

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Investigação dos níveis séricos de EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL em  
pacientes com câncer de mama inicial e avançado**

Brunna dos Anjos Pultz

UBERLÂNDIA, MG  
2015

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Investigação dos níveis séricos de EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL em pacientes com câncer de mama inicial e avançado**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como parte de obtenção do título de Mestre.

**Brunna dos Anjos Pultz**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva  
Co-orientadora: Profa. Dra. Yara Cristina de Paiva Maia

UBERLÂNDIA, MG  
2015

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

P983i      Pultz, Brunna dos Anjos, 1991-  
2015      Investigação dos níveis séricos de EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL  
em pacientes com câncer de mama inicial e avançado / Brunna dos Anjos  
Pultz. - 2015.  
91 f. : il.

Orientador: Marcelo José Barbosa Silva.  
Coorientador(a): Yara Cristina de Paiva Maia.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Imunologia - Teses. 2. Mamas - Câncer - Teses. 3. Saúde pública -  
Teses. 4. Marcadores biológicos - Teses. I. Silva, Marcelo José Barbosa.  
II. Maia, Yara Cristina de Paiva. III. Universidade Federal de  
Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia  
Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

---



Brunna dos Anjos Pultz

"Investigação dos níveis séricos de EGFR, HER-2, TSP-1 e RANKL em pacientes com câncer de mama inicial e avançado"

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 11 de fevereiro de 2015.

Prof. Dr. Gilson Costa Macedo – UFJF

Prof. Dra. Paula Philiberto - Lajolo - HC/UFG

Prof. Dr. Marcelo José Barbosa Silva – ICBIM/UFU (orientador)

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor de meu destino, meu guia, socorro presente na hora da angústia. Ao meu pai Marcos e à minha mãe Gláucia.

*“É muito melhor lançar-se em busca de conquistas grandiosas, mesmo expondo-se ao fracasso, do que alinhar-se com os pobres de espírito, que nem gozam muito nem sofrem muito, porque vivem numa penumbra cinzenta, onde não conhecem nem vitória, nem derrota.”*

Theodore Roosevelt

## **AGRADECIMENTOS**

Minha terna gratidão a todos aqueles que colaboraram para que este sonho pudesse ser concretizado.

Agradeço em primeiro lugar a Deus, pela força, coragem e iluminação durante toda essa caminhada;

Agradeço aos meus pais, Gláucia e Marcos, pela determinação e luta para a minha formação. Obrigada por cada incentivo e orientação, pelas orações em meu favor e pela preocupação para que eu estivesse sempre andando pelo caminho correto;

Ao meu noivo, Leandro, por todo amor, carinho, paciência e compreensão que tem me dedicado;

Ao professor Marcelo que, com muita competência, paciência e atenção, dedicou seu valioso tempo para me orientar em cada passo deste trabalho. Obrigada pelos preciosos ensinamentos, que levarei comigo por toda a vida;

À professora Yara por não medir esforços na sua co-orientação. Obrigada pela atenção e disposição;

Aos colegas de laboratório pela harmoniosa convivência e momentos de descontração;

Às Secretárias do Programa de Pós-Graduação: Lucélia e Luceleide pelo carisma e prestabilidade;

Às voluntárias e pacientes com câncer de mama atendidas no HC-UFG que, por um gesto de voluntarismo, doaram o material biológico necessário para a execução deste estudo;

Aos funcionários do Hospital do Câncer HC-UFG, em especial o NUPEC, pelo auxílio para o desenvolvimento deste trabalho;

À Alinne Tatiane Faria e Letícia Lopes Dantas, pela presteza, sempre prontas em auxiliar com boa vontade quando solicitadas;

Ao professor Dr. José Roberto Mineo, pela permissão para utilização de seus equipamentos;

Ao Grupo Luta pela Vida, pelo apoio financeiro;

E obrigada a todos que, mesmo não estando aqui citados, tanto contribuíram para a conclusão desta etapa da minha vida.

## SUMÁRIO

1 Introdução .....	11
2 Referencial Teórico .....	14
2.1 O que é o câncer? .....	15
2.2 Fatores de Risco.....	15
2.3 Classificação quanto ao tipo histológico .....	17
2.4 Estadiamento tumoral: TNM .....	19
2.5 Grau histológico: SBR.....	21
2.6 Epidemiologia .....	22
2.7 Método de detecção precoce: mamografia .....	24
2.8 Marcadores tumorais .....	25
2.8.1 EGFR1 .....	26
2.8.2 HER-2 .....	28
2.8.3 Trombospondina-1 .....	32
2.8.4 RANKL .....	33
3 Objetivos .....	35
3.1 Objetivo geral.....	36
3.2 Objetivos específicos .....	36
4 Participantes e métodos .....	37
4.1 Aspectos éticos.....	38
4.2 Cálculo amostral .....	38
4.3 Participantes da pesquisa.....	39
4.3.1 Grupo 1 .....	39
4.3.2 Grupo 2 .....	40
4.3.3 Grupo 3 .....	41
4.3.4 Grupo 4 .....	42

4.4 Dados das participantes .....	42
4.5 Coleta do sangue.....	43
4.6 Análise do sangue .....	43
4.8 Análise de resultados e análises estatísticas.....	44
5 Resultados .....	46
5.1 Características das pacientes.....	47
5.2 Níveis de sEGFR1 estão diminuídos em pacientes com câncer de mama.....	50
5.3 Níveis de sHER-2 estão aumentados em pacientes com câncer de mama ....	52
5.4 Níveis séricos de TSP-1 estão diminuídos em pacientes com câncer de mama metastático .....	54
5.5 Níveis séricos de RANKL não alteraram entre os grupos.....	56
5.6 Avaliação dos níveis de sEGFR1 e sHER-2 em um grupo de pacientes com câncer de mama primário e doença benigna da mama .....	56
6 Discussão.....	57
7 Conclusões.....	57
8 Considerações finais .....	57
Referências .....	57

## RESUMO

O câncer de mama é a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres e representa um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Apesar dos avanços em pesquisas na área de cancerologia, há poucos biomarcadores validados para uso na rotina clínica. Assim, este trabalho teve como objetivo investigar os níveis de quatro proteínas do soro relacionadas com os eventos em sua maioria anteriores do câncer de mama. Para este efeito, os níveis séricos de EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL foram investigados em vinte e oito pacientes com câncer de mama em estádio inicial e avançado, pelo método de ELISA. Dezenove voluntárias sem câncer de mama foram incluídas neste estudo como grupo controle. Os resultados mostraram que os níveis séricos de EGFR1 (sEGFR1) diminui com a progressão da doença. A concentração média de sEGFR1 no grupo controle foi de 61,7 ng/mL, 38,0 ng/mL no câncer de mama inicial e 34,2 ng/mL no câncer de mama metastático. O melhor valor de *cutoff* foi 46,85 ng/mL, com sensibilidade de 75% e 94,7% de especificidade para distinguir entre pacientes com câncer de mama e grupo controle. Com relação ao sHER-2, as concentrações foram encontradas para aumentar com a progressão da doença. A concentração mediana de sHER-2 no grupo de controle foi de 5,13 ng/mL, e em pacientes com a neoplasia em sua fase inicial e com câncer de mama metastático a mediana foi de 5,99 ng/mL e 6,18 ng/mL, respectivamente. Um valor de *cutoff* de 5,38 ng/mL de HER-2 foi capaz de distinguir indivíduos saudáveis e de câncer de mama, com 81,5% de sensibilidade e 78,9% de especificidade. Quanto à sTSP-1, mulheres com câncer de mama metastático têm níveis mais baixos do que o grupo controle e pacientes com câncer inicial. Além disso, embora as pacientes iniciais tendessem a ter uma concentração mais elevada do que o grupo controle, não houve diferença estatística. Quanto ao sRANKL nenhuma diferença foi observada entre os grupos. Por último, os nossos resultados trazem evidências de que os níveis de sEGFR1 e sHER-2 devem ser investigados em ensaios clínicos com tamanho amostral significativo na tentativa de se validar estas proteínas como potenciais biomarcadores para a detecção precoce do câncer de mama.

**Palavras-chave:** câncer de mama; biomarcadores; sEGFR1; sHER-2; TSP-1; RANKL.

## **ABSTRACT**

Breast cancer is the most common malignancy among women and represents a serious health problem around the world. Despite of the progression in cancer research, there is a few biomarker validated to be used in clinical routine. Thus, this work aimed to investigate the levels of four serum proteins related with the mostly earlier events of breast cancer. For this purpose, serum levels of EGFR1, HER-2, TSP-1 and RANKL were investigated in twenty-eight patients with breast cancer in the early and advanced stage by ELISA method. Nineteen volunteers with no breast cancer were included in this study as controls. The results showed that serum EGFR1 (sEGFR1) levels decrease with disease progression. The mean sEGFR1 concentration in control group was 61.7 ng/mL, 38.0 ng/mL in initial breast cancer and 34.2 ng/mL in metastatic breast cancer. The best cutoff value was 46.85 ng/mL, it was able to distinguish volunteers and breast cancer patients with 75% sensitivity, and 94.7% specificity. Regarding sHER-2, its levels were found to increase with disease progression. Serum HER-2 (sHER-2) median in control group was 5.13 ng/mL, and in initial breast, and metastatic breast cancer women the mean was 5.99 ng/mL and 6.18 ng/mL, respectively. A cutoff value of 5.38 ng/mL of HER-2 was able to distinguish healthy and breast cancer individuals with 81.5% of sensitivity and 78.9% of specificity. Regarding TSP-1, women with metastatic breast cancer had significantly lower levels than control group and initial breast cancer. Besides although initial patients tend to have a higher concentration than control group, no statistical difference was observed. Concerning serum RANKL no differences was observed between the groups. In conclusion, our results bring evidence that sEGFR1 and sHER-2 should be investigated in a large clinical trial in an attempt to validate these proteins as potentials biomarkers for earlier detection of breast cancer.

**Keywords:** breast cancer; biomarkers; sEGFR1; sHER-2; TSP-1; RANKL.



# *1 Introdução*

O câncer de mama é um sério problema de saúde pública no Brasil e no mundo. É a neoplasia maligna mais comum entre as mulheres, sendo a principal causa de morte por câncer em mulheres com menos de 65 anos.

A incidência cada vez maior e alta mortalidade por câncer de mama tornam indispensáveis esforços no sentido de se obter ferramentas para aumentar a compreensão do comportamento biológico dessa neoplasia e ainda, permitir identificar pacientes de risco.

Sabe-se que a detecção precoce do câncer de mama é importante para contribuir com a diminuição da taxa de mortalidade por esta doença, uma vez que o sucesso do tratamento está diretamente relacionado com o seu estabelecimento em fases iniciais.

Até agora, o único método de rastreio do câncer de mama que se provou ser eficaz é o exame mamográfico, no entanto, é um exame caro, possui suas limitações técnicas e necessita de mão-de-obra altamente especializada.

Portanto são necessários estudos na tentativa de buscar o desenvolvimento de novas abordagens de baixo custo que possam ser implementadas na rotina clínica para o rastreamento de câncer de mama em grupos de risco.

A dosagem de proteínas séricas que poderiam estar alteradas na presença da neoplasia tem parecido bastante atrativa. É um procedimento pouco invasivo, relativamente prático, financeiramente viável e possibilita o acompanhamento da paciente com a realização de coletas periódicas.

Assim, a obtenção de biomarcadores que sirvam como indicadores de câncer de mama em fase inicial de desenvolvimento, junto às metodologias já existentes para esse fim, pode melhorar de forma significativa a sobrevida das mulheres portadoras dessa doença.

Por exemplo, o antígeno específico da próstata (PSA) é usado clinicamente para complementar o diagnóstico de câncer de próstata.

Existem vários biomarcadores descritos na literatura que são expressos de forma aberrante no soro de pacientes com câncer de mama, sendo úteis para prognóstico e indicadores de metástase. Infelizmente, existem poucos biomarcadores utilizados para detecção precoce do câncer de mama.

Então, este estudo propôs investigar os níveis séricos de EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL em pacientes com câncer de mama inicial e avançado. A escolha

dos biomarcadores para esse estudo baseou-se na sua relevância para o câncer de mama e a possibilidade de detecção no soro pelo método ELISA.



## *2 Referencial Teórico*

## 2.1 O que é o câncer?

Células normais do nosso corpo crescem, se dividem em novas células e morrem de forma controlada. O câncer se inicia quando células de algum tecido começam a crescer de forma desordenada. Estas, em geral, são células que se tornaram resistente à morte, crescendo de forma descontrolada e dando origem a novas células com este mesmo potencial (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

As células cancerígenas, ao contrário de células normais, são capazes de crescer em outros tecidos. Esta característica permite a essas células migrar para outros tecidos, e formar um novo foco de tumor – massa de células cancerígenas –, processo conhecido como metástase (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

As células tornam-se cancerígenas por algum dano sofrido no ácido desoxirribonucléico (DNA). Sendo que as células originadas a partir destas carregam o mesmo dano no DNA (AMERICAN CANCER SOCIETY, 2014).

Como a maioria dos tumores humanos, o câncer de mama é uma doença multifatorial, que se desenvolve em indivíduos geneticamente suscetíveis expostos a agentes carcinogênicos externos. Assume-se que alterações genéticas sejam responsáveis pela progressão das células de estágio a estágio, desde células normais, passando por diversos tipos de lesões pré-malignas, carcinoma não invasivo, até doença metastática.

## 2.2 Fatores de Risco

Alguns fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de mama são bem conhecidos. Dentre eles, os fatores genéticos e hormonais desempenham um importante papel neste tipo de carcinoma, principalmente quando associados a outras variáveis (DAIDONE et al., 2004; DHINGRA; HORTOBAGYI, 1996; WINSTANLEY et al., 1991).

Mutações no gene BRCA1 estão presentes em aproximadamente 5% das mulheres com câncer de mama. Mutações nesse gene conferem um risco de 50%-85% para o aparecimento desta patologia. Já mutações no BRCA2 estão relacionadas com o aparecimento do câncer em idade precoce e à ocorrência de câncer de mama masculino (ROUKOS; BRIASOULIS, 2007). Aproximadamente 5-10% dos casos de câncer de mama são hereditários e cerca de 2/3 destes apresentam alterações destes genes (DONEGAN, 1997).

Fatores hormonais, como idade da menarca, história gestacional, a amamentação e a utilização de anticonceptivos estão associados ao risco de desenvolvimento de câncer de mama.

A idade precoce da menarca, menor de 12 anos, é considerada um fator de risco provavelmente pela exposição precoce ao meio hormonal. Alguns estudos demonstraram que mulheres com menarca precoce apresentam níveis mais elevados de estrógeno durante vários anos (BEENKEN; BLAND, 2002; ELMORE et al., 2005; HABEL; STANFORD, 1993).

A maioria dos estudos também traz a nuliparidade e a idade tardia da primeira gestação como fator de risco. Acredita-se que a amamentação diminui o risco para o desenvolvimento de câncer de mama devido ao fato desta provocar alterações hormonais tais como aumento da prolactina e redução da produção de estrógeno (ALBAIN; ALLRED; CLARK, 1994).

A relação entre uso de contraceptivos orais e terapia de reposição hormonal (TRH) e o risco para o desenvolvimento de câncer de mama tem sido extensivamente estudada. No entanto, os resultados dos estudos são bastante inconclusivos quanto ao risco de uso de contraceptivos (BEABER et al., 2014; MARCHBANKS et al., 2012). Já com relação ao uso de TRH, dois grandes estudos – *Million Women Study* e *Women's Health Initiative* – encontraram um risco aumentado para o desenvolvimento de câncer entre as usuárias, principalmente nas formulações combinadas de estrógeno e progesterona em comparação ao estrógeno sozinho. Sendo encontrado um risco maior ainda para mulheres que iniciam o uso da TRH imediatamente após a menopausa, mulheres magras e que possuem tecido mamário denso (BERAL, 2003; BERAL et al., 2011; CHLEBOWSKI et al., 2009; NAROD, 2011).

A idade continua sendo um importante fator de risco. As taxas de incidência aumentam rapidamente após os 50 anos. Cerca de 80% de todos os carcinomas mamários ocorrem em mulheres com idade igual ou superior a 50 anos. A probabilidade desenvolver carcinoma invasor de mama dentro de um período de 10 anos é menor que 1,5% aos 40 anos, 3% aos 50 anos e maior que 4% aos 70 anos. O câncer de mama ocorre com uma freqüência nove vezes maior em mulheres menopausadas, maiores que 50 anos, que em mulheres jovens (YAU et al., 2007). O que reforça a participação dos hormônios femininos na etiologia da doença.

Ainda admitem-se como fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de mama: etnia, hábitos alimentares, estilo de vida, exposição a fatores ambientais, história familiar para câncer de mama e alta densidade mamária (FEJERMAN; ZIV, 2008; VOGEL, 2008).

### **2.3 Classificação quanto ao tipo histológico**

O surgimento das técnicas de biologia molecular iniciou uma nova era no estudo das doenças malignas. Com a disseminação dessa tecnologia, o entendimento das características moleculares dos tumores começou a desempenhar um importante papel para diagnóstico, prognóstico e terapêutica na maioria dos tumores malignos.

É amplamente reconhecido que o câncer de mama não é uma doença simples, mas sim caracterizado por diferentes subtipos que são determinados com base na informação genética e molecular das células tumorais.

A estratificação clínica de rotina com base no perfil de expressão de receptor de estrógeno (ER), receptor de progesterona (PR), assim como pela expressão de receptor 2 do fator de crescimento epidérmico (Her-2/neu) foi proposto e recomendado pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica e pelo Colégio Americano de Patologistas (FITZGIBBONS et al., 2000; PAGE; JENSEN; SIMPSON, 1998). Essa recomendação está fundamentada no fato de que pacientes

com diferenças na expressão desses marcadores apresentavam diferentes prognósticos.

A partir daí, os carcinomas mamários foram classificados em quatro subtipos de acordo com sua expressão molecular: luminal, HER-2 positivo, basal-*like* e normal-*like* (PEROU et al., 2000; SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003).

Tumores luminais são caracterizados por expressarem receptor de estrógeno e apresentar um perfil similar ao das células luminais do epitélio da mama normal. (SOTIRIOU et al., 2003). Este subtipo foi ainda subdividido em dois grupos: luminal A e B, por apresentarem diferentes comportamentos clínicos e expressão gênica.

Os tumores luminais A apresentam alta expressão de ER e/ou PR e baixos índices de proliferação celular (baixa expressão de Ki-67). Já o subtipo luminal B exibe, em sua maioria, receptores hormonais, embora por vezes sejam expressos em baixos níveis. No entanto, suas características marcantes são a expressão de genes associados ao HER2 e a alta expressão de genes relacionados ao ciclo celular e proliferação, como Ki-67, e, portanto maiores taxas de proliferação celular (SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003).

O subtipo luminal A chega a representar aproximadamente 60% dos casos de câncer de mama, e em relação aos demais, é o que apresenta melhor prognóstico dado à existência de diferentes terapêuticas para o seu tratamento, como os antiestrogênicos, tamoxifeno e inibidores de aromatase (WEIGEL; DOWSETT, 2010).

Já o subtipo luminal B, devido ao seu alto índice de proliferação celular, está associado a um pior prognóstico quando comparado aos tumores luminais A (SORLIE et al., 2001; SORLIE et al., 2003). Este subtipo está associado a uma menor sobrevida livre de doença e maior risco de recorrência em todas as categorias de tratamento adjuvante sistêmico (CHEANG et al., 2009). E foi encontrado para ter maiores chances de resistência ao tamoxifeno (KENNECKE et al., 2010).

