor groups, basal carcinoma represents 7-19% of breast cancers, and it has one of the worst prognoses. (1-4, 28, 59-68) Triple-negative carcinomas, as defined by IH, represent 10-17% of breast cancers and also have a poor prognosis. (16-19, 21-23, 69-81) In recent years, there has been much

discussion regarding the need to separate these two tumor subtypes, although approximately 70-80% of them are the same. (19, 21, 25, 26, 29, 31-34, 78, 82-91)

In our sample of 94 triple-negative breast carcinomas, using immunohistochemistry to define the basal and penta-negative groups, we observed 63.8% basal carcinomas by CK5/6 and/or HER1 expression. Despite using the same IH markers, our frequency was lower than that obtained by Carey (76.3%), Livasy (77.7%), Tischmovitz (84.0%), Honeth (68.1%), Pintens (88.0%), Rakha (64.2%) and Ricardo (75.5%) but higher than the frequency obtained by Nielsen (40.8%), Conforti (47.3%), Cheang (52.5%) and Blows (58.4%). (6, 32, 34, 35, 53, 55, 61, 70, 92-94)

The average frequency of these 11 studies is 66.5%. The cut-off point for the basal markers used in this study was low (> 0%), very close or identical to the positivity criteria used in the studies performed by the Nielsen, Carey, Tischimovitz, Conforti, Cheang and Blows groups. The average frequencies for basal carcinomas amongst triple-negative carcinomas in those six studies was 59.8%, a number very close to that identified by our group (63.8%). The frequencies obtained with IH were close to those obtained by genetic analysis (DNA microarray), for which it is possible to observe levels such as 71.5% and 76.1%. (6, 26) However, there is a real need for a consensus to define ideal cut-off points for CK5/6 and HER1 expression and for the remaining analytical variables, similar to the recently published consensus on HER2 and hormone receptor tests in breast cancer. (95, 96)

The clinicopathological variables of this study did not differ between the basal and penta-negative groups, except for the tumor histological grade 3, which was more common in the basal carcinoma group ($p = 0.004$). The basal and triple-negative carcinomas presented a higher rate of high tumor histology grade when compared with estrogen positive carcinomas (luminal). (22, 33, 61, 62, 94, 97-99)

However, there are few studies in the literature in which the basal and penta-negative IH subtypes are discriminated, allowing a comparison of tumor grades between both. In the studies by the Sutton and Nofech-Mozes groups, using the CK5/6 and/or HER1 to discriminate basal carcinomas and starting from a group of triple-negative carcinomas, there was no difference in tumor grade. (87, 100) Rakha *et al.* also failed to detect a difference; however, they used a basal group defined by CK5/6, CK14, CK17 and/or HER1 expression. (34) In contrast, Carey *et al.* demonstrated that basal carcinomas (82/100 grade 3 tumors) were more frequently classified as histological grade 3 when compared with penta-negative (19/31 grade 3 tumors) ($p = 0.0017$). (94) In a study by Cheang *et al.* that also compared basal and penta-negative groups, there were 87% and 64.4% grade 3 carcinomas among the basal and penta-negative carcinomas, respectively, which represents a highly significant difference ($p < 0.0001$). (32) Similar data were published in a study by Conforti *et al.* ($p < 0.0001$). (92) Carey, Cheang and Conforti groups used the same diagnostic panel for basal subtypes (CK5/6 and/or HER1). Liu *et al.*, using a different IH panel (CK5/6 and/or CK14), also reported a significant difference ($p = 0.030$) in tumor grade between the basal and non-basal triple-negative groups. (33) Thike *et al.*, using a basal panel that included CK14, EGFR and/or CK34 β E12 expression, also reported that basal carcinomas have a high histological grade (grade 3) when compared with non-basal triple-negative carcinomas ($p = 0.047$). (90) In our study, we also noted a difference for tumor grade ($p = 0.004$), demonstrating that in comparison to penta-negative carcinomas, basal breast carcinomas proved to be neoplasias of high histological grade (grade 3), reinforcing the difference between these two groups.

Several studies demonstrate that both triple-negative and basal carcinomas are more frequent in younger patients. (18, 19, 24, 31, 69, 80, 89, 94) Studies

published by Carey, Conforti and Ricardo groups indicated that there is no difference between basal and penta-negative subtypes, although in a report by Conforti, the lower cut-off point was below 46 years. (53, 92, 94) In a study by Rakha, with a cut-off point of 50 years and a basal subtype defined by CK5/6, CK14, CK17 and/or HER1 expression, there was also no difference between the groups. (34) However, the Cheang and Blows groups observed an age difference between basal and penta-negative carcinomas, showing that basal carcinomas occurred more frequently in patients below the age of 40 years. (32, 35) It should be noted that there were 639 (336 basal and 303 penta-negative) and 1645 (962 basal and 683 penta-negatives) triple-negative carcinoma samples from these two studies, respectively, suggesting that an age difference between these two tumor subtypes may exist but that this result must be verified in a larger sample. When analyzing age via averages from a large sample (653 triple-negative carcinomas) between the basal (CK14, EGFR and/or CK34 β E12) and triple-negative non-basal groups, Thike *et al.* also noted a significant difference ($p = 0.04$). (90) In our study, with a sample of 94 triple-negative carcinomas, we were unable to demonstrate a significant age difference between patients with basal and penta-negative breast carcinomas.

The most common histologic type amongst basal and triple-negative carcinomas is the invasive ductal NOS type. (61, 65, 85, 98, 101) In our study, we did not note any difference between penta-negative and basal groups in histologic type, which is similar to the statistical results from other groups. (32, 35, 53, 92) Thike *et al.*, in a comparative study involving basal carcinomas, also noted no difference for tumor histological type, even with a different basal IH panel. (90)

According to data collected within the available studies, tumor size between basal and penta-negative carcinomas does not appear to be significant. (32, 34, 35,

53, 87, 90) Similar to these observations, we did not observe a difference between these two groups in our study.