Os tumores que não expressam ER são agrupados em dois subgrupos distintos. Um subgrupo compreende tumores com superexpressão da proteína Her-2/neu e o outro abrange tumores com fenótipo basal.

Tumores Her-2/neu positivo são caracterizados pela amplificação do gene HER-2 e negatividade para receptores hormonais (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004). Esse subgrupo possui o segundo pior prognóstico em relação aos demais (SORLIE et al., 2001). Entretanto, a utilização de terapia alvo-específica, como por exemplo, o trastuzumab, melhora significativamente o prognóstico dessas pacientes (RAKHA; REIS-FILHO; ELLIS, 2010). Estudos demonstram que a terapêutica com o anticorpo monoclonal trastuzumab em pacientes com câncer de mama em estágio primário melhora a sobrevida e as taxas de resposta ao tratamento, assim como também reduz significativamente o risco de recorrência à metade e a mortalidade em um terço (CONSTANTINIDOU; SMITH, 2011; WOLFF et al., 2007).

Os tumores de fenótipo basal, basal-*like*, expressam genes e proteínas que são específicos das células basais do epitélio mamário, isto inclui a expressão de citoqueratinas e negatividade para ER, PR e HER-2. Este subtipo é o que apresenta comportamento clínico mais agressivo quando comparado aos tumores pertencentes aos outros subgrupos moleculares (DAIRKEE et al., 1987; MALZAHN et al., 1998; RAKHA et al., 2006), por não se beneficiarem do uso do trastuzumab, nem de terapias hormonais como o tamoxifeno, e nem dos inibidores de aromatase (IRVIN; CAREY, 2008)

E por fim, os tumores chamados normal-*like*, não-classificáveis, ou ainda mama-normal símile, expressam genes similares às células do parênquima mamário normal (PEROU et al., 2000). Esse subgrupo apresenta negatividade para os marcadores tumorais usuais. Acredita-se que este subtipo não seja um padrão molecular de células tumorais, e sim que represente uma contaminação com o tecido mamário sadio durante a realização das análises de expressão gênica (PARKER et al., 2009; WEIGELT et al., 2010).

## 2.4 Estadiamento tumoral: TNM

O estadiamento dos tumores consiste na avaliação da extensão da doença, sendo essencial para determinar todo o planejamento terapêutico e indicar o

prognóstico do caso. Vários sistemas podem ser usados para o estadiamento, sendo que o mais utilizado é o preconizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC), denominado Sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos, onde T= tamanho tumoral; N= comprometimento dos linfonodos axilares pelo tumor; M= presença ou ausência de metástases à distância.

O estadiamento pode ser clínico e patológico. O primeiro é estabelecido a partir dos dados de exame físico, com cuidadosa inspeção e palpação da pele, glândula mamária e linfonodos (axilares, supraclaviculares e cervicais) e, também, a partir de exames complementares de imagem. Já o estadiamento patológico baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomo-patológico da peça operatória. Para a diferenciação das duas formas de estadiamento, no estadiamento patológico o tamanho do Tumor (T), estado linfonodal (N) e metástase (M) são precedidos da letra “p” (pT;pN;pM) (GREENE FL, 2002).

O tamanho tumoral é um importante fator prognóstico do comportamento do câncer de mama. Dados baseados no SEER (*Surveillance, Epidemiology and End Results*) incluindo 13.464 mulheres com carcinoma mamário linfonodo-negativo observaram que pacientes com tumores < 1cm tiveram sobrevida global em 5 anos de cerca de 99%, comparada com 89% para tumores entre 1 e 3 cm e 86% para tumores entre 3 e 5 cm (CARTER; ALLEN; HENSON, 1989). Rosen e colaboradores avaliaram a relação entre o tamanho do tumor e a sobrevida livre de doença em 20 anos e encontraram uma sobrevida livre de doença em 20 anos de 88% para tumores ≤ 1 cm, de 72% para tumores de entre 1-3 cm e 59% para tumores entre 3-5 cm (ROSEN et al., 1993). Além disso, o tempo médio para o desenvolvimento de metástase sistêmica também diminui com o aumento do tamanho do tumor (CARTER et al., 1989; KOSCIELNY et al., 1984; ROSEN et al., 1993).

Além disso, o tamanho do tumor está intimamente relacionado com a presença e o número de linfonodos axilares comprometidos pelo tumor, sendo este o principal fator prognóstico em mulheres com câncer de mama. Em tumores menores de 1 cm, a frequência de metástases em linfonodos é de 10-20% (FITZGIBBONS et al., 2000).

Sabe-se que a presença de metástase em linfonodos aumenta o risco de recorrência da doença. Somente 20-30% de pacientes linfonodos negativos

desenvolverão recorrência em 10 anos comparadas com 70% para pacientes com metástases axilares (FITZGIBBONS et al., 2000).

Sendo que o número de linfonodos envolvidos é também um importante fator prognóstico. Carcinomas mamários com 4 ou mais linfonodos comprometidos tem pior prognóstico que os que apresentam menos de 4 linfonodos envolvidos (FITZGIBBONS et al., 2000; GOLDHIRSCH et al., 2005).

Estudos que estratificaram os carcinomas mamários de acordo com o número de linfonodos acometidos mostram que a sobrevida em 5 anos de pacientes com linfonodos negativos é de 82,2% comparada com 73% para 1-3 linfonodos positivos, 45,7% para 4-12 linfonodos positivos e 28,4% para mais de 13 linfonodos positivos (CIANFROCCA; GOLDSTEIN, 2004; FISHER et al., 1983).

## **2.5 Grau histológico: SBR**

A determinação do grau histológico dos tumores há muito vem sendo reconhecida como tendo um alto potencial de avaliar o prognóstico do câncer de mama, e deve ser incluída como componente do diagnóstico histológico deste carcinoma (ELSTON; ELLIS, 1991).

Vários sistemas de graduação têm sido propostos, no entanto, o mais amplamente aceito é o sistema de Nottingham, que corresponde ao sistema de graduação de Scarff-Bloom-Richardson (SBR), modificado por Elston e Ellis. Esses autores introduziram a importância do diâmetro do campo microscópico, na avaliação do índice mitótico, e estenderam a graduação histológica a todos os tumores mamários invasores, com exceção do carcinoma medular (ELSTON; ELLIS, 1991).

Neste sistema, o grau histológico é baseado na avaliação das características arquiteturais do tumor: como formação de estruturas tubulares, pleomorfismo nuclear (grau nuclear) e índice mitótico. Um escore de um a três é dado a cada um destes elementos, sendo que a soma dos três componentes determina o grau. Os tumores são classificados em grau I (bem diferenciados) quando as somas corresponderem aos resultados 3, 4 ou 5, grau II (moderadamente diferenciados) quando as somas

forem 6 ou 7 e grau III (pouco diferenciados) quando os resultados forem 8 e 9 (ELSTON; ELLIS, 1991).

A avaliação do grau histológico é considerada, por si só, um fator de prognóstico, por estar, fortemente, associado à sobrevida global e sobrevida livre de doença, sendo ambas piores naquelas pacientes com tumores pouco diferenciados, comparado àqueles bem diferenciados (BLOOM; RICHARDSON, 1957).

A sobrevida em 5 anos entre pacientes com neoplasias graus histológicos I, II e III é respectivamente, 75%, 53% e 31% (BLOOM & RICHARDSON, 1957).

## 2.6 Epidemiologia

O câncer de mama é ainda hoje uma das principais causas de morbidade e mortalidade em mulheres em todo o mundo. Ocupa um lugar de destaque no cenário mundial por ser o segundo tipo de câncer mais freqüente no mundo, atrás apenas do câncer de pulmão (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Dados da Agência Internacional para Pesquisa em Câncer (IARC, do inglês International Agency for Research on Cancer), mostrou que a incidência de câncer de mama tem aumentado em todo o mundo. A Estimativa é alarmante, para o ano de 2012 eram estimados mais de 1.7 milhões de novos casos. A neoplasia é considerada a quinta causa de mortalidade por câncer em geral, 522.000 óbitos, e em mulheres, a causa mais freqüente de morte (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2012).

Existe uma marcada variação em sua incidência entre os diversos países e, mesmo em uma mesma região, podem existir taxas diferentes em uma mesma população, devido a vários fatores.

As maiores taxas de incidência foram encontradas nos Estados Unidos e na Europa Ocidental, com 101 e 85 novos casos por 100.000 mulheres, respectivamente. Leste da Ásia tem a menor taxa, o que representa 21 casos por 100.000 mulheres. Na África, a incidência é relatada a ser de 23 por 100.000

mulheres, mas, devido à falta de registros e dados precisos, esta taxa pode ser subestimada (PORTER, 2008).

Em 2014, a *American Cancer Society* estimou que mais de 230.000 mulheres americanas seriam diagnosticadas com essa neoplasia e que mais de 40.000 morreriam desta doença nos Estados Unidos (SIEGEL et al., 2014).

No Brasil, segundo dados do Instituto Nacional do Câncer do Brasil (INCA) 49.240 novos casos de câncer de mama foram diagnosticados no ano de 2010. Já para o ano de 2014 foram estimados 57.120 novos casos, o que representa uma taxa de incidência de 56,1 casos a cada 100.000 mulheres. Sabe-se ainda que, excetuando-se o câncer de pele não melanoma, o câncer de mama é o câncer de maior incidência em mulheres de todas as regiões, excetuando-se na região Norte, onde o câncer de colo de útero ocupa a primeira posição (INCA, 2014).

Sua incidência varia entre as diferentes regiões do Brasil. Maiores taxas de incidência são esperadas para as regiões Sudeste e Sul, 71,2/ 100 mil e 71,0/ 100 mil, respectivamente. Seguidas pela região Centro oeste, Nordeste e Norte, com uma incidência esperada de 51,30/100 mil, 36,74/ 100 mil e 21,29/ 100 mil (INCA, 2014).

Com relação à mortalidade proporcional por câncer em mulheres, no período de 2008 a 2012, os óbitos por câncer de mama ocuparam o primeiro lugar no país, representando 15,88% do total de óbitos. As diferentes regiões do país apresentam taxa semelhante, com exceção da região norte, onde os óbitos por câncer de mama ocuparam o segundo lugar, com uma taxa de 11,99%. Nesse período, os maiores percentuais de mortalidade proporcional por câncer de mama foram os do Sudeste (16,99%) e Centro-Oeste (15,66%), seguidos pelo Sul (15,06%) e Nordeste (14,92%) (BRASIL, 2014).

Um dos principais fatores que contribui para a mortalidade por câncer de mama é a presença de metástase, que é a principal causa de mortalidade, sendo responsável por mais de 400.000 mortes por ano em todo o mundo (KAMANGAR; DORES; ANDERSON, 2006; PORTER, 2008). Das pessoas diagnosticadas com câncer de mama, 30% a 85% desses pacientes são diagnosticados com metástases ósseas, e a sobrevida média após o diagnóstico é de 25 a 72 meses (COLEMAN;

RUBENS, 1987; KOENDERS et al., 1992). Quando o câncer envolve as vísceras, o prognóstico é pior e a sobrevivência é ainda mais curta.

Taxa de sobrevida geral média em cinco anos mostra que a sobrevida das pacientes após apresentarem metástase à distância, para pulmão, osso e fígado, por exemplo, é muito pequena, 24%, quando comparada aos demais estágios, quando o tumor é regionalizado ou restrito à mama e, cujas taxas de sobrevidas são, 84% e 99%, respectivamente (SIEGEL et al., 2014).

Entretanto, as taxas de sobrevida variam grandemente em todo mundo. Em países desenvolvidos como América do Norte, Suécia e Japão a taxa de sobrevida é cerca de 80%. Já em países emergentes chega a ser de 60% e abaixo de 40% em países subdesenvolvidos (KAMANGAR et al., 2006).

A menor sobrevida das pacientes com câncer de mama em países menos desenvolvidos pode ser explicado, principalmente pela falta de programas de detecção precoce, resultando em aumento de mulheres com diagnóstico da doença em estágios avançados, bem como pela falta de diagnóstico e tratamento adequados.

## **2.7 Método de detecção precoce: mamografia**

A mamografia é o método preferencial para a investigação de patologias da mama, seja para esclarecimento de sintomatologia clínica, seja para rastreio do câncer de mama em pacientes assintomáticas (SICKLES et al., 1990). Aplicada para rastreio do câncer mamário insere-se no nível secundário de prevenção, cujo objetivo é a detecção precoce e não o diagnóstico.

No Brasil, é recomendado que, mulheres entre 50 e 69 anos de idade com risco habitual para o câncer de mama realizem mamografia a cada dois anos, na tentativa de detecção o mais precoce possível. Já para mulheres de alto risco para o desenvolvimento deste câncer, recomenda-se que a mamografia seja realizada anualmente, a partir dos 35 anos de idade (INCA, 2014).

Embora a mamografia seja o mais eficiente método de detecção do câncer de mama, entre os exames atualmente disponíveis, ela possui limitações. Na verdade, a sua sensibilidade varia de aproximadamente 60 a 90%, dependendo da idade da paciente, do tamanho tumoral, da localização e do aspecto mamográfico do tumor. A sua especificidade é de 30 a 40% para anormalidades mamográficas impalpáveis e de 85 a 90% para anormalidades clinicamente evidentes (SICKLES et al., 1990).

A alta taxa de falso-positivos em pacientes assintomáticas (com lesões não palpáveis) assume grande importância, pois leva à realização de muitos procedimentos cirúrgicos desnecessários, com custos econômicos e psicológicos inaceitáveis (CHRISTIANSEN et al., 2000). Vale ressaltar que a sensibilidade do método também é comprometida devido a limitações próprias dos profissionais envolvidos, seja pela utilização de técnicas imprecisas e/ou erros de interpretação dos achados, o que leva a resultados falso-negativos (BEAM; HENDRICK, 1999).

Além de seu emprego no rastreio do câncer de mama, a mamografia também permite a guia das lesões impalpáveis para a marcação pré-cirúrgica (EVERS; TROUPIN, 1993; HOMER; SMITH; SAFAII, 1992) e para a realização da core biópsia (LIBERMAN et al., 1994).

## 2.8 Marcadores tumorais

Os marcadores tumorais são substâncias encontradas no tecido e/ou fluidos corporais (sangue, urina, saliva) que podem estar em quantidades aumentadas e/ou diminuídas quando um determinado tipo de câncer está presente.

Por tanto, essas substâncias funcionam como indicadores da presença de câncer, e podem ser produzidas diretamente pelo tumor ou pelo organismo, em resposta à presença da neoplasia. Os marcadores tumorais, em sua maioria, são proteínas ou fragmentos destas.

No início das pesquisas com marcadores tumorais, a esperança era de que um dia todos os tipos de câncer pudessem ser detectados precocemente através da realização de um exame de sangue. A idéia parecia ser bastante atrativa por ser um

procedimento pouco invasivo, relativamente prático, financeiramente viável e ainda possibilitar o acompanhamento da paciente com a realização de coletas periódicas.

No entanto, esse marcador ainda não foi encontrado, uma vez que a maioria deles peca pela falta de especificidade e sensibilidade, com exceção do antígeno prostático PSA que é utilizado para rastreamento de neoplasia prostática.

Nos últimos anos, apesar da grande quantidade de estudos publicados sobre biomarcadores para câncer de mama, um marcador confiável para uso na prática clínica ainda permanece indisponível.

Algumas proteínas descritas na literatura como potenciais biomarcadores têm chamado a nossa atenção, dentre elas o receptor do fator de crescimento epidermal 1 (EGFR1), receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2, trombospondina-1 e ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B.

### **2.8.1 EGFR1**

O Receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR1) é uma proteína de 170 kDa. No retículo endoplasmático, o receptor é sintetizado em sua forma precursora com peso molecular de 160 kDa (Kilodalton), logo após é processado em sua forma madura (170 kDa), através da ligação a oligossacarídeos. Essa ligação de oligossacarídeos à porção N-terminal permite que o precursor do EGFR1 seja translocado do retículo endoplasmático para a membrana celular, assim como também permite que o EGF se ligue e o ative (SLIEKER; MARTENSEN; LANE, 1986).

O EGFR1 é também chamado de ErbB1, dado a grande homologia estrutural com o produto oncogênico da eritroblastose aviária (v-ErbB) (YAMADA; IKEUCHI; HATANAKA, 1997). Três outros receptores semelhantes ao EGFR1 já foram identificados, compreendendo então quatro receptores transmembrana tirosina cinase: ErbB1 ou EGFR1, ErbB2 ou HER-2, ErbB3 ou HER3, ErbB4 ou HER4, formando a família EGFR1, ou família de receptores ErbB, ou ainda família de receptores HER (receptor epidermal humano) (BARNES; KUMAR, 2003).

Estes receptores são formados por três domínios: um domínio extracelular rico em cisteína responsável pela ligação com o Fator de Crescimento Epidermal (EGF), um único domínio transmembranar e um domínio tirosina cinase citoplasmático o qual é responsável pela geração e regulação da sinalização intracelular (BARNES; KUMAR, 2003). Sabe-se que o domínio extracelular é formado por 4 subdomínios (I, II, III e IV ou L1, CR1, L2, CR2, respectivamente) e foi proposto que os subdomínios I e III formam o sítio de ligação para o ligante, enquanto os outros dois medeiam a dimerização do receptor e interações com outras proteínas (SCHLESSINGER, 2002).

Após a ligação do EGF, ocorre a formação de diferentes homodímeros ou heterodímeros, tendo como consequência, a ativação do domínio tirosina cinase citoplasmático. Conseqüentemente ocorre a transfosforilação de resíduos de tirosina que vão estimular diferentes cascatas de sinalização intracelular incluindo Ras/Raf, MEK/MAPK, PI3K/Akt, PLC- $\gamma$  e STATs (HARRIS; CHUNG; COFFEY, 2003; WONG; GUILLAUD, 2004). Isto é possível, pois todos os membros da família ErbB possuem a alça de dimerização altamente conservada (SCHLESSINGER, 2002). Estes resíduos de tirosina cinase citoplasmático servem como sítio de ligação para várias moléculas, que são recrutadas e permitem a ativação de diferentes vias intracelulares (HOLBRO; HYNES, 2004).

Além do EGF, outros ligantes pertencentes à família EGF de fatores tróficos também são capazes de se ligar ao EGFR1, ativá-lo e induzir a ativação de cascatas de sinalização intracelulares, dentre eles o Fator de Crescimento Transformante alfa (TGF $\alpha$ ) e anfirregulina (HSIEH; CONTI, 2005).

Embora a expressão de EGFR1 em tecidos adultos seja ubíqua, sua superexpressão está relacionada a um mau prognóstico para diversos tipos de tumores (pulmão, cólon, próstata, ovário, mama). Sabe-se que a super ativação desse receptor é capaz de conduzir a transdução de sinais intracelulares que podem afetar o crescimento celular, a inibição da apoptose, a migração e a invasividade, a angiogênese, entre os processos que levam à progressão de tumores malignos (HERBST, 2004; SALOMON et al., 1995).

Além da forma de EGFR1 transmembrana, isoformas solúveis contendo apenas a porção extracelular do receptor tem sido detectada em células normais e malignas, em tecidos e em fluidos biológicos (PEREZ-TORRES et al., 2008; ROSE-

JOHN; HEINRICH, 1994). Estas formas solúveis podem ser gerada ou por *splicing* alternativo do RNA mensageiro (RNAm) ou por clivagem proteolítica do receptor de membrana (LAFKY et al., 2008). O *splicing* alternativo do gene EGFR1 leva a geração de quatro transcritos: EGFR1 variantes 1, 2, 3 e 4 (v1, v2, v3 e v4, respectivamente) que codificam o receptor de membrana de 170 kDa, e as isoformas solúveis de 60 kDa (REITER; MAIHLE, 1996), 80 kDa (FLICKINGER; MAIHLE; KUNG, 1992; ILEKIS; STARK; SCOCCIA, 1995) e 110 kDa (REITER et al., 2001), respectivamente. Outra isoforma solúvel de EGFR1 de 110 kDa é produzida por clivagem proteolítica do receptor, em partem desencadeada por metaloproteinases (PEREZ-TORRES et al., 2008; SANDERSON et al., 2008).

Níveis de sEGFR1 circulante têm sido usado como marcador de previsão de prognóstico e resposta ao tratamento quimioterápico no soro de pacientes com câncer cervical (OH et al., 2000), colorretal (ZAMPINO et al., 2008), de ovário (BARON et al., 2009) e de mama (MULLER et al., 2006).

Como marcador preditivo para diagnóstico e prognóstico em câncer de mama, alguns trabalhos analisaram os níveis séricos de EGFR1 e correlacionaram com o estado da doença, sobrevida livre de doença, sobrevida global e outros parâmetros, incluindo características do tumor. No entanto, os seus resultados são bastante inconsistentes ou contraditórios. Alguns estudos descobriram que pacientes com câncer de mama têm níveis mais baixos de sEGFR1 do que mulheres do grupo controle, e quando se admitiu um valor de *cutoff* baixo, pôde-se distinguir pacientes com câncer de mama, detectar falha terapêutica ou agravamento da doença e admitir um mau prognóstico (MULLER et al., 2006; ROCCA et al., 2009; SANDRI et al., 2007; SOUDER et al., 2006). Por outro lado, alguns trabalhos encontraram que pacientes com câncer de mama têm níveis mais elevados de sEGFR1, mas não conseguiram correlacionar com progressão da doença, falha terapêutica ou mau prognóstico (HUDELIST et al., 2006; TAS et al., 2015). Além disso, os níveis de sEGFR1 não se correlacionaram com as características tumorais (HUDELIST et al., 2006; MULLER et al., 2006; ROCCA et al., 2009; TAS et al., 2015)

## 2.8.2 HER-2

Outro membro da família ErbB de receptores que tem sido intensamente estudado em carcinomas de mama é o receptor do fator de crescimento epidérmico humano 2 (HER-2). No entanto, este oncogene também está superexpresso em outros tumores como adenocarcinoma do trato gastrointestinal, carcinoma de ovário (RUBIN, S. C. et al., 1993), glioblastoma multiforme (NISHIKAWA et al., 1994) e carcinoma de pulmão (POTTI et al., 2002).

HER-2 é uma proteína de 185 kDa, que compartilha significante homologia com o EGFR1 (SCHECHTER et al., 1984). Podendo também ser denominada de *neu*, devido ao fato dos neuro/glioblastomas de ratos induzidos quimicamente pela etilnitrosouréia, possuírem uma mutação no oncogene *neu*, que por sua vez, possuía bastante homologia com o EGFR1 e a mesma localização cromossômica que o HER-2, nos humanos. HER-2 e *neu* são, então, dois genes idênticos e homólogos, um humano e outro murino (COUSSENS et al., 1985; KING; KRAUS; AARONSON, 1985; MOASSER, 2007; SCHECHTER et al., 1984).

Assim como o EGFR1 e os outros membros da família de receptores ErbB, o HER-2 é um receptor com atividade intrínseca de tirosina cinase e formado por três domínios: extracelular, transmembranar e intracelular (SCHLESSINGER, 2002). Sendo que sua ativação conduz a sinalização através de inúmeras vias intracelulares que afetam a proliferação, sobrevivência, motilidade e adesão das células tumorais (RUBIN, I.; YARDEN, 2001).

Uma vez que HER-2 não tem nenhum ligante conhecido, atua como co-receptor dos outros três membros da família ErbB, ou seja, ele pode formar heterodímeros e potencializar o complexo de sinalização via esses receptores (BARNES; KUMAR, 2003; HENSON; GIBSON, 2006; HSIEH; CONTI, 2005). Sabe-se ainda, que os heterodímeros de HER-2 são mais estáveis e geram sinais intracelulares mais potentes e mais duradouros (GRAUS-POR TA et al., 1997) e têm um potencial mitogênico mais acentuado que outras combinações de receptores sem o HER-2 (KLAPPER et al., 1999).

É digno de nota que, o domínio extracelular de HER-2, ao contrário dos outros membros da família ErbB, assume sempre uma conformação aberta, semelhante à conformação dos outros receptores após a sua ativação, permitindo que o “braço de dimerização” esteja sempre exposto, ou seja, em estado permanente de capacidade dimerizante (CITRI; SKARIA; YARDEN, 2003). Esta característica faz com que o

HER-2 não possua um estado anti-autoativação (BAZLEY; GULLICK, 2005), fato este que contribui para o potencial maligno, quando este receptor é superexpresso (WORTHYLAKE; OPRESKO; WILEY, 1999).

O proto-oncogene *HER2* é amplificado em 15-30% dos casos de câncer de mama, sendo associado com o comportamento mais agressivo da doença (OWENS; HORTEN; DA SILVA, 2004; SLAMON et al., 1989). Alguns trabalhos demonstram uma forte correlação positiva entre a amplificação gênica e a superexpressão da proteína no tecido (KALLIONIEMI et al., 1992; SLAMON et al., 1989).

Um dos estudos pioneiros com relação ao valor prognóstico de HER-2 constatou que mulheres com câncer de mama que superexpressavam esse receptor apresentavam menor sobrevida global e menor sobrevida livre de doença (SLAMON et al., 1987). E no seguimento deste primeiro estudo, a grande maioria corroboraram com este achado.

A demonstração da associação de tumores com amplificação gênica e/ou superexpressão de HER-2 com um pior prognóstico fez com que esses parâmetros fossem avaliados rotineiramente em todos os carcinomas mamários invasores, seguindo o guia de recomendações de determinação do *status* do HER-2 de diversos países (ALBANEELL et al., 2009; BARTLETT et al., 2011; HAMMOND, 2011; HANNA et al., 2007). Além de que levou à investigação por tratamentos mais eficazes às pacientes que apresentavam tumor com superexpressão dessa proteína, o que culminou no desenvolvimento de importantes tratamentos alvo-específicos, como o trastuzumab (Herceptin<sup>TM</sup>), lapatinib (Tykerb<sup>TM</sup>), pertuzumab (Perjeta<sup>TM</sup>) (MILES, 2001; ROSS et al., 2009; SHAH; CHEN, 2011)

Desde então, a avaliação dos níveis de HER-2 também tem sido utilizado como marcador preditivo de resposta terapêutica. Estudos demonstram que pacientes com câncer de mama com superexpressão deste receptor se beneficiam da utilização clínica de trastuzumab (ROSS et al., 2009), ao passo que não se beneficiam de terapêutica hormonal, como por exemplo, do uso do tamoxifeno (DE PLACIDO et al., 2003).

Além da forma de HER-2 transmembranar, na década de 1990 foi descoberto um fragmento solúvel de HER-2 (sHER-2 – contendo apenas o domínio extracelular da proteína), com cerca de 105-110 kDa, no sobrenadante dos meios de cultura de

células tumorais de mama e no soro de pacientes com câncer de mama metastático (Zabrecky et al., 1990; Lin & Clinton, 1991; Pupa et al., 1993).

Fragmentos de sHER-2 podem ser gerado por duas formas: clivagem proteolítica do receptor ou por *splicing* alternativo de RNAm (TSE et al., 2012). A clivagem do receptor é mediada por proteases pertencentes à família ADAM (*A Disintegrin And Metalloproteases - Metaloproteinases e disintegrinas*) e MMP (*Matrix Metalloproteases - metaloproteinases da matriz*) (SANDERSON; DEMPSEY; DUNBAR, 2006), sendo que em tumores de mama, a ADAM-10 é reconhecida como a de maior importância para este processo (TSE et al., 2012). Neste processo de clivagem do receptor é gerado concomitantemente ao sHER-2 um fragmento amino-terminal truncado associado à membrana (p95HER-2), que possui atividade tirosina cinase (TSE et al., 2012).

Por meio do processo de *splicing* alternativo pode ser codificado uma proteína intracelular com peso molecular de cerca de 100 KDa, sendo esta forma associada à resistência aos anticorpos terapêuticos (SCOTT et al., 1993; TSE et al., 2012), assim como também uma proteína solúvel de 68 kDa, que está associada à efeitos inibitórios da sinalização via HER-2, por se ligar a ele e inibir sua dimerização com outros receptores da família ErbB (DOHERTY et al., 1999). No entanto esta última variante está presente em apenas 25% dos cânceres de mama em mulheres (KOLETSA et al., 2008).

De forma semelhante ao *status* HER-2 determinado no tecido, o sHER-2 também tem valor prognóstico. sHER-2 foi encontrado aumentado em pacientes com câncer de mama avançado ou com metástase à distância (LEITZEL et al., 1992; MORI et al., 1990). Sendo que posteriormente, também foi estabelecida uma relação positiva entre a superexpressão de HER-2 no tumor e os níveis elevados de sHER-2 (ANDERSEN et al., 1995; NARITA et al., 1992).

Ainda acerca do interesse a nível prognóstico, estudos demonstraram haver correlação significativa entre o sHER-2 e o tamanho do tumor, o comprometimento de linfonodos (KRAINER et al., 1997), o alto grau histológico, a negatividade para ER e PR (LUDOVINI et al., 2008).

### 2.8.3 Trombospondina-1

A trombospondina (TSP) é uma proteína multifuncional que existe como uma proteína secretada e como uma molécula insolúvel da matriz extracelular (BORNSTEIN, 1992; FRAZIER, 1991). Possui cinco isoformas, sendo TSP-1, a mais bem caracterizada.

TSP-1 é produzida por uma variedade de tipos celulares incluindo células endoteliais (MOSHER; DOYLE; JAFFE, 1982), fibroblastos (JAFFE et al., 1983), macrófagos e monócitos (JAFFE; RUGGIERO; FALCONE, 1985) e células tumorais (MOSHER, 1990; VARANI et al., 1989). Sabe-se que a maioria de TSP-1 produzida por essas células é ligada à matriz extracelular (ECM), associada fortemente com a membrana basal (WIGHT et al., 1985).

Funcionalmente, TSP-1 é um componente da ECM envolvida na adesão celular de vários tipos celulares entre eles as células endoteliais e melanócitos humanos (McClennic et al., 1989; Murphy-Ullrich and Höök, 1989). Além disso, outras células derivadas de neoplasias como melanoma, osteossarcoma e câncer de mama também aderem ao TSP-1 usando vários tipos de integrinas (Wang et al., 1996; Decker et al., 2002; Tuszyński et al., 1987). Portanto, é possível que a adesão ao TSP-1 possa facilitar o movimento de células do câncer de mama através da matriz extracelular promovendo o crescimento e invasão do tumor (Wang et al., 1996).

Além disso, TSP-1 é um indutor da formação de vasos em diferentes tipos de neoplasias, incluindo carcinoma de mama invasivo (Tuszyński and Nicosia, 1994; Clezardin et al., 1993; Wong et al., 1992; Yang et al., 2008).

Adicionalmente, foi demonstrado que pacientes com câncer de mama, pulmão e cólon tinham níveis séricos de TSP-1显著emente elevado em comparação a indivíduos pertencentes ao grupo controle (TUSZYNSKI et al., 1992).

Essas evidências levantam a questão sobre a possibilidade de que alterações dos níveis séricos de TSP-1 estariam implicadas no crescimento inicial do tumor. Um estudo detectou elevados níveis de TSP-1 em pacientes com câncer de mama receptor estrógeno negativo e receptor progesterona positivo comparado com pacientes saudáveis (Suh et al., 2011).

## 2.8.4 RANKL

O receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK) e seu ligante (RANKL) são as principais moléculas envolvidas na diferenciação e ativação dos osteoclastos, assim como também controlam a formação de linfonodos, o desenvolvimento de células epiteliais da porção medular do timo e a formação de glândulas mamárias durante a lactação (GONZALEZ-SUAREZ et al., 2010; KHOSLA, 2001) (LEIBBRANDT; PENNINGER, 2009; NAKAGAWA et al., 1998).

O papel de RANKL para o desenvolvimento de osteoclastos foi demonstrado em modelos de camundongos por supressão e/ou administração exógena desta molécula. Foi observado que a deleção do gene que codificava essa proteína levava à osteoporose, erupção dentária prejudicada e ausência de osteoclastos maduros (KONG et al., 1999), enquanto que sua administração exógena causava uma rápida elevação dos níveis séricos de cálcio devido à ativação e/ou diferenciação de osteoclastos (LACEY et al., 1998).

A descoberta de que as vias de sinalização RANK/ RANKL desempenhavam um papel central na reabsorção óssea mediada por osteoclastos impulsionou diversos estudos que constataram a desregulação da formação de osteoclastos induzida por RANKL em diversas patologias com perdas ósseas, tais como osteólise periprotética, artrite reumatóide, doença periodontal e mieloma múltiplo (CROTTI et al., 2003; FARRUGIA et al., 2003; HAYNES et al., 2001).

O RANKL também tem sido relacionado com a metástase óssea, sendo esta uma das complicações fatais do câncer de mama, com redução importante na sobrevida das pacientes (GASPARINI; HARRIS, 1995). Baseado na sua importância clínica, um inibidor de RANKL (Denosumab) foi aprovado pelo FDA para a prevenção de doenças esqueléticas relacionadas com o câncer (CASTELLANO et al., 2011).

Além disso, recentemente, RANKL foi relacionado com o desenvolvimento de câncer de mama. A expressão de RANK e RANKL tem sido detectada em linhagens de células de câncer de mama e estão envolvidos com o desenvolvimento do câncer de mama induzido pela progesterona (SCHRAMEK et al., 2010). Estudos prévios demonstraram que a progesterona induz a proliferação de células epiteliais do tecido

mamário nos primeiros momentos da tumorigênese e é dependente da expressão de RANKL e, talvez, possa ser uma das razões do desenvolvimento do câncer de mama (GONZALEZ-SUAREZ et al., 2010; SCHRAMEK et al., 2010).

RANKL é expresso em três formas moleculares que compreendem uma proteína transmembranar trimérica (encontrada em osteoblastos), um ectodomínio truncado (forma solúvel clivada a partir da forma ligada à célula) e uma secretada (produzida por células T ativadas). Presumivelmente, as duas últimas formas da molécula são as formas circulantes, embora ainda não seja bem compreendido nem a forma molecular e nem a célula fonte que contribui para a forma circulante de RANKL (SCHRAMEK; SIGL; PENNINGER, 2011).

Foi demonstrado que tumores com metástase para osso pode induzir proteases, como por exemplo MMP7 e catepsina G, que conduzem a um aumento de RANKL solúvel, osteoclastogênese e osteólise (LYNCH et al., 2005; WILSON et al., 2008).

No entanto, ainda não há informações na literatura mostrando a interação entre os níveis elevados de RANKL no soro e a agressividade do câncer de mama. Nesse ponto, é interessante investigar se pacientes com câncer de mama inicial apresentariam mudanças nos níveis séricos de RANKL.



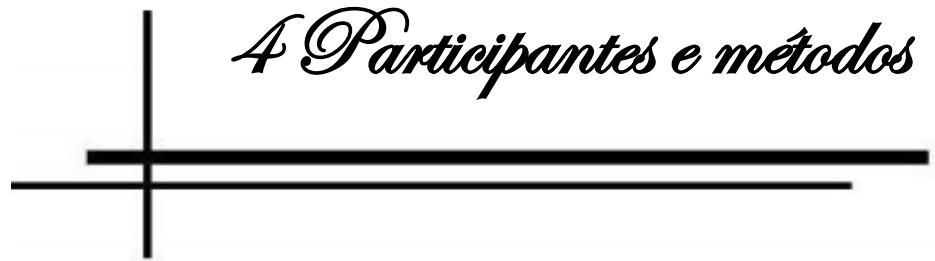
*3 Objetivos*

### **3.1 Objetivo geral**

Investigar os níveis séricos das proteínas HER-2, EGFR1, TSP-1 e RANKL em pacientes com câncer de mama como possíveis biomarcadores para rastreamento de neoplasias da mama.

### **3.2 Objetivos específicos**

1. Selecionar os pacientes em estadiamento pT1;pN0;pM0 e pT2;pN0;pM0 e coletar o sangue após o consentimento;
2. Selecionar e coletar o sangue de pacientes em estadiamento IV no dia em que concordar em participar do estudo;
3. Selecionar o grupo controle/voluntário e coletar o sangue no dia em que concordar em participar do estudo;
4. Investigar os níveis séricos de EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL nas pacientes com câncer de mama e voluntárias pelo método ELISA;
5. Analisar os dados das pacientes em estádio inicial (pT1 e pT2), comparando com o grupo controle e com grupo de pacientes com doença metastática.



## *4 Participantes e métodos*

#### **4.1 Aspectos éticos**

O projeto de pesquisa que resultou na presente dissertação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa sobre Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal de Uberlândia, sob protocolo nº 294.508 de 05 de junho de 2013.

No desenvolvimento deste estudo, foi apontado como provável risco aos sujeitos envolvidos, a formação de hematoma ou flebite no local que foi retirado o sangue e medo de que suas respostas possam ser identificadas e utilizadas para outros fins que não os da pesquisa em questão. Pretendeu-se, no entanto, eliminar ao máximo tais riscos ao facultar ao sujeito a livre opção de participar ou não da pesquisa (após as explicações adequadas e a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido) e ao assegurar sigilo absoluto quanto à sua identidade. Para eliminar tais riscos, a equipe executora se comprometeu com o sigilo absoluto da identidade dos sujeitos.

Embora as análises das amostras de sangue não beneficiaram diretamente os sujeitos participantes, os resultados poderão futuramente ajudar outros pacientes com doenças similares. Além disso, destacam-se outros benefícios indiretos de imediato, são eles: maior compreensão acerca da alteração de algumas substâncias no sangue de pacientes com câncer de mama que poderiam ser correlacionadas com o câncer de mama na sua fase inicial; a concepção de novos estudos e pesquisas para essa questão, mediante as informações coletadas e a publicação dos resultados; o aprendizado dos pesquisadores sobre a importância de se conduzir uma pesquisa científica e as metodologias envolvidas.

#### **4.2 Cálculo amostral**

O cálculo amostral foi baseado no número de mulheres admitidas no Hospital do Câncer – UFU em 2011 e 2012. Foi admitido um erro amostral de 5% com nível de confiança de 95%.

$$n = \frac{N \cdot Z^2 \cdot p \cdot (1 - p)}{Z^2 \cdot p \cdot (1 - p) + e^2 \cdot (N - 1)}$$

Onde:

n - amostra calculada

N - população

Z - variável normal padronizada associada ao nível de confiança

p - verdadeira probabilidade do evento

e - erro amostral

### **4.3 Participantes da pesquisa**

Foram selecionadas para o estudo vinte e oito mulheres com câncer de mama admitidas no Setor de Mastologia e/ou Oncologia do Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG) da cidade de Uberlândia, MG, no período de novembro de 2013 a janeiro de 2015. No mesmo período, também foram selecionadas para compor o grupo controle dezenove voluntárias com exame mamográfico recente (último ano) sem alterações. As participantes foram alocadas em três grupos. O Grupo 1 compreendeu pacientes com câncer de mama em estadiamento inicial. Ao passo que o Grupo 2 abrangeu pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma ductal invasivo com presença de metástase óssea e/ou visceral, estádio IV, de acordo com a *American Joint Committee on Cancer* (GREENE FL, 2002). E o grupo 3 voluntárias saudáveis. Segue abaixo os critérios de inclusão e exclusão de cada grupo.