The presence of peritumoral lymphovascular invasion in our sample was not different between the penta-negative and basal groups; the same conclusion was reached by other studies. (32, 34, 87, 90)

Regarding axillary lymph node involvement, we observed no difference between basal and penta-negative breast carcinomas in our sample, which is similar to the conclusion reached by other authors. (32, 53, 87, 92, 94, 100) We categorized lymph nodes into positive and negative groups and still noted no difference between the groups (data not shown). However, in publications by the Blows and Rakha groups, a difference was observed with lymph node involvement in which basal carcinomas presented with positive axillary lymph nodes less frequently than penta-negative carcinomas. (34, 35) Conversely, Thike *et al.* observed higher positivity in axillary lymph nodes associated with the basal subtype, which were defined by a triple IH panel (CK14, EGFR and/or CK34 β E12). (90)

There are several studies demonstrating worse overall and disease-free survival for the basal tumor subtype compared to the other types of breast carcinomas. (2, 4, 28, 32, 35, 60, 63-65, 87, 92, 94, 102) A few of these studies using tumor type selection methods based only on immunohistochemistry demonstrated significant differences in survival analysis between basal and penta-negative carcinoma groups. In studies showing this effect, the samples are large, ranged from 1645 to 232 triple-negative carcinomas. (32, 34, 35, 90) However, in a study by Liu with 112 triple-negative carcinomas (52 basal and 60 non-basal TNs) followed up for slightly over six years, there was a difference in survival analysis between the basal group (CK5/6 and/or CK14 positive) and the non-basal triple-negative group. (33) In

a study by Nofech-Mozes with 132 triple-negative carcinomas (116 basal and 16 penta-negative) followed up for 10 years, no significant difference was identified for survival. In our study, in which 94 triple-negative carcinomas were studied and followed up for approximately 6 years, no difference was noted in survival analysis between basal and penta-negative carcinomas. It is likely that the real difference in survival analysis between the two tumor subtypes may not be too great because it was only demonstrated in studies with large samples or with a higher number of cases in the “penta-negative arm”. Among the clinical variables in our study, we did not include the neoadjuvant treatment, which may have influenced our survival analysis.

The expression of cancer stem cell markers (CD44 and CD24) has been previously reported in triple-negative and basal breast carcinomas. (46, 51-57, 103) However, few studies show data comparing the basal and penta-negative groups in this context while prioritizing the IH technique. (53-55)

Honeth *et al.*, in a study involving 240 breast tumors, obtained 44 triple-negative carcinomas. (55) An IH analysis of these 44 tumors (cut-off point > 10% for EGFR and > 20% for CK5/6, CK14 and p63), identified 30 (63%) basal carcinomas. When the IH expressions of CD44 and CD24 (cut-off point > 0%) were analyzed, there was a significant difference between basal TN and non-basal TN groups such that the CD44 expression and the CD44⁺/CD24⁻ phenotype were more frequent in the basal group. In the basal carcinomas, the global CD44 and CD24 expression were 63.3% and 40.0%, respectively. In Honeth’s study, there were no differences in the associations of the CD44⁺/CD24⁻ phenotype with clinicopathological variables or clinical outcome, except for histological subtype, based on a mean follow-up time of 5.3 years. Lymphovascular invasion and the remaining associations of the CD44 and

CD24 markers with the clinical variables were not investigated. An important point in the study by Honeth *et al.*, was the use of genetic validation (DNA microarray); however, these data were only available for 69 cases. It was observed that there was a correlation with histogenetics only when the IH cut-off point of CD44⁺/CD24⁻ was raised to 50% of positive cells.

In the Honeth group study, there are some differences in methodology when compared with our research. The determination of hormone receptor expression was performed on fresh material using a biochemical immune-enzymatic assay technique; the IH diagnosis of basal carcinomas used a cocktail of CK5/6, CK14 and p63, with positivity levels of 20% by double-staining IH technique; there was no CD24^{low} immunophenotype; and a different CD44 clone was employed (156-3C11, 1:800 dilution). However, the IH association between CD44 and CD44⁺/CD24⁻ is clear at levels greater than 0% with a basal subtype.

In a recent study of 466 breast tumors by Ricardo *et al.*, 68 were identified as basal carcinomas (14.6% of the sample) and 22 were identified as non-basal TN carcinomas (4.7% of the sample). (53) To define basal subtype, Ricardo *et al.* used a classic triple-negative IH panel, associated with CK5, CK14, vimentin, P-cadherin and/or HER1 expression with a cut-off point above 10%. CD44 was considered positive above 10% and CD24 was only considered positive above 25%. The CD44 and CD24 clones were the same as in the Honeth study, though 1:100 dilutions were used for both. In basal carcinomas, CD44 expression was 82.3% and CD24 expression was 5.8%. In basal and non-basal TN carcinomas, CD44 expression was associated with the former; in contrast, CD24 was not associated with any of the tumor subgroups or the clinicopathological variables in the study. There was also a difference regarding the CD44⁺/CD24^{-/low} profile, which was greater in the basal

carcinomas compared to the non-basal TNs. In this study, CD44 expression and CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype were associated with no axillary lymph node involvement. However, the authors did not provide data for a specific comparison between basal and non-basal TN tumor groups. Lymphovascular invasion and the remaining CD44/CD24 profiles were not related among the studied variables. Despite the CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype being more common within basal carcinomas, neither the univariate nor the multivariate survival analysis was significant between all the tumor groups during the ten years of follow-up.

In a recent publication, Ahmed *et al.*, observed an immunohistochemical positivity of 77.3% (116/150) for CD44 in triple-negative carcinomas, which is an even higher level than that observed in other studies. (54) However, the cut-off point of the markers was performed using computer software. There were no differences in CD44 and CD24 expression between basal and non-basal triple-negative carcinomas. The best prognosis observed by the authors was in the CD44⁺/CD24^{-/low} phenotype, which was not associated with triple-negative tumors.

Our study was the first to use the MRQ-13 clone (1:200 dilution), with which we observed CD44 expression in 34 of 94 triple-negative carcinomas (36.1%). In the same tumor subtype, Honeth *et al.* noted CD44 expression in 64.7% and Ricardo *et al.* in 67.7%, both with the 156-3C11 clone, though with different dilutions (1:800 and 1:100, respectively). However, the cut-off point for CD44 positivity in the Portuguese study was ten times higher (i.e., 10% versus “greater than 0%”, as used by Honeth *et al.*). The larger number of antibodies and higher positivity levels for the basal markers may have “enriched” the basal carcinoma samples in the Honeth and Ricardo studies, explaining the higher CD44 expression (above 60%). Another variable to consider is the pre-selection of triple-negative carcinomas between the studies; our

series and that of Honeth used databases prior to 2007 with minimum positivities for HER2 that were based on 10% of the cells. The classification adopted by Ricardo *et al.* was based on the recent consensus published in 2007 (i.e., with a cut-off point of 30%). When building TMAs in our study, despite using a single cylinder from each tumor, we did not believe that the tumor heterogeneity could have interfered with the low CD44 expression among the triple-negative tumors because the diameter used was 3.0-mm for each tumor cylinder. In the Honeth and Ricardo studies, three cylinders and “at least two cylinders” were used, respectively, though with only a 0.6-mm diameter. Despite using the same cut-off point (greater than 0%) and the fact that there may be differences in sample selection, we observed approximately half of the CD44 expression (36.1% versus 64.7%) compared to the Honeth group. It is possible that differences in the IH technique, such as the use of a different CD44 clone, may have also influenced our findings, which makes the comparison of results difficult.

Regardless of the variables involved, we observed that the basal carcinomas exhibited a significantly higher difference in CD44 expression, reinforcing the suggestion of other authors that the hyaluronic acid receptor is indeed a characteristic marker of basal breast carcinoma, even when compared with a very similar subtype, such as the penta-negative carcinoma (non-basal triple-negative tumor).

Lymphovascular invasion is a poorly investigated variable amongst the clinicopathological parameters of studies involving cancer stem cells. In our series of triple-negative carcinomas, the CD44-negative tumors exhibited a significantly raised rate of vascular invasion. In past study, Lizak *et al.* suggested that CD44 expression was significantly lower in early carcinomas with positive axillary lymph nodes but not

in a selected sample of triple-negative carcinomas. (104) With a similar sample and results, Lopez *et al.* observed that loss of CD44 expression was associated with a higher number of lung metastases. These findings are in agreement with the observation that a cell first needs to lose its adhesion capacity before invading the extracellular matrix to reach its metastatic potential. (105) In the recent study by Ahmed *et al.*, however, the CD44 association with vascular invasion did not reach statistical significance ($p = 0.089$) among non-select tumors. However, the authors did not evaluate a possible difference between “basal TN” and “non-basal TN” groups. (54) In a combined analysis of CD44/CD24 profiles and the clinical variables in our study, vascular invasion was also different between the four groups, with associated positivity with the CD44⁻CD24⁺ phenotype. In 1998, Aigner *et al.* reported that CD24 is capable of replacing PSGL-1 in its capacity for platelet and endothelial adhesion, suggesting that CD24⁺ carcinomas have a high metastatic capacity. (106) Kristiansen *et al.* reported a positive association in CD24 expression with the presence of regional lymph node metastases. (107) In triple-negative carcinomas, it is possible that the CD44⁻/CD24⁺ phenotype may be associated with factors involved in the loss of the adhesion capacity to the extracellular matrix (CD44⁻), while there may be a rise in the metastatic capacity (CD24⁺). Regarding CD24 expression amongst non-selected breast carcinomas, there are conflicting results. Ahmed *et al.* identified lower CD24 expression in carcinomas of higher histological tumor grades. (54) Ricardo *et al.* observed no associations between CD24 and any of the clinicopathological variables. (53) In our study, there were also no differences in clinical or pathological variables or in the survival analysis.

Between the basal and penta-negative carcinomas, we verified that there was a difference in the combined expression of CD44/CD24 (cancer stem cells). The

CD44⁻CD24^{-/low} phenotype was associated with the penta-negative subtype. A multivariate analysis in the Giatromanolaki *et al.* study indicated that CD44⁻CD24⁻ phenotype (Ab6124 and CM323 clones, respectively) was an independent variable of worse prognosis in a series of non-selected breast carcinomas. In our study, we identified CD44⁻CD24^{-/low} phenotype in 45.7% (43/94) of the triple-negative carcinomas, which are known for their poor prognosis. Although CD44⁺CD24^{-/low} phenotype showed a tendency of significance for basal carcinomas in our study, it is the most frequently observed stem cell phenotype both in basal and in triple-negative carcinomas in the few published studies that have used IH assay. (51, 53, 56) We believe that the difference between our results and those occurred due to the higher number of CD44 negative cases in our study, possibly associated with the use of a different CD44 clone. (53, 55) However, in a recent study by Ahmed *et al.* that also used the 156-3C11 clone, the authors observed that CD44⁺CD24^{-/low} phenotype was associated with carcinomas with better prognoses within a non-selected case series and that CD44⁻CD24⁺ phenotype was the most frequent among the basal carcinomas. (54)

Regarding the survival analysis and the expression of breast cancer stem cells, in the few available studies using IH as the main research method, non-selected breast carcinomas have exhibited discrepancies. (51-54, 56, 103) CD44⁺CD24^{-/low} phenotype was associated with a worse prognosis for triple-negative carcinomas in the Idowu *et al.* study. (56) In the Giatromanolaki study, CD44⁻/CD24⁻ phenotype was an independent variable in the multivariate analysis and was associated with a worse prognosis; this finding was also true for triple-negative carcinomas. Ahmed *et al.* observed that the CD44⁻CD24⁺ phenotype was the only one to be associated with a poor prognosis. In the Ricardo, Bernardi and Kim

studies, the CD44/CD24 phenotypes were not shown to be different when compared within the all breast cancer subtypes. This lack of uniformity in the prognostic assessment of CD44/CD24 expression profiles among the aforementioned studies suggests that a mixture of several tumor subtypes (luminal, HER2, basal, penta-negatives, etc.) defined by heterogeneous diagnostic criteria and in different samples may be confounding the results. Considering this, as yet, there are no experimental studies demonstrating a specific cancer stem cell immunophenotype for luminal or HER2 carcinoma subtypes. The CD44⁺CD24^{-/low} phenotype is more common in a subtype (basal or triple-negative) of lower prevalence among breast cancers.

In most of these studies, the survival analyses involved breast carcinoma series with no subdivision of triple-negative carcinomas (into basal TN and non-basal TN) for the observation and comparison of the data with our sample. In our study, we observed no differences in disease-free and overall survival between basal and penta-negative carcinomas with regards to the CD44/CD24 phenotype in a mean follow-up time of 5.9 years.

CONCLUSION

Basal and penta-negative breast carcinomas are closely related tumors. Despite this, our results revealed that there are differences between these tumor types, as defined by a simple IH panel. Even with our small series, the highest histological tumor grade, which is a characteristic feature of carcinomas with poor prognoses, was associated with the basal subtype. Although we have not been able to observe a difference in survival between basal and penta-negative carcinomas, possibly due to the small sample size, there are robust studies that demonstrate

worse overall and disease-free survival in basal carcinomas, justifying the prognostic use of a basal panel in routine IH triple-negative breast cancer diagnosis.