#### **4.3.1 Grupo 1**

Esse grupo compreendeu treze mulheres com diagnóstico histológico de carcinoma ductal infiltrante de mama nos estádios T1a,b,c N0 e T2N0, de acordo com *American Joint Committee on Cancer* (GREENE FL, 2002). Importante ressaltar

que o estadiamento foi clínico, conforme a rotina do Setor de Mastologia HC-UFG. Logo após a biopsia inicial (*core biopsy* ou biópsia por agulha fina) e emissão do laudo histopatológico (para confirmação do diagnóstico) foi coletado o sangue das pacientes que concordaram em participar do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) (ANEXO A). As pacientes foram tratadas conforme a rotina do serviço, ou seja, foram submetidas a tratamento local com cirurgia radical ou conservadora, conforme a decisão da equipe cirúrgica e da paciente. Este estudo não interferiu em nenhuma hipótese na dinâmica de tratamento das especialidades médicas em questão. Os critérios de exclusão do Grupo 1 foram:

- a) Peça cirúrgica revelando um tumor maior que 5 centímetros (cm) ou linfonodos axilares comprometidos;
- b) Detecção de metástases até 6 meses após a abordagem. Nesse caso, as pacientes foram realocadas no Grupo 2, uma vez que a presença de metástases tão precoce indicaria doença disseminada ao diagnóstico, quando os exames de imagens não foram sensíveis o bastante para tal detecção;
- c) Também foi critério de exclusão mulheres com história de diagnóstico de qualquer outro tipo de câncer ou outras doenças sistêmicas graves, tais como insuficiência cardíaca grave, insuficiência hepática progressiva, insuficiência renal progressiva, doenças imunológicas ou reumatológicas;
- d) Foram também excluídas as usuárias de anticoncepcional e qualquer terapia de reposição hormonal nos últimos 12 meses. Este critério de exclusão foi baseado nos resultados do estudo de Pitteri e Hanash de 2011 que demonstrou que os níveis hormonais poderiam influenciar no perfil de proteínas no soro (PITTERI; HANASH, 2011).

#### **4.3.2 Grupo 2**

Para comparação dos níveis séricos das proteínas propostas temos o Grupo 2, formado por pacientes com câncer de mama no estádio IV que apresentavam metástase óssea e/ou visceral (GREENE FL, 2002), pareados com a idade das

pacientes do Grupo 1. Foram convidadas para esse estudo quinze pacientes com diagnóstico histológico de carcinoma ductal infiltrante de mama no estádio IV, de acordo com *American Joint Committee on Cancer* (GREENE FL, 2002). Foi incluída neste grupo toda paciente que apresentava metástases ósseas, hepáticas, pulmonares, cerebral, dentre outros sítios, constatada conforme a protocolo do Setor de Oncologia HC-UFU, onde as pacientes só são rastreadas para a presença de metástase após queixa de sintomas. A coleta de sangue deste grupo foi realizada no dia em que houve adesão em participar do presente estudo. As pacientes foram tratadas conforme a rotina do serviço, ou seja, foram submetidas a tratamento local com cirurgia radical ou conservadora, conforme a decisão da equipe cirúrgica e da paciente, seguido do tratamento paliativo preconizado pelo Setor de Oncologia do HC-UFU. Este estudo não interferiu em nenhuma hipótese na dinâmica de tratamento das especialidades médicas em questão. Os critérios de exclusão do Grupo 2 foram:

- a) Mulheres com história de diagnóstico de qualquer outro tipo de câncer ou doenças sistêmicas graves, tais como insuficiência cardíaca grave, insuficiência hepática progressiva, insuficiência renal progressiva, doenças imunológicas ou reumatológicas;
- b) Foram também excluídas as usuárias de anticoncepcional e qualquer terapia de reposição hormonal nos últimos 12 meses.

#### **4.3.3 Grupo 3**

O grupo controle foi formado por dezenove voluntárias que tinham atividade na instituição onde se realizou o estudo e tinham mantido a sua rotina de prevenção do câncer de mama e de colo de útero no último ano, dentro do padrão da normalidade. A coleta de sangue deste grupo foi realizada no dia em que houve adesão em participar do estudo. O grupo de controle/voluntário também teve suas idades pareadas com os Grupos 1 e 2. Os critérios de exclusão do grupo 3 foram:

- a) Mulheres com história de diagnóstico de qualquer tipo de câncer ou outras doenças sistêmicas graves, tais como insuficiência cardíaca grave, insuficiência hepática progressiva, insuficiência renal progressiva, doenças imunológicas ou reumatológicas.
- b) Também foram excluídas as usuárias de anticoncepcional e qualquer terapia de reposição hormonal nos últimos 12 meses.

#### **4.3.4 Grupo 4**

Também foi incluído no estudo um grupo de vinte e quatro pacientes com câncer de mama primário e doença benigna da mama que passaram por procedimento cirúrgico no Hospital de Clínicas da Universidade Federal de Uberlândia (HC-UFG) da cidade de Uberlândia, MG, no período de março a junho de 2014.

Este grupo foi utilizado para verificar alguns parâmetros do teste de dosagem de sEGFR1 e sHER-2. Estes parâmetros incluíram valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia.

#### **4.4 Dados das participantes**

Para este estudo foi elaborado um questionário padronizado, desenvolvido pelos pesquisadores (ANEXO B), este foi aplicado às participantes dos grupos 1, 2 e 3, com o objetivo de obter dados para verificar a associação entre os fatores de risco e/ou protetores conhecidos para o câncer de mama e o desenvolvimento desta patologia na população estudada. Este instrumento abrange itens como hábitos de vida, dados antropométricos e sócio-econômicos, doenças prévias, história de câncer na família e outros fatores relacionados ao câncer de mama, por exemplo, data da primeira menstruação, menopausa, partos, amamentação, uso de contraceptivos e TRH e rotina de prevenção de câncer de mama.

O questionário foi aplicado a todas as participantes que aceitaram em participar voluntariamente do estudo, logo após a assinatura do TCLE.

Dados clínicos e histopatológicos foram obtidos dos prontuários médicos e laudos anátomo-patológicos arquivados incluindo: estadiamento clínico, características patológicas como tipo e grau histológico do tumor, tamanho tumoral, presença de metástases axilares e a distância, dados imuno-histoquímicos, tratamentos realizados (quimioterapia, radioterapia e hormonioterapia) e evolução clínica.

#### **4.5 Coleta do sangue**

A coleta de sangue foi realizada no mesmo local de abordagem da participante pelos enfermeiros da equipe desse estudo, no momento em que a paciente aceitou em participar. O sangue foi coletado através de punção em veia periférica (2 mL por paciente) em tubos de coletas sem anticoagulante próprios para sorologia. Cada tubo foi identificado com uma etiqueta contendo as seguintes informações: código da paciente, hora e data da coleta. No entanto não houve nenhuma identificação dos Grupos 1, 2 ou 3 nestes tubos. As amostras coletadas foram mantidas em caixa refrigerada e, logo após, os tubos foram transportados, também em caixa refrigerada ao Laboratório de Imunoparasitologia, no Instituto de Ciências Biomédicas dessa mesma Universidade, para as etapas analíticas.

#### **4.6 Análise do sangue**

O sangue coagulado foi centrifugado a 3.000 rpm por 10 min. Nesse ponto, foi possível coletar o soro que foi armazenado em tubos *eppendorf* de 1,5 mL, devidamente identificados em ultrafreezer a -80°C até o momento da análise sorológica.

Os níveis séricos de EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL foram determinados por meio de ensaio imunoenzimático de fase sólida (ELISA). Todos os testes foram realizados seguindo o protocolo do fabricante dos kits (R&D Systems, Minneapolis,

Minnesota, USA). Todas as amostras foram processadas em duplicatas como controle intra-ensaio.

Brevemente, as placas de ELISA (Costar 3590, Corning, New York, USA) foram sensibilizadas com 100 µL/poço de anticorpo monoclonal específico para um dos bimarcadores propostos, diluído em tampão fosfato-salino (PBS), pH 7,2-7,4 e incubadas overnight em temperatura ambiente. Após a incubação, as placas foram lavadas três vezes com tampão PBS-Tween 0,05%, pH 7,2-7,4 (400 µL/poço). Em seguida a placa foi bloqueada com 300 µL/poço de PBS com 1% de albumina sérica bovina (BSA), permanecendo as placas por uma hora em temperatura ambiente. Após esse período, as placas foram lavadas como descrito anteriormente. Foram então acrescentados 100 µL/poço do soro coletado e/ou proteína recombinante (padrão) e as placas foram incubadas por duas horas em temperatura ambiente. As amostras de soro foram diluídas 1:50, 1:10, 1:500 e 1:2 para EGFR1, HER-2, TSP-1 e RANKL, respectivamente. Estes valores de diluições foram definidos com base em ensaios de diluições seriadas com algumas amostras de cada grupo e definido a diluição em que as amostras eram detectadas no meio da curva padrão. As placas foram lavadas e então adicionado 100 µL/poço do anticorpo de detecção biotinilado, sendo incubadas por duas horas em temperatura ambiente. As placas foram lavadas e então adicionados 100 µL/poço de streptavidina conjugada à peroxidase diluída 1:200, em 1% de BSA em PBS e incubadas por vinte minutos em temperatura ambiente (protegido da luz). Após esta etapa, as placas foram lavadas e adicionado 100 µL/poço da solução cromógena de tetrametilbenzidina (TMB, B&D, Franklin Lakes, New Jersey, USA) e incubadas por vinte minutos para a conversão de uma solução incolor para uma solução com coloração azul. Depois de observada a reação, ela foi interrompida com 50 µL/poço ácido sulfúrico 2 normal (2N), tornando a coloração de azul para amarela. A leitura foi realizada em leitor de microplacas (SpectraMax, Molecular Devices, Sunnyvale, California, USA) a 450 nanômetros (nm) com correção para 570 nm. A partir da absorbância média de cada amostra, foram calculadas as concentrações dos biomarcadores em nanogramas por mililitros (ng/mL) plotando-se a absorbância destas versus as concentrações dos padrões.

#### 4.8 Análise de resultados e análises estatísticas

O tratamento estatístico dos resultados obtidos foi realizado através do software GraphPad Prism versão 5.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, Califórnia, USA) e SPSS Statistics versão 17.0 (SPSS Inc., San Diego, Califórnia, USA). Na estatística descritiva, para comparação da diferença da expressão das proteínas analisadas entre os grupos, primeiramente, os dados foram analisados quanto à sua distribuição normal utilizando testes de Kolmogorov-Smirnov, D'Agostino e Pearson e Shapiro-Wilk. Então os resultados de dados paramétricos foram expressos através de médias e desvio padrão (SD) utilizando o teste One way ANOVA, com aplicação do pós-teste de Tukey ou Bonferroni dependendo da homogeneidade das variâncias entre os grupos (teste de Bartlett), sendo o primeiro utilizado quando as variâncias eram iguais e o segundo quando as variâncias eram diferentes entre os grupos. Os dados não paramétricos foram analisados pelo teste de Kruskal-Wallis, pós teste de Dunn e expressos em medianas e variação.

Os valores de *cutoff* para EGFR1, HER-2 e TSP-1 foram definidos por análise da curva ROC. Foi definido em um ponto da curva ROC com uma maior otimização da sensibilidade em detrimento da especificidade.

O valor preditivo positivo, valor preditivo negativo e acurácia foram calculados para avaliar o desempenho dos testes sorológicos de sEGFR1 e sHER-2. O VPP foi obtido dividindo-se a frequência de pacientes doentes e com teste suspeito pelo total de testes positivos. De forma análoga, considerando o número de pacientes saudáveis (com doença benigna da mama) foi calculado o VPN, onde a frequência de pacientes saudáveis e com testes não suspeito foi dividido pelo total de testes negativos. A acurácia foi calculada dividindo-se o valor de testes verdadeiro-positivos e verdadeiro-negativos pelo total de pacientes.

A correlação entre variáveis conhecidas como fatores de risco e/ou protetores para o câncer de mama foi verificada aplicando-se o teste do qui-quadrado. Da mesma forma este teste também foi utilizado para verificar a correlação entre positividade para as proteínas investigadas e câncer de mama.

Para a significância estatística entre os dados, utilizou-se o nível de significância de 5%. Assim, consideraram-se como significativas as associações e concordâncias cuja probabilidade de significância do teste, p-valor, é menor que 0,05.

*5 Resultados*



## 5.1 Características das pacientes

Um total de vinte e oito pacientes foram recrutadas, destas quinze (53,6%) eram pacientes com câncer de mama metastático e treze (46.4%) eram pacientes com câncer de mama em estádio inicial, com tumor menor que 5 cm, sem comprometimento de linfonodos e sem metástase.

A tabela 1 apresenta os sítios de metástase das participantes do estudo. A maioria (73,3%, n=11) tinha metástase para um único sítio, três (20%) tinham metástase para dois sítios e uma (6,7%) tinha metástase para sete sítios. Os principais sítios de metástase foram: pulmão, fígado, osso e sistema nervoso central. Das quinze pacientes metastáticas cinco (33,3%) tinham metástase pulmonar, quatro (26,7%) tinham metástase hepática, quatro tinham (26,7%) tinham metástase óssea e três (20,0%) para sistema nervoso central.

**Tabela 1 – Sítio de metástase das participantes do estudo**

Local	Número de pacientes (n)	Frequência (%)
Pulmão	5	33,3
Fígado	4	26,7
Osso	4	26,7
Sistema nervoso central	3	20,0
Intestino	1	6,7
Vesícula	1	6,7
Pele	1	6,7
Mama contralateral	1	6,7
Útero	1	6,7
Ovário	1	6,7

No grupo controle a idade média foi de 55,50 ( $\pm 9,74$ ) e em pacientes com câncer de mama a média foi de 58,00 ( $\pm 7,24$ ) e 52,00 ( $\pm 11,92$ ) para o grupo de pacientes em estádio inicial e avançado, respectivamente. Não houve diferença significativa entre as médias da idade dos grupos,  $p>0,05$ .

Com relação aos fatores de risco para o desenvolvimento de cancer de mama, as maiorias das pacientes eram não fumantes (68,4%), não fizeram uso de terapia de reposição hormonal (TRH) (89,5%), fizeram uso de anticoncepcional em algum momento de sua vida (78,9%), não tiveram filhos antes dos 18 anos (84,2%),

tiveram filhos após os 30 anos (63,1%) e tinham histórico de cancer de mama na família (73,7%). Com relação aos fatores protetores, a maioria delas amamentou suas crianças (78,9%), praticavam o auto-exame (68,4%) e todas elas (100%) tinham realizavam exame de mamografia com frequência após os quarenta anos. Participantes do grupo controle apresentaram um padrão semelhante aos pacientes com câncer de mama em estádio inicial e metastático (Tabela 2).

O teste do qui-quadrado foi feito para determinar a associação entre os fatores de risco/ proteção e o desenvolvimento de câncer de mama, sendo utilizado para este fim dados dos questionários de dezenove mulheres com câncer de mama e quinze voluntárias controle. Neste estudo, encontramos que não há associação entre esses fatores e o desenvolvimento de câncer de mama. Isto é, no presente estudo, a ocorrência do câncer de mama independeu das variáveis analisadas,  $p > 0,05$  (Tabela 2).

Quanto ao grau histológico do tumor, a maioria das pacientes (42,9%) tinha um tumor com grau histológico II de acordo com a classificação estabelecida pela Scarff-Bloom-Richardson (SBR) modificada por Elston e Ellis, seguido de 28,6% que tinham tumor com grau III (tabela 3).

De acordo com a estratificação clínica proposta e recomendada pela Sociedade Americana de Oncologia Clínica e do Colégio Americano de Patologistas, 78,6% dos tumores de mama eram ER positivo, 53,6% eram PR positivo e 71,5% eram HER-2 negativo (Tabela 3).

Assim, os tumores da mama foram classificados em três subtipos de acordo com a sua expressão molecular. A maioria (78,7%) dos carcinomas foi tipo luminal e, destes, 46,5% eram do tipo luminal B. Do restante, 7,1% eram HER-2 positivo e 7,1% basal-like (Tabela 3).

**Tabela 2 - Correlação de câncer de mama com fatores de risco/protetores conhecidos para o desenvolvimento do câncer de mama**

VARIÁVEIS	Câncer de mama		Grupo Controle		Valor de p <sup>#</sup>
	n	frequência (%)	N	frequência (%)	
<b>FATORES DE RISCO</b>					
<b>Tabagismo</b>					
Sim	6	31,6	2	13,3	0,21
Não	13	68,4	13	86,7	
<b>Uso de terapia de reposição hormonal</b>					
Sim	2	10,5	3	20,0	0,44
Não	17	89,5	12	80,0	
<b>Uso de contraceptivo oral anterior aos 12 últimos meses</b>					
Sim	15	78,9	10	66,7	0,42
Não	4	21,1	5	33,3	
<b>Parto antes dos 18</b>					
Sim	3	15,8	1	6,7	0,41
Não	16	84,2	14	93,3	
<b>Parto após os 30</b>					
Sim	12	63,1	8	53,3	0,56
Não	7	36,9	7	46,7	
<b>Histórico de câncer na família</b>					
Sim	14	73,7	12	80,0	0,67
Não	5	26,3	3	20,0	
<b>FATORES PROTETORES</b>					
<b>Amamentação</b>					
Sim	15	78,9	10	66,7	0,42
Não	4	21,1	5	33,3	
<b>Auto-exame das mamas</b>					
Sim	13	68,4	8	53,3	0,37
Não	6	31,6	7	46,7	
<b>Mamografia</b>					
Sim	19	100	15	100	*
Não	-	-	-	-	

\* Não foi computado estatística, pois a variável era constante.

# Nível de significância usando teste qui-quadrado.

**Tabela 3 – Principais características histopatológicas**

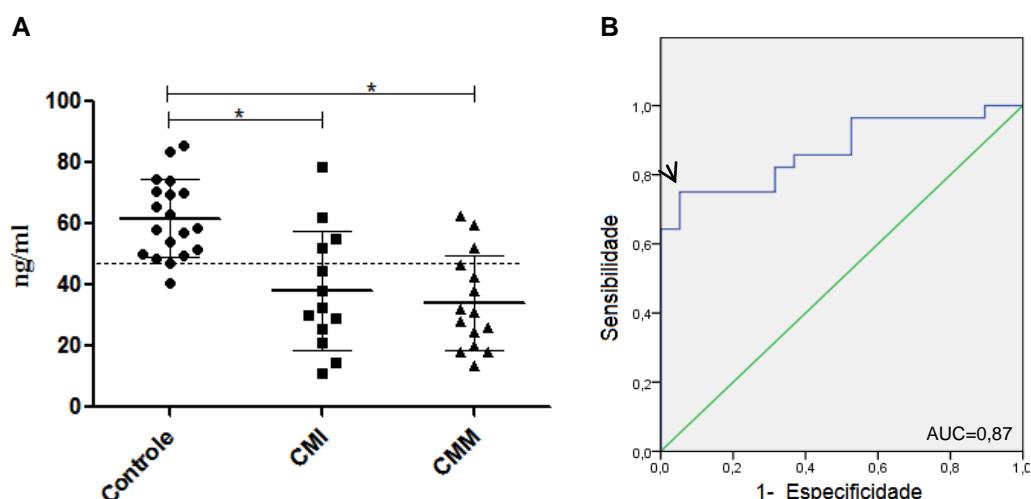
VARIÁVEIS	Número (n)	Frequência (%)
<b>Número de pacientes</b>	28	100
<b>Grau histológico</b>		
I	3	10,7
II	12	42,9
III	8	28,6
Desconhecido	5	17,8
<b>Receptor de estrógeno</b>		
Positivo	22	78,6
Negativo	4	14,3
Desconhecido	2	7,1
<b>Receptor de progesterona</b>		
Positivo	15	53,6
Negativo	11	39,3
Desconhecido	2	7,1
<b>HER-2</b>		
Positivo	6	21,4
Negativo	20	71,5
Desconhecido	2	7,1
<b>Tipo histológico</b>		
Luminal A	5	17,9
Luminal B	13	46,5
Luminal HER-2	4	14,3
HER-2	2	7,1
Basal-like	2	7,1
Desconhecido	2	7,1

## 5.2 Níveis de sEGFR1 estão diminuídos em pacientes com câncer de mama

Análise dos níveis séricos de sEGFR1 por meio de imunoensaios enzimáticos demonstrou que os níveis desta proteína foi significativamente maior no soro do grupo controle em relação aos grupos de pacientes com câncer de mama. A concentração média de EGFR1 em mulheres pertencentes ao grupo controle foi de 61,7 ng/mL ( $\pm$  12,7). Em pacientes com câncer de mama, as concentrações médias encontradas foram de 38,0 ng/mL ( $\pm$  19,7) e 34,2 ng/mL ( $\pm$  15,5) em pacientes do grupo de câncer inicial e metastático, respectivamente. Não foi encontrada diferença estatística significativa entre as concentrações médias de mulheres com câncer de mama inicial e metastático (Fig. 1A).