Peritumoral lymphovascular invasion was an important clinicopathological factor in our study because it was associated with CD44 negativity and CD44⁻CD24⁺ immunophenotype, which merits investigation in other studies using larger samples. It is worth noting that although not statistically significant, the basal carcinomas in our sample also showed less lymphovascular invasion than penta-negative carcinomas. In our case series, we identified higher CD44 expression in basal carcinomas, perhaps the most important marker in the study of breast cancer stem cells. The CD44⁻CD24^{-/low} phenotype was associated with the penta-negative subtype. Despite being unable to demonstrate a difference between basal and penta-negative carcinomas in CD44⁺CD24^{-/low} phenotype, it is possible that it may indeed exist and thus warrants larger studies for comparison.

Although there are still significant differences between the histogenetic analysis and the IH results in several fields of breast pathology, recent studies with large samples have demonstrated that CK5/6 and HER1, at expression levels close to 1%, may be sufficient for a simplified diagnosis at the population level for basal breast carcinoma in triple-negative tumors. Additionally, negativity to these two antibodies reveals another distinct and less frequent breast carcinoma subtype, designated as penta-negative in this study. Although it currently has no direct impact on clinical or surgical treatment decisions, the importance of the distinction between basal carcinomas, which have a worse prognosis, and penta-negative carcinomas, which have a better prognosis, demonstrates a clear need for compulsory IH verification of CK5/6 and HER1 expression (basal phenotype) in triple-negative carcinomas.

In the context of breast cancer stem cells, there is a clear need for a consensus on the ideal cut-off points to assess the IH expression of the CD44/CD24 phenotype. The presence and the importance of CSTs in breast cancer, by IH assay, still requires endorsement by studies with larger numbers of samples, tight control of the pre-, intra- and postanalytic variables of the tests in question and histogenetic validation of all cases, which translates into considerable scientific effort and high resource consumption.

REFERENCES

1. Perou CM, Jeffrey SS, van de Rijn M, Rees CA, Eisen MB, Ross DT, et al. Distinctive gene expression patterns in human mammary epithelial cells and breast cancers. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999 Aug 3;96(16):9212-7. PubMed PMID: 10430922. Epub 1999/08/04. eng.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52. PubMed PMID: 10963602. Epub 2000/08/30. eng.
3. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74. PubMed PMID: 11553815. Epub 2001/09/13. eng.
4. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23. PubMed PMID: 12829800. Epub 2003/06/28. eng.
5. Viale G. Histopathology of primary breast cancer 2003. *Breast*. 2003 Dec;12(6):391-6. PubMed PMID: 14659111. Epub 2003/12/09. eng.
6. Nielsen TO, Hsu FD, Jensen K, Cheang M, Karaca G, Hu Z, et al. Immunohistochemical and clinical characterization of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Clin Cancer Res*. 2004 Aug 15;10(16):5367-74. PubMed PMID: 15328174. Epub 2004/08/26. eng.
7. Weigelt B, Reis-Filho JS. Histological and molecular types of breast cancer: is there a unifying taxonomy? *Nat Rev Clin Oncol*. 2009 Dec;6(12):718-30. PubMed PMID: 19942925. Epub 2009/11/28. eng.
8. Weigelt B, Baehner FL, Reis-Filho JS. The contribution of gene expression profiling to breast cancer classification, prognostication and prediction: a retrospective of the last decade. *J Pathol*. 2010 Jan;220(2):263-80. PubMed PMID: 19927298. Epub 2009/11/21. eng.
9. Weigelt B, Geyer FC, Reis-Filho JS. Histological types of breast cancer: how special are they? *Mol Oncol*. 2010 Jun;4(3):192-208. PubMed PMID: 20452298. Epub 2010/05/11. eng.
10. Reis-Filho JS, Pusztai L. Gene expression profiling in breast cancer: classification, prognostication, and prediction. *Lancet*. 2011 Nov 19;378(9805):1812-23. PubMed PMID: 22098854. Epub 2011/11/22. eng.

11. McGuire WL. Breast cancer prognostic factors: evaluation guidelines. *J Natl Cancer Inst.* 1991 Feb 6;83(3):154-5. PubMed PMID: 1988696. Epub 1991/02/06. eng.
12. Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1991 Nov;19(5):403-10. PubMed PMID: 1757079.
13. Ellis IO, Galea M, Broughton N, Locker A, Blamey RW, Elston CW. Pathological prognostic factors in breast cancer. II. Histological type. Relationship with survival in a large study with long-term follow-up. *Histopathology.* 1992 Jun;20(6):479-89. PubMed PMID: 1607149. Epub 1992/06/01. eng.
14. Reynolds T. Breast cancer prognostic factors--the search goes on. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Apr 6;86(7):480-3. PubMed PMID: 8133528. Epub 1994/04/06. eng.
15. Elston CW, Ellis IO, Pinder SE. Pathological prognostic factors in breast cancer. *Crit Rev Oncol Hematol.* 1999 Aug;31(3):209-23. PubMed PMID: 10532196. Epub 1999/10/26. eng.
16. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer.* 2007 Jan 1;109(1):25-32. PubMed PMID: 17146782.
17. Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options. *Lancet Oncol.* 2007 Mar;8(3):235-44. PubMed PMID: 17329194. Epub 2007/03/03. eng.
18. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res.* 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34. PubMed PMID: 17671126. Epub 2007/08/03. eng.
19. Foulkes WD, Smith IE, Reis-Filho JS. Triple-negative breast cancer. *N Engl J Med.* 2010 Nov 11;363(20):1938-48. PubMed PMID: 21067385. Epub 2010/11/12. eng.
20. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res.* 2007 Apr 15;13(8):2329-34. PubMed PMID: 17438091. Epub 2007/04/18. eng.
21. Irvin WJ, Jr., Carey LA. What is triple-negative breast cancer? *Eur J Cancer.* 2008 Dec;44(18):2799-805. PubMed PMID: 19008097. Epub 2008/11/15. eng.
22. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology.* 2008 Jan;52(1):108-18. PubMed PMID: 18171422. Epub 2008/01/04. eng.

23. Dawson SJ, Provenzano E, Caldas C. Triple negative breast cancers: clinical and prognostic implications. *Eur J Cancer*. 2009 Sep;45 Suppl 1:27-40. PubMed PMID: 19775602. Epub 2009/09/25. eng.
24. Bauer KR, Brown M, Cress RD, Parise CA, Caggiano V. Descriptive analysis of estrogen receptor (ER)-negative, progesterone receptor (PR)-negative, and HER2-negative invasive breast cancer, the so-called triple-negative phenotype: a population-based study from the California cancer Registry. *Cancer*. 2007 May 1;109(9):1721-8. PubMed PMID: 17387718. Epub 2007/03/28. eng.
25. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):404; author reply 5. PubMed PMID: 18279542.
26. Bertucci F, Finetti P, Cervera N, Esterni B, Hermitte F, Viens P, et al. How basal are triple-negative breast cancers? *Int J Cancer*. 2008 Jul 1;123(1):236-40. PubMed PMID: 18398844. Epub 2008/04/10. eng.
27. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7. PubMed PMID: 19204204. Epub 2009/02/11. eng.
28. Rakha EA, El-Sayed ME, Reis-Filho J, Ellis IO. Patho-biological aspects of basal-like breast cancer. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Feb;113(3):411-22. PubMed PMID: 18327637. Epub 2008/03/11. eng.
29. Rakha EA, Ellis IO. Triple-negative/basal-like breast cancer: review. *Pathology*. 2009 Jan;41(1):40-7. PubMed PMID: 19089739. Epub 2008/12/18. eng.
30. de Ronde J, Wessels L, Wesseling J. Molecular subtyping of breast cancer: ready to use? *Lancet Oncol*. 2010 Apr;11(4):306-7. PubMed PMID: 20359657. Epub 2010/04/03. eng.
31. Badve S, Dabbs DJ, Schnitt SJ, Baehner FL, Decker T, Eusebi V, et al. Basal-like and triple-negative breast cancers: a critical review with an emphasis on the implications for pathologists and oncologists. *Mod Pathol*. 2011 Feb;24(2):157-67. PubMed PMID: 21076464. Epub 2010/11/16. eng.
32. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1368-76. PubMed PMID: 18316557. Epub 2008/03/05. eng.
33. Liu ZB, Wu J, Ping B, Feng LQ, Di GH, Lu JS, et al. Basal cytokeratin expression in relation to immunohistochemical and clinical characterization in breast cancer patients with triple negative phenotype. *Tumori*. 2009 Jan-Feb;95(1):53-62. PubMed PMID: 19366057. Epub 2009/04/16. eng.
34. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal

subtypes. *Clin Cancer Res.* 2009 Apr 1;15(7):2302-10. PubMed PMID: 19318481. Epub 2009/03/26. eng.

35. Blows FM, Driver KE, Schmidt MK, Broeks A, van Leeuwen FE, Wesseling J, et al. 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 May;7(5):e1000279. PubMed PMID: 20520800. Epub 2010/06/04. eng.

36. Sell S. Stem cell origin of cancer and differentiation therapy. *Crit Rev Oncol Hematol.* 2004 Jul;51(1):1-28. PubMed PMID: 15207251. Epub 2004/06/23. eng.

37. Wicha MS, Liu S, Dontu G. Cancer stem cells: an old idea--a paradigm shift. *Cancer Res.* 2006 Feb 15;66(4):1883-90; discussion 95-6. PubMed PMID: 16488983. Epub 2006/02/21. eng.

38. Kai K, Arima Y, Kamiya T, Saya H. Breast cancer stem cells. *Breast Cancer.* 2009 Apr;17(2):80-5. PubMed PMID: 19806428. Epub 2009/10/07. eng.

39. Jordan CT, Guzman ML, Noble M. Cancer stem cells. *N Engl J Med.* 2006 Sep 21;355(12):1253-61. PubMed PMID: 16990388. Epub 2006/09/23. eng.

40. Ponti D, Zaffaroni N, Capelli C, Daidone MG. Breast cancer stem cells: an overview. *Eur J Cancer.* 2006 Jun;42(9):1219-24. PubMed PMID: 16624548. Epub 2006/04/21. eng.

41. Campbell LL, Polyak K. Breast tumor heterogeneity: cancer stem cells or clonal evolution? *Cell Cycle.* 2007 Oct 1;6(19):2332-8. PubMed PMID: 17786053. Epub 2007/09/06. eng.

42. Morrison BJ, Schmidt CW, Lakhani SR, Reynolds BA, Lopez JA. Breast cancer stem cells: implications for therapy of breast cancer. *Breast Cancer Res.* 2008;10(4):210. PubMed PMID: 18671830. Epub 2008/08/02. eng.

43. Cariati M, Purushotham AD. Stem cells and breast cancer. *Histopathology.* 2008 Jan;52(1):99-107. PubMed PMID: 18171421. Epub 2008/01/04. eng.

44. Dontu G, El-Ashry D, Wicha MS. Breast cancer, stem/progenitor cells and the estrogen receptor. *Trends Endocrinol Metab.* 2004 Jul;15(5):193-7. PubMed PMID: 15223047. Epub 2004/06/30. eng.

45. Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med.* 2007 Jan 18;356(3):217-26. PubMed PMID: 17229949. Epub 2007/01/19. eng.

46. Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF. Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2003 Apr 1;100(7):3983-8. PubMed PMID: 12629218. Epub 2003/03/12. eng.

47. Sheridan C, Kishimoto H, Fuchs RK, Mehrotra S, Bhat-Nakshatri P, Turner CH, et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res.* 2006;8(5):R59. PubMed PMID: 17062128. Epub 2006/10/26. eng.
48. Abraham BK, Fritz P, McClellan M, Hauptvogel P, Athellogou M, Brauch H. Prevalence of CD44+/CD24-/low cells in breast cancer may not be associated with clinical outcome but may favor distant metastasis. *Clin Cancer Res.* 2005 Feb 1;11(3):1154-9. PubMed PMID: 15709183. Epub 2005/02/15. eng.
49. Mylona E, Giannopoulou I, Fasomytakis E, Nomikos A, Magkou C, Bakarakos P, et al. The clinicopathologic and prognostic significance of CD44+/CD24(-/low) and CD44-/CD24+ tumor cells in invasive breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2008 Jul;39(7):1096-102. PubMed PMID: 18495204. Epub 2008/05/23. eng.
50. Li W, Liu F, Lei T, Xu X, Liu B, Cui L, et al. The clinicopathological significance of CD44+/CD24-/low and CD24+ tumor cells in invasive micropapillary carcinoma of the breast. *Pathol Res Pract.* 2010 Dec 15;206(12):828-34. PubMed PMID: 20977976. Epub 2010/10/28. eng.
51. Giatromanolaki A, Sivridis E, Fiska A, Koukourakis MI. The CD44+/CD24-phenotype relates to 'triple-negative' state and unfavorable prognosis in breast cancer patients. *Med Oncol.* 2011 Sep;28(3):745-52. PubMed PMID: 20405247. Epub 2010/04/21. eng.
52. Kim HJ, Kim MJ, Ahn SH, Son BH, Kim SB, Ahn JH, et al. Different prognostic significance of CD24 and CD44 expression in breast cancer according to hormone receptor status. *Breast.* 2011 Feb;20(1):78-85. PubMed PMID: 20810282. Epub 2010/09/03. eng.
53. Ricardo S, Vieira AF, Gerhard R, Leitao D, Pinto R, Cameselle-Teijeiro JF, et al. Breast cancer stem cell markers CD44, CD24 and ALDH1: expression distribution within intrinsic molecular subtype. *J Clin Pathol.* 2011 Nov;64(11):937-46. PubMed PMID: 21680574. Epub 2011/06/18. eng.
54. Ahmed MA, Aleskandarany MA, Rakha EA, Moustafa RZ, Benhasouna A, Nolan C, et al. A CD44(-)/CD24 (+) phenotype is a poor prognostic marker in early invasive breast cancer. *Breast Cancer Res Treat.* 2012 Jun;133(3):979-95. PubMed PMID: 22119938. Epub 2011/11/29. eng.
55. Honeth G, Bendahl PO, Ringner M, Saal LH, Gruvberger-Saal SK, Lovgren K, et al. The CD44+/CD24- phenotype is enriched in basal-like breast tumors. *Breast Cancer Res.* 2008;10(3):R53. PubMed PMID: 18559090.
56. Idowu MO, Kmiecik M, Dumur C, Burton RS, Grimes MM, Powers CN, et al. CD44(+)/CD24(-/low) cancer stem/progenitor cells are more abundant in triple-negative invasive breast carcinoma phenotype and are associated with poor outcome. *Hum Pathol.* 2012 Mar;43(3):364-73. PubMed PMID: 21835433. Epub 2011/08/13. eng.