A partir dos valores individuais obtidos de cada participante de cada grupo foi gerada uma curva ROC utilizando o programa SPSS Statistics versão 17.0 (SPSS Inc., San Diego, Califórnia, USA) para avaliar a capacidade de sEGFR1 em

discriminar indivíduos do grupo controle e pacientes com câncer de mama. Foi encontrada uma área sob a curva (AUC) de 0,87. O valor de *cutoff* para sEGFR1 foi definido em um ponto da curva ROC com uma maior otimização da sensibilidade em detrimento da especificidade. Foi encontrado que a concentração sérica de 46,85 ng/mL de EGFR1 foi capaz de distinguir indivíduos saudáveis e com câncer de mama com 75% de sensibilidade e especificidade de 94,7% (Fig. 1B).



**Fig.1 – Concentração sérica de EGFR1 em pacientes com cancer de mama.** (A) Os níveis séricos de EGFR1 foram significativamente maiores no grupo controle ( $n=19$ ) quando comparado aos grupos de pacientes com câncer de mama em estádio inicial (pT1 ou T2; pN0; pM0,  $n=13$ ) e avançado ( $n=15$ ),  $p<0,0001$ . Não foi encontrada diferença estatística significativa entre as concentrações médias de mulheres com câncer de mama inicial e metastático ( $p>0,05$ ) – Teste estatístico One Way Anova com pós-teste de Tukey. Valores individuais com medias são indicados por uma linha espessa e o desvio padrão (SD) por barras. A linha pontilhada indica o valor de *cutoff* (46,85 ng/mL) definido com base na curva ROC. (B) Cura ROC gerada pelo SPSS Statistics para verificar a capacidade discriminatória de sEGFR1 em discernir grupo controle e pacientes com câncer de mama. Foi encontrada uma área sob a curva (AUC) de 0,87. A seta indica o ponto com maior otimização da sensibilidade em função da especificidade para a definição do *cutoff*. CMI = câncer de mama inicial, CMM = câncer de mama metastático.

Depois de definido o valor de *cutoff*, as participantes foram classificadas em positivo ou negativo para a proteína analisada. A análise de correlação entre câncer de mama e positividade para sEGFR1 mostra que das mulheres positivas para sEGFR1 a 72% eram voluntárias do grupo controle e 28% tinham câncer de mama. Já dentre as negativas para sEGFR1 95,5% eram pacientes com câncer de mama ao passo que apenas 4,5% do grupo controle eram negativas para a proteína em

questão (Tabela 4). A associação entre níveis mais baixos de sEGFR1 e desenvolvimento de câncer de mama foi confirmada pelo teste do qui-quadrado, que com um valor de  $p<0,0001$  demonstra a forte correlação entre a positividade para sEGFR1 e câncer de mama,  $p<0,0001$ .

**Tabela 4 – Correlação entre positividade para as proteínas e câncer de mama**

Variáveis	Câncer de mama			Grupo Controle			Valor de p
	n	% dentro de câncer de mama	% dentro de positividade para a proteína	n	% dentro de câncer de mama	% dentro de positividade para a proteína	
<b>EGFR1</b>							
Negativo	21	75	95,5	1	5,3	4,5	<0,0001
Positivo	7	25	28,0	18	94,7	72,0	
<b>HER-2</b>							
Negativo	5	18,5	25,0	15	78,9	75,0	<0,0001
Positivo	22	81,5	84,6	4	21,1	15,4	
<b>TSP-1*</b>							
Negativo	-	NA	NA	7	36,8	100	0,013
Positivo	13	100	52,0	12	63,2	48,0	

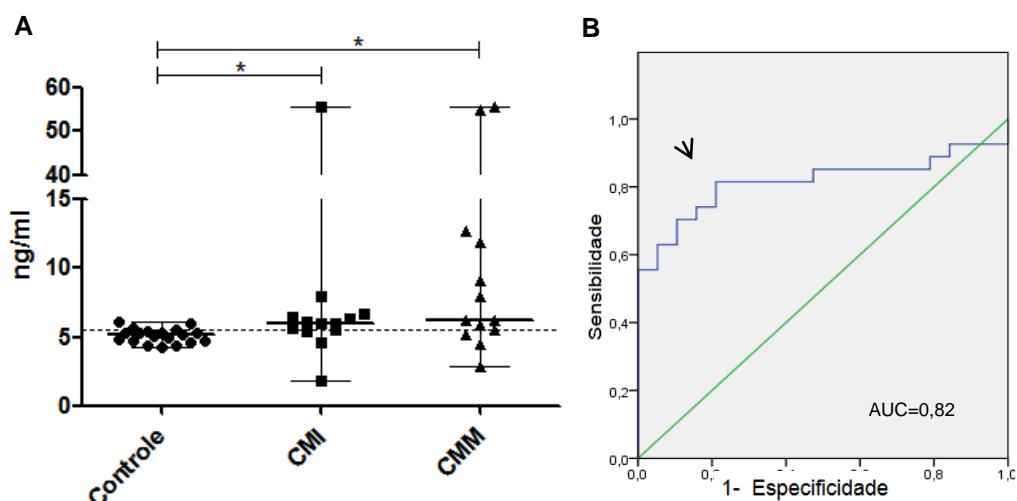
\* Correlação entre voluntários controle e pacientes com câncer inicial. NA = não se aplica.

### 5.3 Níveis de sHER-2 estão aumentados em pacientes com câncer de mama

A mediana de sHER-2 foi encontrada para ser significativamente maior no grupo de pacientes com câncer de mama inicial e metastático quando comparada ao grupo controle. Em pacientes com câncer de mama inicial a mediana foi de 5,99 ng/mL (variando de 1,80 – 55,64) e em pacientes com câncer de mama metastático a mediana foi de 6,18 ng/mL (variando de 2,91 – 55,57). No grupo controle a mediana de sHER-2 foi encontrada ser 5,13 ng/mL (variando de 4,21 – 6,11). Não foi encontrada diferença estatisticamente significante entre as medianas de sHER-2 em soro de pacientes com câncer inicial e metastático (Fig. 2A).

A partir dos valores individuais obtidos de cada participante de cada grupo foi gerada uma curva ROC utilizando o programa SPSS Statistics versão 17.0 (SPSS Inc., San Diego, Califórnia, USA) para avaliar a capacidade de sHER-2 em

discriminar indivíduos do grupo controle e pacientes com câncer de mama. Foi encontrada uma área sob a curva (AUC) de 0,82. O valor de *cutoff* para sHER-2 foi definido em um ponto da curva ROC com uma maior otimização da sensibilidade em detrimento da especificidade. Foi encontrado que o valor de *cutoff* definido de 5,38 ng/mL de s-HER-2 foi capaz de distinguir indivíduos saudáveis e com câncer de mama com 81,5% de sensibilidade e especificidade de 78,9% (Fig. 2B).



**Fig.2 – Concentração sérica de HER-2 em pacientes com cancer de mama.** (A) Os níveis séricos de HER-2 foram significativamente maiores no grupo de pacientes com câncer de mama em estádio inicial (pT1 ou T2; pN0; pM0, n=13) e avançado (n=15) quando comparado ao grupo de voluntárias controles (n=19),  $p<0,05$ . Não foi encontrada diferença estatística significativa entre as concentrações medianas de mulheres com câncer de mama inicial e metastático ( $p>0,05$ ) – Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. Valores individuais com medianas são indicados por uma linha espessa e a variação por barras. A linha pontilhada indica o valor de *cutoff* (5,38 ng/mL) definido com base na curva ROC. (B) Cura ROC gerada pelo SPSS Statistics para verificar a capacidade discriminatória de sEGFR1 em discernir grupo controle e pacientes com câncer de mama. Foi encontrado uma área sob a curva (AUC) de 0,815. A seta indica o ponto com maior otimização da sensibilidade em função da especificidade para a definição do *cutoff*. CMI = câncer de mama inicial, CMM = câncer de mama metastático.

Depois de definido o valor de *cutoff*, as participantes da pesquisa foram classificados em positivo ou negativo para sHER-2. De 46 mulheres, 20 eram sHER-2 negativas e 26 positivas. Entre as mulheres negativas para sHER-2, a maioria deles (75%) pertenciam ao grupo controle, enquanto a maioria (84,6%) das mulheres positivas tinham câncer de mama. A associação entre níveis mais altos de sHER-2 níveis e desenvolvimento de câncer de mama foi confirmada pelo teste do qui-

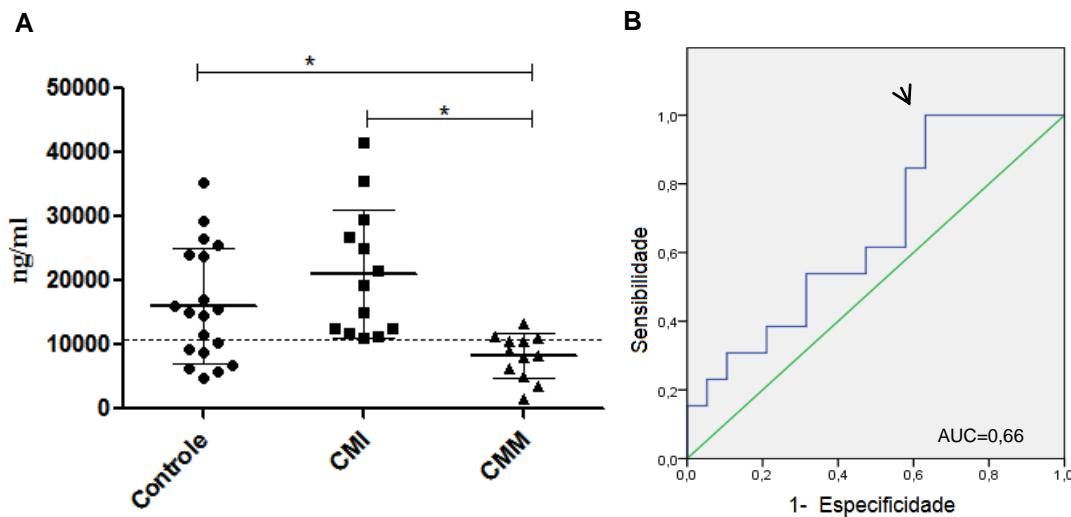
quadrado, que com um valor de  $p<0,0001$  demonstrou uma forte correlação entre a positividade para sHER-2 e câncer de mama,  $p<0,0001$ .

#### **5.4 Níveis séricos de TSP-1 estão diminuídos em pacientes com câncer de mama metastático**

Com relação à TSP-1, pacientes com câncer de mama metastático tiveram menor concentração em comparação ao grupo controle e pacientes com câncer de mama inicial. A concentração média de TSP-1 no soro de pacientes com câncer metastático foi de 8.204 ng/mL ( $\pm 3.486$ ). Em pacientes com câncer de mama inicial e voluntárias do grupo controle a média foi de 21.010 ng/mL ( $\pm 10.059$ ) e 16.130 ng/mL ( $\pm 8.971$ ) (Fig. 3A).

A capacidade discriminatória de TSP-1 em distinguir voluntárias do grupo controle e pacientes com câncer de mama foi avaliada por meio da curva ROC. Foi encontrado que a concentração sérica de TSP-1 não foi capaz de discriminar indivíduos pertencentes aos grupos em questão, uma vez que foi encontrada uma AUC de 0,45 (dados não mostrados).

Então, outra análise foi realizada. Desta vez foi testado se os níveis de TSP-1 era capaz de distinguir pacientes com câncer de mama inicial e voluntárias do grupo controle. Foi encontrada uma AUC de 0,66. O valor de *cutoff* para TSP-1 foi definido em um ponto da curva ROC com uma maior otimização da sensibilidade em detrimento da especificidade, sendo que o valor de *cutoff* definido de 10.643,14 ng/mL de TSP-1 foi capaz de distinguir indivíduos saudáveis e com câncer de mama com 100% de sensibilidade e especificidade de 36,8% (Fig. 3B).

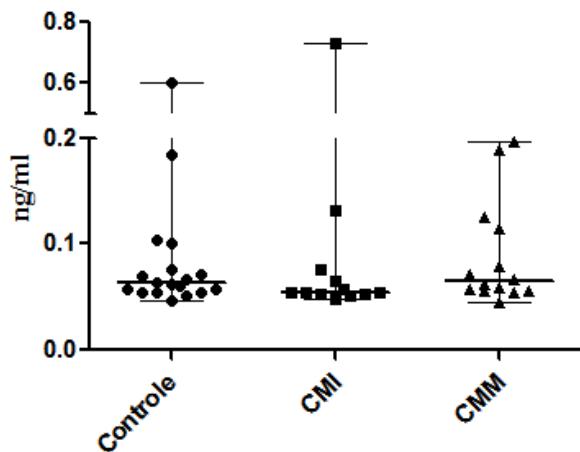


**Fig.3 – Concentração sérica de TSP-1 em pacientes com cancer de mama.** (A) Os níveis séricos de TSP-1 foram significativamente menores no grupo de pacientes com câncer de mama avançado ( $n=12$ ) quando comparado ao grupo de voluntárias controles ( $n=19$ ) e (pT1 ou T2; pN0; pM0,  $n=13$ ),  $p<0,001$ . Não foi encontrada diferença estatística significativa entre as concentrações médias de mulheres com câncer de mama inicial e grupo controle ( $p>0,05$ ) – Teste One Way ANOVA, pós-teste de Tukey. Valores individuais com médias são indicados por uma linha espessa e o desvio padrão por barras. A linha pontilhada indica o valor de *cutoff* (10.643,14 ng/mL) definido com base na curva ROC. (B) Cura ROC gerada pelo SPSS Statistics para verificar a capacidade discriminatória dos níveis séricos de TSP-1 em discernir grupo controle e pacientes com câncer de mama inicial. Foi encontrado uma área sob a curva (AUC) de 0,66. A seta indica o ponto com maior otimização da sensibilidade em função da especificidade para a definição do *cutoff*. CMI = câncer de mama inicial, CMM = câncer de mama metastático.

Após a definição do valor de *cutoff*, os indivíduos foram classificados em positivo ou negativo para TSP-1. A análise de correlação entre câncer de mama inicial e positividade para TSP-1 mostra que dentre as participantes consideradas negativo para TSP-1 todas (100%) eram pertencentes ao grupo controle, enquanto que dentre os positivos, 52% tinham câncer de mama em estádio inicial e o restante (48%) eram voluntárias do grupo controle. A correlação entre a positividade para TSP-1 e desenvolvimento inicial do câncer de mama foi verificada pelo teste do qui-quadrado. O teste mostrou que existe uma correlação entre positividade para TSP-1 e o câncer de mama inicial,  $p<0,05$ .

## 5.5 Níveis séricos de RANKL não alteraram entre os grupos

Em relação concentração sérica de RANKL, não houve diferença estatística entre os grupos. A mediana de RANKL foi de 0,06 nos três grupos. No grupo de voluntárias controle a variação foi de 0,05 a 0,60 ng/ml, em pacientes com câncer de mama a variação foi de 0,05 a 0,73 e 0,05 a 0,20 em pacientes com câncer de mama inicial e avançado, respectivamente (Fig. 4).

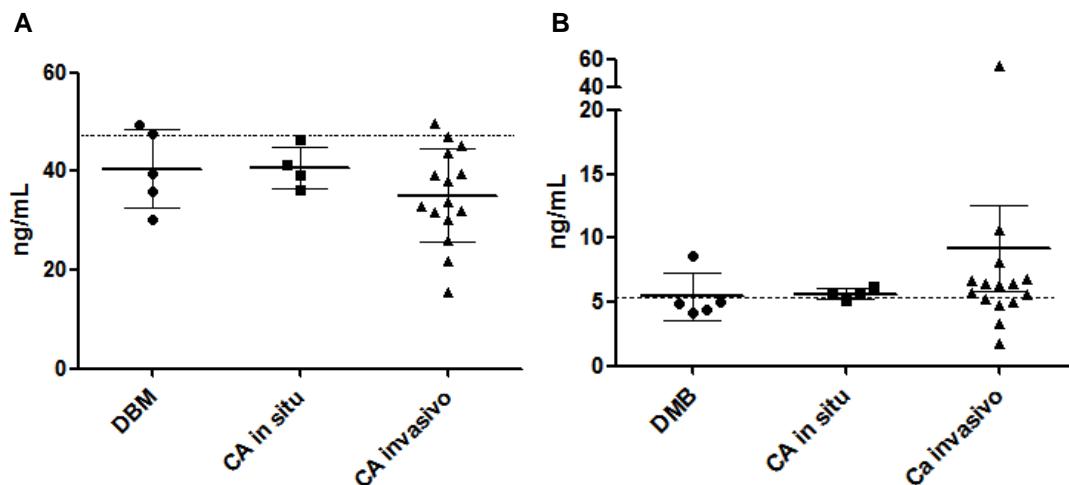


**Fig.4 – Concentração sérica de RANKL em pacientes com cancer de mama.** Não houve diferença estatística significativa entre a mediana de RANKL no soro de voluntárias controle (n=13) e pacientes com câncer de mama inicial (n=13) e metastático (n=14),  $p>0,05$  – Teste Kruskal-Wallis, pós-teste de Dunn. Valores individuais com medianas são indicados por uma linha espessa e a variação por barras

## 5.6 Avaliação dos níveis de sEGFR1 e sHER-2 em um grupo de pacientes com câncer de mama primário e doença benigna da mama

Análise dos níveis séricos de sEGFR1 e sHER-2 foram realizadas em um grupo de vinte e quatro pacientes antes do procedimento cirúrgico para se verificar o VPP, VPN e acurácia dos valores de cutoff definidos para cada teste. A figura 5

indica os valores das concentrações de sEGFR1 (Fig. 5A) e HER-2 (Fig. 5B) encontrados nessa população.



**Fig.5 – Concentração sérica de EGFR e HER-2 um grupo de pacientes com câncer de mama e doença benigna da mama.** (A) Concentração de sEGFR1 em pacientes com câncer de mama e doença benigna da mama (n=24). A maioria das pacientes suspeitas para a doença (negativas para sEGFR1) foram corretamente classificadas. (B) Concentração de sHER-2 em pacientes com câncer de mama e doença benigna da mama (n=24). A maioria das pacientes suspeitas para a doença foram corretamente classificadas pelo teste. A linha pontilhada indica os valores de cutoff definidos anteriormente para os níveis de sEGFR1 (46,85 ng/mL) e sHER-2 (5,38 ng/mL).DBM = doença benigna da mama, CA = carcinoma.