57. Park SY, Lee HE, Li H, Shipitsin M, Gelman R, Polyak K. Heterogeneity for stem cell-related markers according to tumor subtype and histologic stage in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2010 Feb 1;16(3):876-87. PubMed PMID: 20103682. Epub 2010/01/28. eng.
58. Abramson JH. WINPEPI updated: computer programs for epidemiologists, and their teaching potential. *Epidemiol Perspect Innov*. 2011;8(1):1. PubMed PMID: 21288353. Epub 2011/02/04. eng.
59. Reis-Filho JS, Milanezi F, Steele D, Savage K, Simpson PT, Nesland JM, et al. Metaplastic breast carcinomas are basal-like tumours. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):10-21. PubMed PMID: 16842242. Epub 2006/07/18. eng.
60. Rakha EA, El-Rehim DA, Paish C, Green AR, Lee AH, Robertson JF, et al. Basal phenotype identifies a poor prognostic subgroup of breast cancer of clinical importance. *Eur J Cancer*. 2006 Dec;42(18):3149-56. PubMed PMID: 17055256. Epub 2006/10/24. eng.
61. Livasy CA, Karaca G, Nanda R, Tretiakova MS, Olopade OI, Moore DT, et al. Phenotypic evaluation of the basal-like subtype of invasive breast carcinoma. *Mod Pathol*. 2006 Feb;19(2):264-71. PubMed PMID: 16341146. Epub 2005/12/13. eng.
62. Fulford LG, Reis-Filho JS, Ryder K, Jones C, Gillett CE, Hanby A, et al. Basal-like grade III invasive ductal carcinoma of the breast: patterns of metastasis and long-term survival. *Breast Cancer Res*. 2007;9(1):R4. PubMed PMID: 17217540. Epub 2007/01/16. eng.
63. Evans AJ, Rakha EA, Pinder SE, Green AR, Paish C, Ellis IO. Basal phenotype: a powerful prognostic factor in small screen-detected invasive breast cancer with long-term follow-up. *J Med Screen*. 2007;14(4):210-4. PubMed PMID: 18078567.
64. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Impact of basal-like breast carcinoma determination for a more specific therapy. *Pathobiology*. 2008;75(2):95-103. PubMed PMID: 18544964. Epub 2008/06/12. eng.
65. Rakha EA, Reis-Filho JS, Ellis IO. Basal-like breast cancer: a critical review. *J Clin Oncol*. 2008 May 20;26(15):2568-81. PubMed PMID: 18487574. Epub 2008/05/20. eng.
66. Luck AA, Evans AJ, Green AR, Rakha EA, Paish C, Ellis IO. The influence of basal phenotype on the metastatic pattern of breast cancer. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2008 Feb;20(1):40-5. PubMed PMID: 17981444. Epub 2007/11/06. eng.
67. Weigelt B, Kreike B, Reis-Filho JS. Metaplastic breast carcinomas are basal-like breast cancers: a genomic profiling analysis. *Breast Cancer Res Treat*. 2009 Sep;117(2):273-80. PubMed PMID: 18815879. Epub 2008/09/26. eng.

68. Pazaiti A, Fentiman IS. Basal phenotype breast cancer: implications for treatment and prognosis. *Womens Health (Lond Engl)*. 2011 Mar;7(2):181-202. PubMed PMID: 21410345. Epub 2011/03/18. eng.
69. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5652-7. PubMed PMID: 17116942. Epub 2006/11/23. eng.
70. Tischkowitz M, Brunet JS, Begin LR, Huntsman DG, Cheang MC, Akslen LA, et al. Use of immunohistochemical markers can refine prognosis in triple negative breast cancer. *BMC Cancer*. 2007;7:134. PubMed PMID: 17650314. Epub 2007/07/26. eng.
71. Mersin H, Yildirim E, Berberoglu U, Gulben K. The prognostic importance of triple negative breast carcinoma. *Breast*. 2008 Aug;17(4):341-6. PubMed PMID: 18450442. Epub 2008/05/03. eng.
72. Liedtke C, Mazouni C, Hess KR, Andre F, Tordai A, Mejia JA, et al. Response to neoadjuvant therapy and long-term survival in patients with triple-negative breast cancer. *J Clin Oncol*. 2008 Mar 10;26(8):1275-81. PubMed PMID: 18250347. Epub 2008/02/06. eng.
73. Kang SP, Martel M, Harris LN. Triple negative breast cancer: current understanding of biology and treatment options. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2008 Feb;20(1):40-6. PubMed PMID: 18197004. Epub 2008/01/17. eng.
74. Viale G, Bottiglieri L. Pathological definition of triple negative breast cancer. *Eur J Cancer*. 2009 Sep;45 Suppl 1:5-10. PubMed PMID: 19775600. Epub 2009/09/25. eng.
75. Sasaki Y, Tsuda H. Clinicopathological characteristics of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer*. 2009;16(4):254-9. PubMed PMID: 19657711. Epub 2009/08/07. eng.
76. Billar JA, Dueck AC, Stucky CC, Gray RJ, Wasif N, Northfelt DW, et al. Triple-negative breast cancers: unique clinical presentations and outcomes. *Ann Surg Oncol*. 2010 Oct;17 Suppl 3:384-90. PubMed PMID: 20853062. Epub 2010/10/01. eng.
77. Bosch A, Eroles P, Zaragoza R, Vina JR, Lluch A. Triple-negative breast cancer: molecular features, pathogenesis, treatment and current lines of research. *Cancer Treat Rev*. 2010 May;36(3):206-15. PubMed PMID: 20060649. Epub 2010/01/12. eng.
78. Constantinidou A, Jones RL, Reis-Filho JS. Beyond triple-negative breast cancer: the need to define new subtypes. *Expert Rev Anticancer Ther*. 2010 Aug;10(8):1197-213. PubMed PMID: 20735307. Epub 2010/08/26. eng.

79. Podo F, Buydens LM, Degani H, Hilhorst R, Klipp E, Gribbestad IS, et al. Triple-negative breast cancer: present challenges and new perspectives. *Mol Oncol.* 2010 Jun;4(3):209-29. PubMed PMID: 20537966. Epub 2010/06/12. eng.
80. Carvalho FM, Bacchi LM, Santos PP, Bacchi CE. Triple-negative breast carcinomas are a heterogeneous entity that differs between young and old patients. *Clinics (Sao Paulo).* 2010;65(10):1033-6. PubMed PMID: 21120307. Epub 2010/12/02. eng.
81. Patani N, Barbashina V, Lambros MB, Gauthier A, Mansour M, Mackay A, et al. Direct evidence for concurrent morphological and genetic heterogeneity in an invasive ductal carcinoma of triple-negative phenotype. *J Clin Pathol.* 2011 Sep;64(9):822-8. PubMed PMID: 21676924. Epub 2011/06/17. eng.
82. Kreike B, van Kouwenhove M, Horlings H, Weigelt B, Peterse H, Bartelink H, et al. Gene expression profiling and histopathological characterization of triple-negative/basal-like breast carcinomas. *Breast Cancer Res.* 2007;9(5):R65. PubMed PMID: 17910759. Epub 2007/10/04. eng.
83. Diaz LK, Cryns VL, Symmans WF, Sneige N. Triple negative breast carcinoma and the basal phenotype: from expression profiling to clinical practice. *Adv Anat Pathol.* 2007 Nov;14(6):419-30. PubMed PMID: 18049131. Epub 2007/12/01. eng.
84. Tang P, Wang J, Bourne P. Molecular classifications of breast carcinoma with similar terminology and different definitions: are they the same? *Hum Pathol.* 2008 Apr;39(4):506-13. PubMed PMID: 18289638. Epub 2008/02/22. eng.
85. Weigelt B, Horlings HM, Kreike B, Hayes MM, Hauptmann M, Wessels LF, et al. Refinement of breast cancer classification by molecular characterization of histological special types. *J Pathol.* 2008 Oct;216(2):141-50. PubMed PMID: 18720457. Epub 2008/08/23. eng.
86. Lerma E, Barnadas A, Prat J. Triple negative breast carcinomas: similarities and differences with basal like carcinomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2009 Dec;17(6):483-94. PubMed PMID: 19620842. Epub 2009/07/22. eng.
87. Nofech-Mozes S, Trudeau M, Kahn HK, Dent R, Rawlinson E, Sun P, et al. Patterns of recurrence in the basal and non-basal subtypes of triple-negative breast cancers. *Breast Cancer Res Treat.* 2009 Nov;118(1):131-7. PubMed PMID: 19189211. Epub 2009/02/04. eng.
88. Kuroda N, Ohara M, Inoue K, Mizuno K, Fujishima N, Hamaguchi N, 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 Jun;42(2):128-31. PubMed PMID: 19536621. Epub 2009/06/19. eng.
89. Carey L, Winer E, Viale G, Cameron D, Gianni L. Triple-negative breast cancer: disease entity or title of convenience? *Nat Rev Clin Oncol.* 2010 Dec;7(12):683-92. PubMed PMID: 20877296. Epub 2010/09/30. eng.

90. Thike AA, Iqbal J, Cheok PY, Chong AP, Tse GM, Tan B, et al. Triple negative breast cancer: outcome correlation with immunohistochemical detection of basal markers. *Am J Surg Pathol*. 2010 Jul;34(7):956-64. PubMed PMID: 20495445. Epub 2010/05/25. eng.
91. Thike AA, Cheok PY, Jara-Lazaro AR, Tan B, Tan P, Tan PH. Triple-negative breast cancer: clinicopathological characteristics and relationship with basal-like breast cancer. *Mod Pathol*. 2010 Jan;23(1):123-33. PubMed PMID: 19855377. Epub 2009/10/27. eng.
92. Conforti R, Boulet T, Tomasic G, Taranchon E, Arriagada R, Spielmann M, et al. Breast cancer molecular subclassification and estrogen receptor expression to predict efficacy of adjuvant anthracyclines-based chemotherapy: a biomarker study from two randomized trials. *Ann Oncol*. 2007 Sep;18(9):1477-83. PubMed PMID: 17515403. Epub 2007/05/23. eng.
93. Pintens S, Neven P, Drijkoningen M, Van Belle V, Moerman P, Christiaens MR, et al. Triple negative breast cancer: a study from the point of view of basal CK5/6 and HER-1. *J Clin Pathol*. 2009 Jul;62(7):624-8. PubMed PMID: 19561231. Epub 2009/06/30. eng.
94. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502. PubMed PMID: 16757721. Epub 2006/06/08. eng.
95. Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2007;131(1):18-43. PubMed PMID: 19548375. Epub 2007/01/01. eng.
96. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med*. 2010 Jun;134(6):907-22. PubMed PMID: 20524868. Epub 2010/06/09. eng.
97. van de Rijn M, Perou CM, Tibshirani R, Haas P, Kallioniemi O, Kononen J, et al. Expression of cytokeratins 17 and 5 identifies a group of breast carcinomas with poor clinical outcome. *Am J Pathol*. 2002 Dec;161(6):1991-6. PubMed PMID: 12466114. Epub 2002/12/06. eng.
98. Fulford LG, Easton DF, Reis-Filho JS, Sofronis A, Gillett CE, Lakhani SR, et al. Specific morphological features predictive for the basal phenotype in grade 3 invasive ductal carcinoma of breast. *Histopathology*. 2006 Jul;49(1):22-34. PubMed PMID: 16842243. Epub 2006/07/18. eng.
99. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Paish EC, Lee AH, Ellis IO. Breast carcinoma with basal differentiation: a proposal for pathology definition based on

basal cytokeratin expression. *Histopathology*. 2007 Mar;50(4):434-8. PubMed PMID: 17448018.