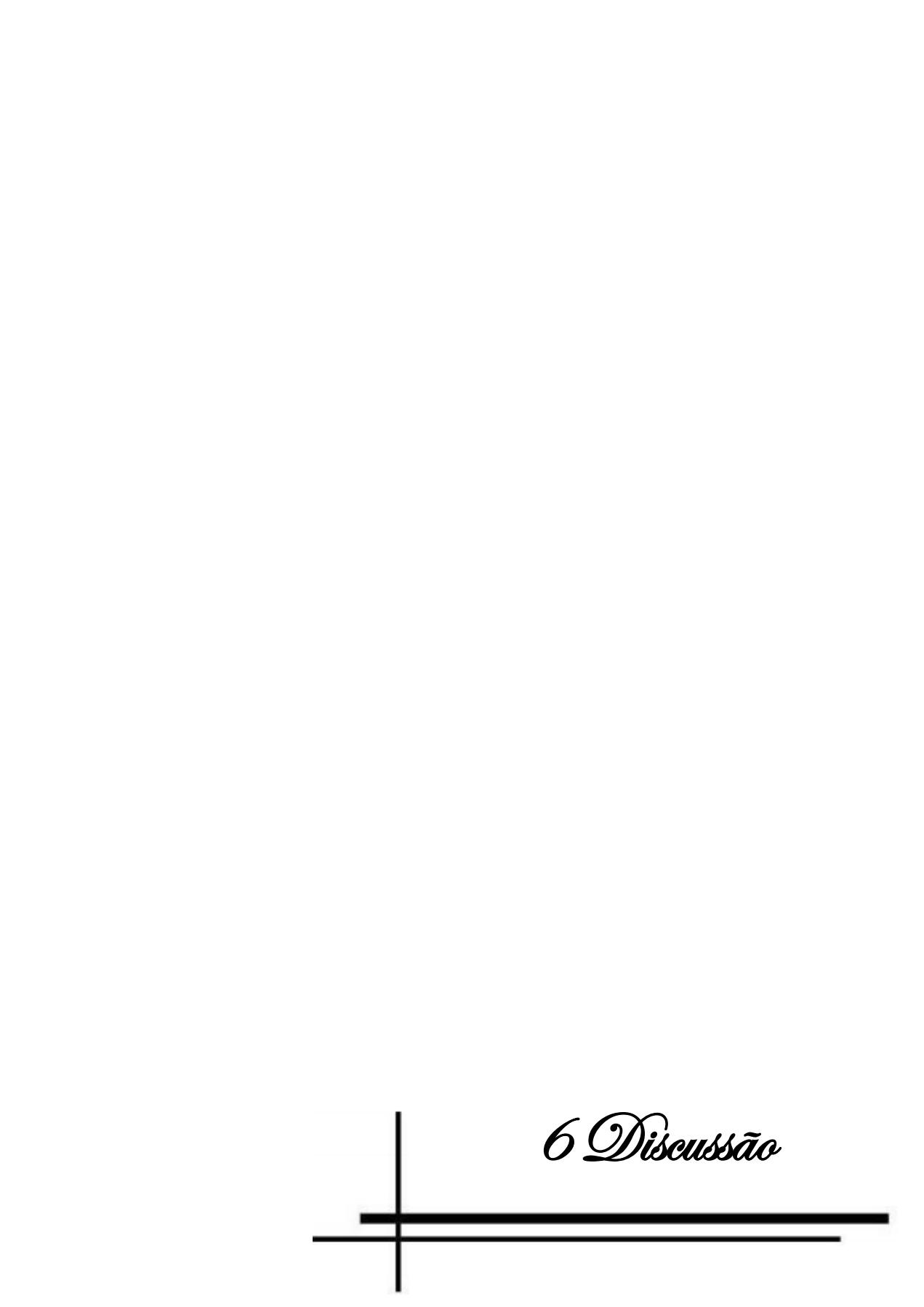
O teste de sEGFR1, admitindo-se o valor de *cutoff* de 46,85 ng/mL foi capaz de identificar corretamente dezoito pacientes com câncer de mama (verdadeiro-positivo) e duas sem a doença (verdadeiro-negativo), ao passo que identificou de forma errada quatro pacientes, uma como sendo falso-negativa e três falso-positiva (Tabela 5).

Com relação ao teste de sHER-2 o valor de *cutoff* de 5,38 ng/mL identificou de forma correta dezessete pacientes, sendo treze verdadeiro-positivas e quatro verdadeiro-negativas, no entanto, identificou erroneamente quatro pacientes, sendo uma como falso-positiva e seis falso-negativas (Tabela 5).

**Tabela 5 – Índices de avaliação do teste sorológico sEGFR1 e sHER-2**

EGFR1	Câncer de mama		HER-2	Câncer de mama	
	Sim	Não		Sim	Não
<b>Negativo</b>	18 (Verdadeiro-positivo)	3 (Falso-positivo)	<b>Positivo</b>	13 (Verdadeiro-positivo)	1 (Falso-positivo)
<b>Positivo</b>	1 (Falso-negativo)	2 (Verdadeiro-negativo)	<b>Negativo</b>	6 (Falso-negativo)	4 (Verdadeiro-negativo)

Para avaliar as qualidades dos testes foram calculados os parâmetros de VPP, VPN e acurácia. Para o teste de sEGFR1 foi encontrado um VPP de 85,71%, VPN de 66,7% e uma concordância com o exame diagnóstico de certeza de 83,33%. Ao passo que a dosagem de sHER-2, utilizando um valor de *cutoff* de 5,38 ng/mL apresentou um VPP de 92,86%, VPN de 40% e uma acurácia de 70,83%.



## *6 Discussão*

A compreensão dos processos fisiológicos que acometem o organismo durante o desenvolvimento dos tumores de mama é de grande interesse à comunidade científica em geral. Somente conhecendo a biopatologia deste tipo de câncer que se torna possível o desenvolvimento de ferramentas diagnósticas, terapêuticas e para predição de prognóstico da doença.

Atualmente, dado à elevada incidência e mortalidade por câncer de mama, há um grande interesse por parte da comunidade científica em se desenvolver testes para a detecção precoce desta neoplasia a fim de aumentar a sobrevida destas mulheres. A possibilidade da dosagem de proteínas séricas que poderiam estar alteradas na presença da neoplasia surgiu como uma opção bastante atrativa para este fim por ser um procedimento pouco invasivo, de baixo custo, e ainda possibilitar o acompanhamento por meio de coletas periódicas. No entanto, essa proteína ainda não foi encontrada e ainda há a necessidade do estabelecimento de um marcador confiável que possa ser utilizado na prática clínica para esta finalidade.

Assim, o propósito inicial desta pesquisa foi avaliar as concentrações séricas, de quatro proteínas em vinte e oito pacientes com câncer de mama inicial e avançado.

Neste estudo, dentre as pacientes metastáticas a maioria tinha metástase principalmente para pulmão, fígado, osso e sistema nervoso central. Este achado é concordante com os sítios metastáticos encontrados em 2.147 casos de carcinomas de mama autopsiados. Lee relata que no momento da autópsia aproximadamente 85% das pacientes tinham envolvimento de tecido ósseo, pulmonar ou hepático (LEE, Y. T., 1983), o que também vai de encontro à incidência encontrada em nosso estudo.

Em tumores de mama, é bem estabelecido a avaliação de rotina da expressão de ER, PR e HER-2 como fatores prognósticos. Estudo envolvendo cerca de seis mil mulheres com câncer de mama invasivo demonstrou que destas em torno de 75% superexpressavam receptor de estrógeno e que o receptor de progesterona estava superexpresso em 55% dos casos (NADJI et al., 2005). Em nosso estudo encontramos perfil de expressão semelhante. Com relação à expressão de HER-2, alguns grandes estudos também corroboraram com os nossos achados, têm se demonstrado uma superexpressão dessa proteína em cerca de 18-

20% dos cânceres de mama (OWENS et al., 2004; YAZIJI et al., 2004). De acordo com a expressão dos receptores acima mencionados os tumores foram classificados em subtipos histológicos. Neste estudo, a maioria dos tumores era do tipo luminal, neste ponto nosso estudo é concordante com um trabalho envolvendo 10.159 mulheres com câncer de mama, onde 78% destes eram do tipo luminal e apenas 6% do subtipo HER-2 (BLOWS et al., 2010).

Sobre o estudo dos marcadores séricos pela técnica de imunoensaio enzimático (ELISA), é importante ressaltar que os estudos utilizando esta técnica podem produzir resultados diferentes por causa de certas particularidades, como por exemplo, anticorpos reagentes, diluição da amostra, unidades de mensuração e, até mesmo devido às características de cada população.

O sEGFR1 é amplamente estudado em medicina humana desde a década de 80. Vários estudos têm correlacionado valores de sEGFR1 com progressão, tratamento e prognóstico para o câncer de mama, no entanto os resultados são bastante contraditórios.

No presente estudo os resultados evidenciaram diferença estatística significativa entre os níveis de sEGFR1 em voluntárias do grupo controle e pacientes com câncer de mama (inicial e metastático), sugerindo que baixos níveis desta proteína está intimamente relacionado com a presença desta neoplasia.

Alguns estudos corroboram com os nossos achados. Asgeirsson *et al.* em seu trabalho encontrou níveis mais elevados de sEGFR1 em indivíduos saudáveis (mediana de 75,3 ng/mL, intervalo de 43,2-114,2 ng/mL) quando comparado com pacientes com cancer de mama primário (mediana de 59,3 ng/mL, intervalo de 21,3-94,1 ng/mL). Além disso, em amostras de soro pareadas, sEGFR1 diminuiu de forma significativa entre o tempo de diagnóstico primário (mediana de 56,3 ng/mL, intervalo 29,1-142,7 ng / mL) e o diagnóstico metastático (mediana de 30,9 ng/mL, intervalo de 10,9-106,4 ng/mL), indicando uma diminuição dos níveis de sEGFR1 durante a progressão tumoral (ASGEIRSSON et al., 2007).

Embora em nosso estudo não foi encontrado diferença estatística significativa entre o grupo inicial e metastático, os níveis EGFR1 teve uma discreta tendência a

diminuir com a progressão da doença, da neoplasia em sua fase inicial à presença de metástase.

Outro trabalho corrobora com nossos resultados, mostrando a correlação entre níveis mais baixos sEGFR1 com um desfecho ruim. Rocca *et al.* observou que a diminuição dos níveis de sEGFR1 em pacientes com câncer de mama inicial após a cirurgia está correlacionado com mau prognóstico e menor sobrevida livre de doença. Por meio de análise multivariada, eles demonstraram que a cada 1 ng/mL de diminuição foi associada com um aumento do risco de eventos (metástase à distância, recidiva local e regional e morte) de 15% (ROCCA et al., 2009).

Em uma tentativa de definir valores de *cutoff* para discriminar prognóstico bom ou ruim, importantes estudos quantificaram os níveis de sEGFR1 em pacientes com câncer de mama. Muller *et al.* encontraram que a concentração mediana de sEGFR1 no grupo controle foi de 60,31 ng/mL (intervalo de 41,63-76,46 ng/mL) e eram acima de 45 ng/mL em todas, exceto uma paciente. A mediana de sEGFR1 encontrada em pacientes metastáticas foi de 51,78 ng/mL (intervalo de 32-112,72 ng/mL), abrangendo o mesmo intervalo do grupo controle. No entanto, um percentual maior de pacientes com câncer de mama (15%) apresentaram diminuição na concentração de sEGFR1 (<45 ng/mL). Eles definiram que um valor de *cutoff* de 44ng/mL foi associado com o melhor nível de discriminação. Além disso, eles correlacionaram níveis mais baixos de sEGFR1 com menor sobrevida (MULLER et al., 2006).

Outro importante estudo que incluiu 117 indivíduos saudáveis e 535 pacientes com câncer de mama metastático observou que indivíduos do grupo controle tiveram níveis de sEGFR1 de 64,1 ( $\pm$  13.3ng/mL), e, quando definido um valor de *cutoff* de 44.1 ng/mL, 53 da 535 pacientes tinham níveis diminuídos de sEGFR1 e também, uma sobrevida significativamente reduzida em comparação com os pacientes que tinham níveis normais de sEGFR1(SOUDER et al., 2006).

De encontro aos nossos objetivos, apenas o trabalho de Asgeirsson *et al.* mensuraram os níveis de sEGFR1 em pacientes com câncer de mama primário, em comparação com voluntários saudáveis (trabalho mencionado acima) (ASGEIRSSON et al., 2007). No entanto, eles não assumem um valor de *cutoff* para discriminar indivíduos saudáveis e com câncer de mama.

Portanto, o nosso trabalho trás de forma inédita a definição de um valor de *cutoff* (46,85 ng/mL) para distinguir entre indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de mama com uma boa sensibilidade e alta especificidade. Surpreendentemente, o *cutoff* encontrado em nosso estudo é bem próximo do valor definido por alguns autores, indicando que os níveis de sEGFR1 não só pode ser útil para a predição de prognóstico, como já mencionado, mas também para discriminar entre indivíduos saudáveis e com câncer de mama.

Ainda, Sandri *et al.* indicaram uma relevância biológica e potencial aplicação clínica de sEGFR1 em pacientes com câncer metastático. Eles encontraram que níveis de sEGFR1 estavam associados com redução da resposta à quimioterapia metronômica (SANDRI *et al.*, 2007).

Em conjunto estes dados apontam para uma diminuição dos níveis de sEGFR1 durante à progressão tumoral e uma estreita correlação com pior prognóstico e diminuição da resposta à quimioterapia.

Embora o papel fisiológico de sEGFR1 *in vivo* permaneça obscuro, dados apontam para uma função fisiológica contrária à exercida por sua forma membranar, que quando superexpressa é associada à um prognóstico ruim (QUINTELA *et al.*, 2005).

Lemmon *et al.* demonstraram que sEGFR1 possui seu sítio de ligação intacto, podendo se ligar ao EGF (LEMMON *et al.*, 1997) e formar dímeros inativos com EGFR1 ancorado à membrana, resultando em diminuição da ativação e transdução de sinal (KASHLES *et al.*, 1991).

Outro relato da possível função de sEGFR1 sugere que esta proteína pode inibir a função do EGFR1 ancorado à membrana. Basu *et al.* relataram que em células A431 a forma solúvel truncada de EGFR1 pode inibir a atividade do EGFR1 pela ligação ao EGF. Neste experimento *in vitro*, essa inibição não pareceu ser resultado da competição pela ligação ao EGF, mas parece resultar da interação de sEGFR1 com o receptor ancorado à membrana (BASU *et al.*, 1989).

Estes dados suportam a hipótese de a forma truncada de EGFR1 (sEGFR1) atua como antagonista da função do receptor ancorado à membrana, e que a

diminuição dos níveis de sEGFR1 estariam implicadas em uma desregulação da sinalização via EGFR1, que contribui para a progressão tumoral.

Em relação aos dados conflitantes (ARTEAGA, 2003; OH et al., 2000), provavelmente, pode ser devido a diferenças metodológicas como já mencionado. A principal diferença é com relação à diluição da amostra, vários estudos não realizaram, ou não reportaram a diluição da amostra antes da realização do imunoensaio. Neste trabalho nós experimentamos uma situação semelhante utilizando baixas diluições séricas, onde voluntárias do grupo controle tinham níveis mais baixos de EGFR1 comparado à pacientes com câncer de mama (dados não mostrados). Mas este cenário se inverteu ao realizar uma maior diluição (1:50).

No entanto, a maioria dos trabalhos (ASGEIRSSON et al., 2007; MULLER et al., 2006; SANDRI et al., 2007) mostra uma relação entre menores níveis de sEGFR1 e um prognóstico reservado. Nesse sentido, os nossos resultados estão em conformidade com a literatura. Nós observamos menores níveis sEGFR1 em pacientes metastáticos em comparação com pacientes com câncer de mama inicial (não estatisticamente significativos), e fomos capazes de distinguir entre saudáveis e não saudáveis com alta precisão. Mais estudos devem ser realizados para validar sEGFR1 como um biomarcador para detecção precoce do câncer de mama.

Outro receptor que tem sido extensivamente estudado é o HER-2. A sinalização via esse receptor está envolvida diretamente na regulação de diferentes processos celulares, incluindo proliferação, diferenciação, migração e sobrevivência (RUBIN, I.; YARDEN, 2001). Hoje, é um consenso que esse receptor é clinicamente útil para a predição do prognóstico de mulheres com câncer de mama (LEE, S. B. et al., 2014; SHAO et al., 2014; TAN et al., 2011).

Alguns estudos comprovaram haver uma correlação positiva entre os níveis do receptor no tecido tumoral e os níveis de sHER-2 (DI GIOIA et al., 2014; FARZADNIA et al., 2010; TAN et al., 2011). Desde então, vários grupos de pesquisa têm investigado os níveis de sHER-2.

Um grupo de pesquisadores chineses recrutou 190 pacientes com câncer de mama metastático e descobriu que, quando estabelecido um *cutoff* de 15 ng/mL, a sobrevida de longo prazo foi reduzida em pacientes com níveis de sHER-2 acima

deste valor quando comparado à sobrevida de pacientes com níveis mais baixos. Além disso, níveis mais elevados de sHer2 se correlacionou com falha da terapia com Herceptin (SHAO et al., 2014).

Um grande estudo de pesquisadores Sul-Coreanos, envolvendo 2.862 pacientes, encontraram que os pacientes com níveis de sHER-2 acima 15,2 ng/mL tiveram variáveis clínico-patológicas agressivas, pior sobrevida livre de metástase à distância e menor sobrevida. No entanto, a relação de maior impacto entre os níveis sHER-2 e prognóstico foram em pacientes com câncer de mama que superexpressavam HER-2 (LEE, S. B. et al., 2014). Outros trabalhos corroboram com os achados acima mencionadas (níveis mais elevados de sHER-2 correlacionado com pior prognóstico) (ASGEIRSSON et al., 2007; MULLER et al., 2006; SANDRI et al., 2007).

No presente estudo os resultados evidenciaram diferença estatística significativa entre os níveis de sHER-2 em voluntárias do grupo controle e pacientes com câncer de mama (inicial e metastático), sugerindo que aumentos dos níveis desta proteína está intimamente relacionado com a presença desta neoplasia. Foi ainda encontrado que um valor de *cutoff* de 5,38 ng/mL era capaz de distinguir pacientes com câncer de mama de voluntárias do grupo controle com uma boa sensibilidade e especificidade.

Em uma tentativa de definir valores de *cutoff* para discriminar entre indivíduos saudáveis e pacientes com câncer de mama, importantes estudos quantificaram os níveis de sHER-2 em pacientes com câncer de mama inicial. Um estudo de pesquisadores croatas envolvendo 41 mulheres com câncer de mama inicial encontraram que um valor de *cutoff* de 7,7 ng/mL era capaz de distinguir entre pacientes com câncer de mama inicial e grupo controle com uma sensibilidade de 76,92% e 72,92% de especificidade (BADZEK et al., 2011). Ainda, outro estudo envolvendo 232 mulheres chinesas encontrou um valor de *cutoff* parecido (7,4 ng/mL), para a mesma finalidade, o teste demonstrou uma sensibilidade de 62,9% e 85,3% (MA et al., 2012).

Portanto, o valor de *cutoff* encontrado em nosso estudo está em conformidade com os dados da literatura. Nesse sentido, temos que baixos valores de *cutoff* são

admitidos para a finalidade de se distinguir entre pacientes com câncer de mama e indivíduos do grupo controle.