100. Sutton LM, Han JS, Molberg KH, Sarode VR, Cao D, Rakheja D, et al. Intratumoral expression level of epidermal growth factor receptor and cytokeratin 5/6 is significantly associated with nodal and distant metastases in patients with basal-like triple-negative breast carcinoma. *Am J Clin Pathol*. 2010 Nov;134(5):782-7. PubMed PMID: 20959661. Epub 2010/10/21. eng.

101. Reis-Filho JS, Lakhani SR. Breast cancer special types: why bother? *J Pathol*. 2008 Dec;216(4):394-8. PubMed PMID: 18798222. Epub 2008/09/18. eng.

102. Fan C, Oh DS, Wessels L, Weigelt B, Nuyten DS, Nobel AB, et al. Concordance among gene-expression-based predictors for breast cancer. *N Engl J Med*. 2006 Aug 10;355(6):560-9. PubMed PMID: 16899776. Epub 2006/08/11. eng.

103. Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncol Rep*. 2012 Jan;27(1):28-38. PubMed PMID: 21956537. Epub 2011/10/01. eng.

104. Lyzak JS, Yaremko ML, Recant W, Baunoch DA, Joseph L. Role of CD44 in nonpalpable T1a and T1b breast cancer. *Hum Pathol*. 1997 Jul;28(7):772-8. PubMed PMID: 9224743. Epub 1997/07/01. eng.

105. Lopez JI, Camenisch TD, Stevens MV, Sands BJ, McDonald J, Schroeder JA. CD44 attenuates metastatic invasion during breast cancer progression. *Cancer Res*. 2005 Aug 1;65(15):6755-63. PubMed PMID: 16061657. Epub 2005/08/03. eng.

106. Aigner S, Ramos CL, Hafezi-Moghadam A, Lawrence MB, Friederichs J, Altevogt P, et al. CD24 mediates rolling of breast carcinoma cells on P-selectin. *FASEB J*. 1998 Sep;12(12):1241-51. PubMed PMID: 9737727. Epub 1998/09/16. eng.

107. Kristiansen G, Machado E, Bretz N, Rupp C, Winzer KJ, Konig AK, et al. Molecular and clinical dissection of CD24 antibody specificity by a comprehensive comparative analysis. *Lab Invest*. 2010 Jul;90(7):1102-16. PubMed PMID: 20351695. Epub 2010/03/31. eng.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer é uma doença heterogênea, assim como cada um dos pacientes que desenvolvem esta doença. E neste contexto, a patologia mamária não é exceção.

O exame anatomopatológico ainda representa o instrumento de maior utilidade, embora imperfeito, para a predição dos desfechos clínicos do câncer e sua resposta a intervenções clínicas. A técnica imuno-histoquímica, a não muito tempo descoberta, causou uma verdadeira revolução no diagnóstico do câncer e hoje é ferramenta fundamental na patologia oncológica. Atualmente, os aspectos histopatológicos e imuno-histoquímicos são bem acessíveis e espelham muito bem a expressão de diversos genes. Contudo, não há como comparar a limitação da imuno-histoquímica frente à análise histogenética.

O maior desafio da patologia oncológica é desenvolver critérios diagnósticos e prognósticos consensuais, acessíveis e que permitam a individualização dos tratamentos. A aplicação da imuno-histoquímica será fundamental nesta questão, cuja validação obrigatoriamente depende de estudos em grandes amostras, com delineamentos rígidos e autenticados por histogenética. Neste ponto, muito provavelmente estaremos trabalhando no limite do próprio código genético das células-tronco teciduais e tumorais.

8. ANEXOS

8.1 EDITORIAL CERTIFICATE


AMERICAN JOURNAL EXPERTS

EDITORIAL CERTIFICATE

This document certifies that the manuscript listed below was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts.

Manuscript title:
EXPRESSION OF CANCER STEM CELL MARKERS IN BASAL AND PENTA-NEGATIVE BREAST CARCINOMAS – A STUDY OF A SERIES OF TRIPLE-NEGATIVE CARCINOMAS

Authors:
DIEGO DE MENDONÇA UCHÔA, Maria Isabel Albano Edelweiss

Date Issued:
October 26, 2012

Certificate Verification Key:
44A4-2DA6-58BD-075A-3790



This certificate may be verified at www.journalexperts.com/certificate. This document certifies that the manuscript listed above was edited for proper English language, grammar, punctuation, spelling, and overall style by one or more of the highly qualified native English speaking editors at American Journal Experts. Neither the research content nor the authors' intentions were altered in any way during the editing process. Documents receiving this certification should be English-ready for publication; however, the author has the ability to accept or reject our suggestions and changes. To verify the final AJE edited version, please visit our verification page. If you have any questions or concerns about this edited document, please contact American Journal Experts at support@journalexperts.com.

American Journal Experts provides a range of editing, translation and manuscript services for researchers and publishers around the world. Our top-quality PhD editors are all native English speakers from America's top universities. Our editors come from nearly every research field and possess the highest qualifications to edit research manuscripts written by non-native English speakers. For more information about our company, services and partner discounts, please visit www.journalexperts.com.

8.2 FICHA DE COLETA DE DADOS

NOME COMPLETO:.....

REGISTRO:.....TELEFONE.....

DATA DE NASCIMENTO:..... SEXO.....

AP DA BIÓPSIA Nº E DATA:.....

AP DO SETOR Nº E DATA:.....

AP DA MASTECTOMIA Nº E DATA:.....

TAMANHO DO TUMOR (CM) E GRAU:.....

INVASÃO VASCULAR: ()SIM ()NÃO ()NÃO REFERIDA

AP DOS LINFONODOS Nº TOTAL E DATA:.....

Nº LINFONODOS COMPROMETIDOS:.....

AP DO LINFONODO SENTINELA Nº E DATA:.....

AP DA AMPLIAÇÃO DE MARGEM Nº E DATA:.....

AP Nº E DATA:.....

AP Nº E DATA:.....

IH – PAINEL Nº E DATA DO EXAME:.....

Nº AP DE REF.:.....

RE:..... RP:..... HER2:.....

IH – DIAGNÓSTICA

Nº E DATA DO EXAME:.....

Nº AP DE REF.:.....

RESULTADO:.....

RECIDIVA ()SIM ()NÃO DATA:.....

MORTE ()SIM ()NÃO DATA:.....