Ainda, alguns estudos trazem uma luz acerca dos mecanismos para se compreender o papel fisiológico desempenhado pelo sHER-2 no câncer de mama. Sabe-se que a clivagem do domínio extracelular (ECD) de moléculas HER-2 ancoradas à membrana é associado com um receptor intracelular truncado de 95 kDa (p95HER2), que é constitutivamente ativado (TSE et al., 2012). Há fortes indícios de que a clivagem do ECD de HER-2 pode ser responsável pelo prognóstico ruim de pacientes com câncer de mama que superexpressam esta proteína, embora ainda não tenha sido associado se os níveis de p95HER2 em tumores de mama estão correlacionados diretamente aos níveis de sHER-2. Segatto *et al.* através de experimentos *in vitro* com células geneticamente modificadas para expressar p95HER2, demonstraram que essa proteína truncada tinham um aumento significativo em sua atividade tirosina cinase e foi capaz de aumentar de 10 a 100 vezes mais a transformação celular em comparação com o receptor íntegro (SEGATTO et al., 1988).

No geral, estes dados suportam a hipótese de níveis maiores de sHER-2 estariam correlacionados com maior quantidade da forma truncada p95HER2, que por sua vez seria um dos fatores responsáveis para a progressão tumoral e pior prognóstico observado nestas pacientes.

Com relação à TSP-1, ainda nenhum estudo investigou os níveis séricos desta proteína como um possível biomarcador para detecção precoce do câncer de mama. Provavelmente, devido a sua característica inerente que é a sua expressão no tecido tumoral, agindo como um ligante para a migração celular e um indutor da formação de vasos sanguíneos (WANG et al., 1996).

No entanto, Lu *et al.* encontraram que os níveis de TSP-1 pode discriminar o câncer de próstata, hiperplasia prostática benigna e controles saudáveis melhor do que o PSA, um biomarcador bem estabelecido para o câncer de próstata (AUC de 0,886 para TSP-1 e 0,719 para a PSA). No estudo eles descobriram que pacientes com câncer de próstata têm níveis mais baixos de TSP-1 em comparação com a hiperplasia benigna da próstata, que, por sua vez, possuem níveis mais baixos de TSP-1 em comparação com controles saudáveis ( $200 \pm 49 \mu\text{g/L}$ ,  $281 \pm 53 \mu\text{g/L}$ , 323

± 56 µg/L, respectivamente)(LU et al., 2013). Então, TSP-1 deveria ser mais explorada para verificar o seu papel de TSP-1 como um potencial biomarcador no câncer de mama.

Apenas um trabalho destacou TSP-1 como um potencial biomarcador no câncer de mama. Suh et al. encontram que os níveis de TSP-1 são 5 vezes maior em pacientes com câncer de mama em comparação com controles saudáveis e que esses níveis foram capazes de distinguir pacientes saudáveis de pacientes com câncer. Os resultados foram uma AUC de 0,875 (sensibilidade = 100%, e especificidade de 63,3%) (SUH et al., 2012). Entretanto, eles não discriminaram o estágio do câncer de mama (inicial ou metastático) e fizeram as análises por de espectrometria de massa e *western blot*, diferente do método utilizado por nós.

Nossos resultados são incapazes de distinguir claramente indivíduos controles e pacientes com câncer de mama, como indicado pela curva ROC (AUC (0,655; sensibilidade = 100% e especificidade = 36,8%), que estava abaixo da faixa de acurácia moderada ( $0,7 < \text{AUC} \leq 0,9$ ). No entanto, mostram um viés, principalmente no grupo metastático, que tiveram os níveis de TSP-1 no soro inferior ao grupo controle e pacientes com doença metastática. Assim, embora os resultados não são conclusivos, encontramos uma tendência de aumento dos níveis de TSP-1 em pacientes com câncer de mama inicial (estatisticamente não significativa) e uma diminuição em pacientes com câncer de mama metastático em relação ao controle e pacientes iniciais (estatisticamente significante). Sendo assim, o TSP-1 teve uma variação aleatória entre os grupos, diferente daquela observada no sEGFR1 e sHER-2.

O eixo de sinalização RANK/RANKL é importante para o desenvolvimento do epitélio e glândula mamária e também desempenha um papel importante na iniciação do câncer de mama e em metástases. Este eixo é essencial na iniciação do câncer de mama *in vivo* e para promover a iniciação tumoral, progressão e metástase em linhagem de células não-transformadas em um modelo de cultura 3D (GONZALEZ-SUAREZ et al., 2010; PALAFOX et al., 2012).

Com base nisso, nós investigamos os níveis séricos de RANKL para distinguir controles saudáveis e pacientes com câncer de mama inicial de metastático. Nós esperávamos maiores níveis de sRANKL em pacientes com câncer inicial e

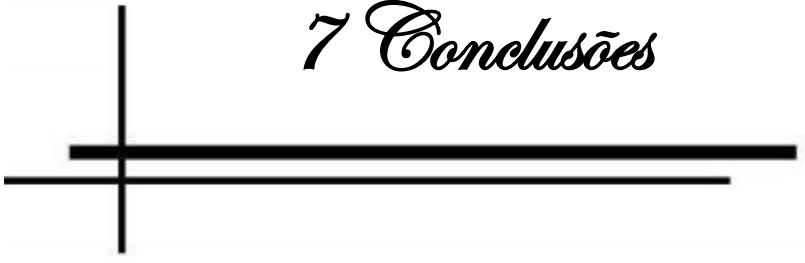
metastático, mas não encontramos nenhuma diferença em relação ao grupo controle.

Alguns trabalhos mostraram que os níveis de RANKL alteram em várias patologias com perdas ósseas, incluindo a osteólise desencadeada pelo tumor (CROTTI et al., 2003; FARRUGIA et al., 2003; GRIMAUD et al., 2003; HAYNES et al., 2001). Mountzios et al. em seu estudo demonstrou que pacientes metastáticos com perda óssea têm níveis mais elevados de sRANKL ( $1.949 \pm SD$  pmol/L) em comparação com indivíduos saudáveis ( $0,93 \pm SD$  pmol/L) (MOUNTZIOS et al., 2007).

Em nosso estudo, a maioria das pacientes apresentava metástases para tecidos moles, o que significa que a osteólise não estava envolvida. Talvez os níveis sRANKL não variaram entre os grupos, já que poucas pacientes de fato apresentava metástase óssea. Portanto, neste estudo não houve associação entre a variação dos níveis de RANKL com metástases de tecidos moles.

Até o presente momento, não há nenhum trabalho disponível com o objetivo de definir os níveis sRANKL como um biomarcador para detecção precoce do câncer de mama. Neste trabalho não conseguimos encontrar nenhuma diferença entre os grupos de pacientes com câncer de mama e metastático.

Como visto em nossos resultados, em todos os três grupos, há alguns pontos isolados distanciados da mediana de sRANKL, esses pacientes devem ser o objetivo de trabalhos posteriores.

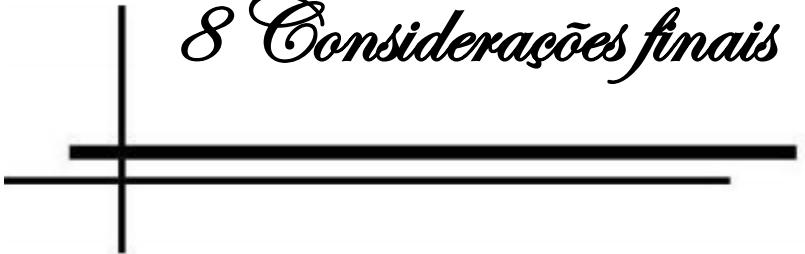


## *7 Conclusões*

Baseados nos resultados obtidos neste trabalho, conclui-se que:

- Os níveis séricos de EGFR1 e HER-2 estão alterados em pacientes com câncer de mama em estádio inicial e metastático comparado com o grupo controle.
- O *cutoff* definido para sEGFR1 e sHER-2 foi capaz de distinguir pacientes com câncer de mama e pacientes saudáveis.
- Pacientes com câncer de mama metastático apresentam baixos níveis de TSP-1.
- Não há diferença entre os níveis de sRANKL entre os grupos de pacientes com câncer e controle.
- Os níveis de sEGFR1 e sHER-2 devem ser investigados em ensaios clínicos com tamanho amostral significativo na tentativa de se validar estas proteínas como potenciais biomarcadores para a detecção precoce do câncer de mama.

## *8 Considerações finais*



No que diz respeito aos métodos de detecção precoce do câncer de mama, o que se espera é um biomarcador ou técnica suficientemente específica e sensível para detectar a existência de uma neoplasia no seu início, onde as chances de cura após o tratamento são altas. A possibilidade da dosagem de proteínas séricas que possam estar alteradas durante o desenvolvimento do câncer de mama tem parecido bem atrativa, por ser um procedimento pouco invasivo, relativamente prático, financeiramente viável e ainda, possibilitar o acompanhamento da paciente com a realização de coletas periódicas.

No presente trabalho, o achado mais importante observado foi que os níveis de duas proteínas séricas, HER-2 e EGFR1, tiveram uma forte correlação com a presença da neoplasia de mama, sendo úteis para discriminá-la com alta sensibilidade e especificidade voluntárias saudáveis de pacientes com câncer de mama.

No futuro, temos como propósito dar continuidade ao trabalho: aumentar o número amostral e acompanhar estas pacientes com câncer de mama desde o momento pré-cirúrgico até um período de dois anos, com coletas periódicas, a fim de entender melhor a dinâmica de variação destas proteínas nessas pacientes diante da evolução tumoral.

Sendo que a possibilidade de obter informações relevantes referente ao estado destas pacientes frente ao câncer de mama, com apenas coleta de sangue, oferece uma abordagem atraente para ser implementada como parte de um teste de diagnóstico de rotina.



*Referências*

ALBAIN, K. S.; ALLRED, D. C.; CLARK, G. M. Breast cancer outcome and predictors of outcome: are there age differentials? **J Natl Cancer Inst Monogr**, n. 16, p. 35-42, 1994.

ALBANEZ, J. et al. Guidelines for HER2 testing in breast cancer: a national consensus of the Spanish Society of Pathology (SEAP) and the Spanish Society of Medical Oncology (SEOM). **Clin Transl Oncol**, v. 11, n. 6, p. 363-75, Jun 2009.

AMERICAN CANCER SOCIETY. What is cancer? , 2014. Disponível em: <<http://www.cancer.org/cancer/breastcancer/detailedguide/breast-cancer-what-is-cancer>>.

ANDERSEN, T. I. et al. Detection of c-erbB-2 related protein in sera from breast cancer patients. Relationship to ERBB2 gene amplification and c-erbB-2 protein overexpression in tumour. **Acta Oncol**, v. 34, n. 4, p. 499-504, 1995.

ARTEAGA, C. L. EGF receptor as a therapeutic target: patient selection and mechanisms of resistance to receptor-targeted drugs. **J Clin Oncol**, v. 21, n. 23 Suppl, p. 289s-291s, Dec 1 2003.

ASGEIRSSON, K. S. et al. Serum epidermal growth factor receptor and HER2 expression in primary and metastatic breast cancer patients. **Breast Cancer Res**, v. 9, n. 6, p. R75, 2007.

BADZEK, S. et al. Serum HER2/ECD value in stage I and II early breast cancer: need of a lower cut-off? **Wien Klin Wochenschr**, v. 123, n. 23-24, p. 726-31, Dec 2011.

BARNES, C. J.; KUMAR, R. Epidermal growth factor receptor family tyrosine kinases as signal integrators and therapeutic targets. **Cancer Metastasis Rev**, v. 22, n. 4, p. 301-7, Dec 2003.

BARON, A. T. et al. Soluble epidermal growth factor receptor: a biomarker of epithelial ovarian cancer. **Cancer Treat Res**, v. 149, p. 189-202, 2009.

BARTLETT, J. M. et al. HER2 testing in the UK: recommendations for breast and gastric in-situ hybridisation methods. **J Clin Pathol**, v. 64, n. 8, p. 649-53, Aug 2011.

BASU, A. et al. Inhibition of tyrosine kinase activity of the epidermal growth factor (EGF) receptor by a truncated receptor form that binds to EGF: role for interreceptor interaction in kinase regulation. **Mol Cell Biol**, v. 9, n. 2, p. 671-7, Feb 1989.

BAZLEY, L. A.; GULLICK, W. J. The epidermal growth factor receptor family. **Endocr Relat Cancer**, v. 12 Suppl 1, p. S17-27, Jul 2005.

BEABER, E. F. et al. Recent oral contraceptive use by formulation and breast cancer risk among women 20 to 49 years of age. **Cancer Res**, v. 74, n. 15, p. 4078-89, Aug 1 2014.

BEAM, C.; HENDRICK, R. E. Proposition: All mammograms should be double-read. **Med Phys**, v. 26, n. 2, p. 115-8, Feb 1999.

BEENKEN, S. W.; BLAND, K. I. Biomarkers for breast cancer. **Minerva Chir**, v. 57, n. 4, p. 437-48, Aug 2002.

BERAL, V. Breast cancer and hormone-replacement therapy in the Million Women Study. **Lancet**, v. 362, n. 9382, p. 419-27, Aug 9 2003.

BERAL, V. et al. Breast cancer risk in relation to the interval between menopause and starting hormone therapy. **J Natl Cancer Inst**, v. 103, n. 4, p. 296-305, Feb 16 2011.

BLOOM, H. J.; RICHARDSON, W. W. Histological grading and prognosis in breast cancer; a study of 1409 cases of which 359 have been followed for 15 years. **Br J Cancer**, v. 11, n. 3, p. 359-77, Sep 1957.

BLOWS, F. M. 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**, v. 7, n. 5, p. e1000279, May 2010.

BORNSTEIN, P. Thrombospondins: structure and regulation of expression. **FASEB J**, v. 6, n. 14, p. 3290-9, Nov 1992.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Informática do SUS (Datasus). Sistema de Informações sobre Mortalidade - SIM. <<http://www2.datasus.gov.br/DATASUS/index.php?area=0205>>. Acesso em: 11 dez. 2014.

CARTER, C. L.; ALLEN, C.; HENSON, D. E. Relation of tumor size, lymph node status, and survival in 24,740 breast cancer cases. **Cancer**, v. 63, n. 1, p. 181-7, Jan 1 1989.

CASTELLANO, D. et al. The role of RANK-ligand inhibition in cancer: the story of denosumab. **Oncologist**, v. 16, n. 2, p. 136-45, 2011.

CHEANG, M. C. et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. **J Natl Cancer Inst**, v. 101, n. 10, p. 736-50, May 20 2009.

CHLEBOWSKI, R. T. et al. Breast cancer after use of estrogen plus progestin in postmenopausal women. **N Engl J Med**, v. 360, n. 6, p. 573-87, Feb 5 2009.

CHRISTIANSEN, C. L. et al. Predicting the cumulative risk of false-positive mammograms. **J Natl Cancer Inst**, v. 92, n. 20, p. 1657-66, Oct 18 2000.

CIANFROCCA, M.; GOLDSTEIN, L. J. Prognostic and predictive factors in early-stage breast cancer. **Oncologist**, v. 9, n. 6, p. 606-16, 2004.

CITRI, A.; SKARIA, K. B.; YARDEN, Y. The deaf and the dumb: the biology of ErbB-2 and ErbB-3. **Exp Cell Res**, v. 284, n. 1, p. 54-65, Mar 10 2003.

COLEMAN, R. E.; RUBENS, R. D. The clinical course of bone metastases from breast cancer. **Br J Cancer**, v. 55, n. 1, p. 61-6, Jan 1987.

CONSTANTINIDOU, A.; SMITH, I. Is there a case for anti-HER2 therapy without chemotherapy in early breast cancer? **Breast**, v. 20 Suppl 3, p. S158-61, Oct 2011.

COUSSENS, L. et al. Tyrosine kinase receptor with extensive homology to EGF receptor shares chromosomal location with neu oncogene. **Science**, v. 230, n. 4730, p. 1132-9, Dec 6 1985.

CROTTI, T. et al. Receptor activator NF kappaB ligand (RANKL) and osteoprotegerin (OPG) protein expression in periodontitis. **J Periodontal Res**, v. 38, n. 4, p. 380-7, Aug 2003.

DAIDONE, M. G. et al. Biomolecular features of clinical relevance in breast cancer. **Eur J Nucl Med Mol Imaging**, v. 31 Suppl 1, p. S3-14, Jun 2004.

DAIRKEE, S. H. et al. Immunolocalization of a human basal epithelium specific keratin in benign and malignant breast disease. **Breast Cancer Res Treat**, v. 10, n. 1, p. 11-20, Oct 1987.

DE PLACIDO, S. et al. Twenty-year results of the Naples GUN randomized trial: predictive factors of adjuvant tamoxifen efficacy in early breast cancer. **Clin Cancer Res**, v. 9, n. 3, p. 1039-46, Mar 2003.

DHINGRA, K.; HORTOBAGYI, G. N. Critical evaluation of prognostic factors. **Semin Oncol**, v. 23, n. 4, p. 436-45, Aug 1996.

DI GIOIA, D. et al. Serum HER2 supports HER2-testing in tissue at the time of primary diagnosis of breast cancer. **Clin Chim Acta**, v. 430, p. 86-91, Mar 20 2014.

DOHERTY, J. K. et al. The HER-2/neu receptor tyrosine kinase gene encodes a secreted autoinhibitor. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 19, p. 10869-74, Sep 14 1999.

DONEGAN, W. L. Tumor-related prognostic factors for breast cancer. **CA Cancer J Clin**, v. 47, n. 1, p. 28-51, Jan-Feb 1997.

ELMORE, J. G. et al. Screening for breast cancer. **JAMA**, v. 293, n. 10, p. 1245-56, Mar 9 2005.

ELSTON, C. W.; ELLIS, I. O. 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**, v. 19, n. 5, p. 403-10, Nov 1991.

EVERS, K.; TROUPIN, R. H. Preoperative localization of breast lesions: tailored techniques and potential pitfalls. **Semin Roentgenol**, v. 28, n. 3, p. 242-51, Jul 1993.

FARRUGIA, A. N. et al. Receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand expression by human myeloma cells mediates osteoclast formation in vitro and correlates with bone destruction in vivo. **Cancer Res**, v. 63, n. 17, p. 5438-45, Sep 1 2003.

FARZADNIA, M. et al. Evaluation of HER2/neu oncoprotein in serum and tissue samples of women with breast cancer: correlation with clinicopathological parameters. **Breast**, v. 19, n. 6, p. 489-92, Dec 2010.

FEJERMAN, L.; ZIV, E. Population differences in breast cancer severity. **Pharmacogenomics**, v. 9, n. 3, p. 323-33, Mar 2008.

FISHER, B. et al. Relation of number of positive axillary nodes to the prognosis of patients with primary breast cancer. An NSABP update. **Cancer**, v. 52, n. 9, p. 1551-7, Nov 1 1983.

FITZGIBBONS, P. L. et al. Prognostic factors in breast cancer. College of American Pathologists Consensus Statement 1999. **Arch Pathol Lab Med**, v. 124, n. 7, p. 966-78, Jul 2000.

FLICKINGER, T. W.; MAIHLE, N. J.; KUNG, H. J. An alternatively processed mRNA from the avian c-erbB gene encodes a soluble, truncated form of the receptor that can block ligand-dependent transformation. **Mol Cell Biol**, v. 12, n. 2, p. 883-93, Feb 1992.

FRAZIER, W. A. Thrombospondins. **Curr Opin Cell Biol**, v. 3, n. 5, p. 792-9, Oct 1991.

GASPARINI, G.; HARRIS, A. L. Clinical importance of the determination of tumor angiogenesis in breast carcinoma: much more than a new prognostic tool. **J Clin Oncol**, v. 13, n. 3, p. 765-82, Mar 1995.

GOLDHIRSCH, A. et al. Meeting highlights: international expert consensus on the primary therapy of early breast cancer 2005. **Ann Oncol**, v. 16, n. 10, p. 1569-83, Oct 2005.

GONZALEZ-SUAREZ, E. et al. RANK ligand mediates progestin-induced mammary epithelial proliferation and carcinogenesis. **Nature**, v. 468, n. 7320, p. 103-7, Nov 4 2010.

GRAUS-PORTA, D. et al. ErbB-2, the preferred heterodimerization partner of all ErbB receptors, is a mediator of lateral signaling. **EMBO J**, v. 16, n. 7, p. 1647-55, Apr 1 1997.

GREENE FL, P. D., MORROW M, BALCH C, HALLER D, FRITZ A, FLEMING I, EDS. **AJCC Cancer Staging Manual 6th ed.** New York: Springer, 2002.

GRIMAUD, E. et al. Receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) ratio is increased in severe osteolysis. **Am J Pathol**, v. 163, n. 5, p. 2021-31, Nov 2003.

HABEL, L. A.; STANFORD, J. L. Hormone receptors and breast cancer. **Epidemiol Rev**, v. 15, n. 1, p. 209-19, 1993.

HAMMOND, M. E. ASCO-CAP guidelines for breast predictive factor testing: an update. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 19, n. 6, p. 499-500, Dec 2011.

HANNA, W. et al. Updated recommendations from the Canadian National Consensus Meeting on HER2/neu testing in breast cancer. **Curr Oncol**, v. 14, n. 4, p. 149-53, Aug 2007.

HARRIS, R. C.; CHUNG, E.; COFFEY, R. J. EGF receptor ligands. **Exp Cell Res**, v. 284, n. 1, p. 2-13, Mar 10 2003.

HAYNES, D. R. et al. Osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor kappaB ligand (RANKL) regulate osteoclast formation by cells in the human rheumatoid arthritic joint. **Rheumatology (Oxford)**, v. 40, n. 6, p. 623-30, Jun 2001.

HENSON, E. S.; GIBSON, S. B. Surviving cell death through epidermal growth factor (EGF) signal transduction pathways: implications for cancer therapy. **Cell Signal**, v. 18, n. 12, p. 2089-97, Dec 2006.

HERBST, R. S. Review of epidermal growth factor receptor biology. **Int J Radiat Oncol Biol Phys**, v. 59, n. 2 Suppl, p. 21-6, 2004.

HOLBRO, T.; HYNES, N. E. ErbB receptors: directing key signaling networks throughout life. **Annu Rev Pharmacol Toxicol**, v. 44, p. 195-217, 2004.

HOMER, M. J.; SMITH, T. J.; SAFAII, H. Prebiopsy needle localization. Methods, problems, and expected results. **Radiol Clin North Am**, v. 30, n. 1, p. 139-53, Jan 1992.

HSIEH, M.; CONTI, M. G-protein-coupled receptor signaling and the EGF network in endocrine systems. **Trends Endocrinol Metab**, v. 16, n. 7, p. 320-6, Sep 2005.

HUDELIST, G. et al. Serum EGFR levels and efficacy of trastuzumab-based therapy in patients with metastatic breast cancer. **Eur J Cancer**, v. 42, n. 2, p. 186-92, Jan 2006.

ILEKIS, J. V.; STARK, B. C.; SCOCCIA, B. Possible role of variant RNA transcripts in the regulation of epidermal growth factor receptor expression in human placenta. **Mol Reprod Dev**, v. 41, n. 2, p. 149-56, Jun 1995.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (Brasil). Estimativa 2014. Incidência do Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014.

IRVIN, W. J., JR.; CAREY, L. A. What is triple-negative breast cancer? **Eur J Cancer**, v. 44, n. 18, p. 2799-805, Dec 2008.

JAFFE, E. A.; RUGGIERO, J. T.; FALCONE, D. J. Monocytes and macrophages synthesize and secrete thrombospondin. **Blood**, v. 65, n. 1, p. 79-84, Jan 1985.

JAFFE, E. A. et al. Cultured human fibroblasts synthesize and secrete thrombospondin and incorporate it into extracellular matrix. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 80, n. 4, p. 998-1002, Feb 1983.

KALLIONIEMI, O. P. et al. ERBB2 amplification in breast cancer analyzed by fluorescence in situ hybridization. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 89, n. 12, p. 5321-5, Jun 15 1992.

KAMANGAR, F.; DORES, G. M.; ANDERSON, W. F. Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world. **J Clin Oncol**, v. 24, n. 14, p. 2137-50, May 10 2006.

KASHLES, O. et al. A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. **Mol Cell Biol**, v. 11, n. 3, p. 1454-63, Mar 1991.

KENNECKE, H. et al. Metastatic behavior of breast cancer subtypes. **J Clin Oncol**, v. 28, n. 20, p. 3271-7, Jul 10 2010.

KHOSLA, S. Minireview: the OPG/RANKL/RANK system. **Endocrinology**, v. 142, n. 12, p. 5050-5, Dec 2001.

KING, C. R.; KRAUS, M. H.; AARONSON, S. A. Amplification of a novel v-erbB-related gene in a human mammary carcinoma. **Science**, v. 229, n. 4717, p. 974-6, Sep 6 1985.

KLAPPER, L. N. et al. The ErbB-2/HER2 oncprotein of human carcinomas may function solely as a shared coreceptor for multiple stroma-derived growth factors. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 96, n. 9, p. 4995-5000, Apr 27 1999.

KOENDERS, P. G. et al. Human breast cancer: survival from first metastasis. Breast Cancer Study Group. **Breast Cancer Res Treat**, v. 21, n. 3, p. 173-80, 1992.

KOLETSA, T. et al. A splice variant of HER2 corresponding to Herstatin is expressed in the noncancerous breast and in breast carcinomas. **Neoplasia**, v. 10, n. 7, p. 687-96, Jul 2008.

KONG, Y. Y. et al. Activated T cells regulate bone loss and joint destruction in adjuvant arthritis through osteoprotegerin ligand. **Nature**, v. 402, n. 6759, p. 304-9, Nov 18 1999.

KOSCIELNY, S. et al. Breast cancer: relationship between the size of the primary tumour and the probability of metastatic dissemination. **Br J Cancer**, v. 49, n. 6, p. 709-15, Jun 1984.

KRAINER, M. et al. Tissue expression and serum levels of HER-2/neu in patients with breast cancer. **Oncology**, v. 54, n. 6, p. 475-81, Nov-Dec 1997.

LACEY, D. L. et al. Osteoprotegerin ligand is a cytokine that regulates osteoclast differentiation and activation. **Cell**, v. 93, n. 2, p. 165-76, Apr 17 1998.

LAFKY, J. M. et al. Clinical implications of the ErbB/epidermal growth factor (EGF) receptor family and its ligands in ovarian cancer. **Biochim Biophys Acta**, v. 1785, n. 2, p. 232-65, Apr 2008.

LEE, S. B. et al. Preoperative serum HER2 extracellular domain levels in primary invasive breast cancer. **BMC Cancer**, v. 14, n. 1, p. 929, 2014.

LEE, Y. T. Breast carcinoma: pattern of metastasis at autopsy. **J Surg Oncol**, v. 23, n. 3, p. 175-80, Jul 1983.

LEIBBRANDT, A.; PENNINGER, J. M. RANKL/RANK as key factors for osteoclast development and bone loss in arthropathies. **Adv Exp Med Biol**, v. 649, p. 100-13, 2009.

LEITZEL, K. et al. Elevated soluble c-erbB-2 antigen levels in the serum and effusions of a proportion of breast cancer patients. **J Clin Oncol**, v. 10, n. 9, p. 1436-43, Sep 1992.

LEMMON, M. A. et al. Two EGF molecules contribute additively to stabilization of the EGFR dimer. **EMBO J**, v. 16, n. 2, p. 281-94, Jan 15 1997.

LIBERMAN, L. et al. Radiography of microcalcifications in stereotaxic mammary core biopsy specimens. **Radiology**, v. 190, n. 1, p. 223-5, Jan 1994.

LU, J. C. et al. [Supplemental role of thrombospondin-1 in the diagnosis of prostate cancer]. **Zhonghua Yi Xue Za Zhi**, v. 93, n. 4, p. 252-5, Jan 22 2013.

LUDOVINI, V. et al. Evaluation of serum HER2 extracellular domain in early breast cancer patients: correlation with clinicopathological parameters and survival. **Ann Oncol**, v. 19, n. 5, p. 883-90, May 2008.

LYNCH, C. C. et al. MMP-7 promotes prostate cancer-induced osteolysis via the solubilization of RANKL. **Cancer Cell**, v. 7, n. 5, p. 485-96, May 2005.

MA, L. et al. Relationship between serum HER2 extracellular domain levels, tissue HER2 expression, and clinico-pathological parameters in early stage breast cancer. **Chin Med J (Engl)**, v. 125, n. 22, p. 4104-10, Nov 2012.

MALZAHN, K. et al. Biological and prognostic significance of stratified epithelial cytokeratins in infiltrating ductal breast carcinomas. **Virchows Arch**, v. 433, n. 2, p. 119-29, Aug 1998.

MARCHBANKS, P. A. et al. Oral contraceptive formulation and risk of breast cancer. **Contraception**, v. 85, n. 4, p. 342-50, Apr 2012.

MILES, D. W. Update on HER-2 as a target for cancer therapy: herceptin in the clinical setting. **Breast Cancer Res**, v. 3, n. 6, p. 380-4, 2001.

MOASSER, M. M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis. **Oncogene**, v. 26, n. 45, p. 6469-87, Oct 4 2007.

MORI, S. et al. In vitro and in vivo release of soluble erbB-2 protein from human carcinoma cells. **Jpn J Cancer Res**, v. 81, n. 5, p. 489-94, May 1990.

MOSHER, D. F. Physiology of thrombospondin. **Annu Rev Med**, v. 41, p. 85-97, 1990.

MOSHER, D. F.; DOYLE, M. J.; JAFFE, E. A. Synthesis and secretion of thrombospondin by cultured human endothelial cells. **J Cell Biol**, v. 93, n. 2, p. 343-8, May 1982.

MOUNTZIOS, G. et al. Abnormal bone remodeling process is due to an imbalance in the receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand (RANKL)/osteoprotegerin (OPG) axis in patients with solid tumors metastatic to the skeleton. **Acta Oncol**, v. 46, n. 2, p. 221-9, 2007.

MULLER, V. et al. Prognostic and predictive impact of soluble epidermal growth factor receptor (sEGFR) protein in the serum of patients treated with chemotherapy

for metastatic breast cancer. **Anticancer Res**, v. 26, n. 2B, p. 1479-87, Mar-Apr 2006.

NADJI, M. et al. Immunohistochemistry of estrogen and progesterone receptors reconsidered: experience with 5,993 breast cancers. **Am J Clin Pathol**, v. 123, n. 1, p. 21-7, Jan 2005.

NAKAGAWA, N. et al. RANK is the essential signaling receptor for osteoclast differentiation factor in osteoclastogenesis. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 253, n. 2, p. 395-400, Dec 18 1998.

NARITA, T. et al. C-erbB-2 protein in the sera of breast cancer patients. **Breast Cancer Res Treat**, v. 24, n. 2, p. 97-102, 1992.

NAROD, S. A. Hormone replacement therapy and the risk of breast cancer. **Nat Rev Clin Oncol**, v. 8, n. 11, p. 669-76, Nov 2011.

NISHIKAWA, R. et al. A mutant epidermal growth factor receptor common in human glioma confers enhanced tumorigenicity. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 91, n. 16, p. 7727-31, Aug 2 1994.

OH, M. J. et al. Detection of epidermal growth factor receptor in the serum of patients with cervical carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 6, n. 12, p. 4760-3, Dec 2000.

OWENS, M. A.; HORTEN, B. C.; DA SILVA, M. M. HER2 amplification ratios by fluorescence in situ hybridization and correlation with immunohistochemistry in a cohort of 6556 breast cancer tissues. **Clin Breast Cancer**, v. 5, n. 1, p. 63-9, Apr 2004.

PAGE, D. L.; JENSEN, R. A.; SIMPSON, J. F. Routinely available indicators of prognosis in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 51, n. 3, p. 195-208, 1998.

PALAFOX, M. et al. RANK induces epithelial-mesenchymal transition and stemness in human mammary epithelial cells and promotes tumorigenesis and metastasis. **Cancer Res**, v. 72, n. 11, p. 2879-88, Jun 1 2012.

PARKER, J. S. et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. **J Clin Oncol**, v. 27, n. 8, p. 1160-7, Mar 10 2009.

PEREZ-TORRES, M. et al. Shedding of epidermal growth factor receptor is a regulated process that occurs with overexpression in malignant cells. **Exp Cell Res**, v. 314, n. 16, p. 2907-18, Oct 1 2008.

PEROU, C. M. et al. Molecular portraits of human breast tumours. **Nature**, v. 406, n. 6797, p. 747-52, Aug 17 2000.

PITTERI, S. J.; HANASH, S. M. Confounding effects of hormone replacement therapy in protein biomarker studies. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 20, n. 1, p. 134-9, Jan 2011.

PORTER, P. "Westernizing" women's risks? Breast cancer in lower-income countries. **N Engl J Med**, v. 358, n. 3, p. 213-6, Jan 17 2008.

POTTI, A. et al. Predictive role of HER-2/neu overexpression and clinical features at initial presentation in patients with extensive stage small cell lung carcinoma. **Lung Cancer**, v. 36, n. 3, p. 257-61, Jun 2002.

QUINTELA, I. et al. Expression and prognostic value of EGFR in invasive breast cancer. **Oncol Rep**, v. 14, n. 6, p. 1655-63, Dec 2005.

RAKHA, E. A. et al. Morphological and immunophenotypic analysis of breast carcinomas with basal and myoepithelial differentiation. **J Pathol**, v. 208, n. 4, p. 495-506, Mar 2006.

RAKHA, E. A.; REIS-FILHO, J. S.; ELLIS, I. O. Combinatorial biomarker expression in breast cancer. **Breast Cancer Res Treat**, v. 120, n. 2, p. 293-308, Apr 2010.

REITER, J. L.; MAIHLE, N. J. A 1.8 kb alternative transcript from the human epidermal growth factor receptor gene encodes a truncated form of the receptor. **Nucleic Acids Res**, v. 24, n. 20, p. 4050-6, Oct 15 1996.

REITER, J. L. et al. Comparative genomic sequence analysis and isolation of human and mouse alternative EGFR transcripts encoding truncated receptor isoforms. **Genomics**, v. 71, n. 1, p. 1-20, Jan 1 2001.

ROCCA, A. et al. Perioperative serum VEGF and extracellular domains of EGFR and HER2 in early breast cancer. **Anticancer Res**, v. 29, n. 12, p. 5111-9, Dec 2009.

ROSE-JOHN, S.; HEINRICH, P. C. Soluble receptors for cytokines and growth factors: generation and biological function. **Biochem J**, v. 300 ( Pt 2), p. 281-90, Jun 1 1994.

ROSEN, P. P. et al. Factors influencing prognosis in node-negative breast carcinoma: analysis of 767 T1N0M0/T2N0M0 patients with long-term follow-up. **J Clin Oncol**, v. 11, n. 11, p. 2090-100, Nov 1993.

ROSS, J. S. et al. The HER-2 receptor and breast cancer: ten years of targeted anti-HER-2 therapy and personalized medicine. **Oncologist**, v. 14, n. 4, p. 320-68, Apr 2009.

ROUKOS, D. H.; BRIASOULIS, E. Individualized preventive and therapeutic management of hereditary breast ovarian cancer syndrome. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 4, n. 10, p. 578-90, Oct 2007.

RUBIN, I.; YARDEN, Y. The basic biology of HER2. **Ann Oncol**, v. 12 Suppl 1, p. S3-8, 2001.

RUBIN, S. C. et al. Prognostic significance of HER-2/neu expression in advanced epithelial ovarian cancer: a multivariate analysis. **Am J Obstet Gynecol**, v. 168, n. 1 Pt 1, p. 162-9, Jan 1993.

SALOMON, D. S. et al. Epidermal growth factor-related peptides and their receptors in human malignancies. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 19, n. 3, p. 183-232, Jul 1995.

SANDERSON, M. P.; DEMPSEY, P. J.; DUNBAR, A. J. Control of ErbB signalling through metalloprotease mediated ectodomain shedding of EGF-like factors. **Growth Factors**, v. 24, n. 2, p. 121-36, Jun 2006.

SANDERSON, M. P. et al. Generation of novel, secreted epidermal growth factor receptor (EGFR/ErbB1) isoforms via metalloprotease-dependent ectodomain shedding and exosome secretion. **J Cell Biochem**, v. 103, n. 6, p. 1783-97, Apr 15 2008.

SANDRI, M. T. et al. Serum EGFR and serum HER-2/neu are useful predictive and prognostic markers in metastatic breast cancer patients treated with metronomic chemotherapy. **Cancer**, v. 110, n. 3, p. 509-17, Aug 1 2007.

SCHECHTER, A. L. et al. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185,000-Mr tumour antigen. **Nature**, v. 312, n. 5994, p. 513-6, Dec 6-12 1984.

SCHLESSINGER, J. Ligand-induced, receptor-mediated dimerization and activation of EGF receptor. **Cell**, v. 110, n. 6, p. 669-72, Sep 20 2002.

SCHRAMEK, D. et al. Osteoclast differentiation factor RANKL controls development of progestin-driven mammary cancer. **Nature**, v. 468, n. 7320, p. 98-102, Nov 4 2010.

SCHRAMEK, D.; SIGL, V.; PENNINGER, J. M. RANKL and RANK in sex hormone-induced breast cancer and breast cancer metastasis. **Trends Endocrinol Metab**, v. 22, n. 5, p. 188-94, May 2011.

SCOTT, G. K. et al. A truncated intracellular HER2/neu receptor produced by alternative RNA processing affects growth of human carcinoma cells. **Mol Cell Biol**, v. 13, n. 4, p. 2247-57, Apr 1993.

SEGATTO, O. et al. Different structural alterations upregulate in vitro tyrosine kinase activity and transforming potency of the erbB-2 gene. **Mol Cell Biol**, v. 8, n. 12, p. 5570-4, Dec 1988.

SHAH, S.; CHEN, B. Testing for HER2 in Breast Cancer: A Continuing Evolution. **Patholog Res Int**, v. 2011, p. 903202, 2011.

SHAO, X. et al. Outcome prediction values of soluble human epidermal growth factor receptor-2 extracellular domain in metastatic breast cancer. **Int J Clin Exp Pathol**, v. 7, n. 3, p. 1108-13, 2014.

SICKLES, E. A. et al. Medical audit of a rapid-throughput mammography screening practice: methodology and results of 27,114 examinations. **Radiology**, v. 175, n. 2, p. 323-7, May 1990.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2014. **CA Cancer J Clin**, v. 64, n. 1, p. 9-29, Jan-Feb 2014.

SLAMON, D. J. et al. Human breast cancer: correlation of relapse and survival with amplification of the HER-2/neu oncogene. **Science**, v. 235, n. 4785, p. 177-82, Jan 9 1987.

SLAMON, D. J. et al. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer. **Science**, v. 244, n. 4905, p. 707-12, May 12 1989.

SLIEKER, L. J.; MARTENSEN, T. M.; LANE, M. D. Synthesis of epidermal growth factor receptor in human A431 cells. Glycosylation-dependent acquisition of ligand binding activity occurs post-translationally in the endoplasmic reticulum. **J Biol Chem**, v. 261, n. 32, p. 15233-41, Nov 15 1986.

SORLIE, T. et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 98, n. 19, p. 10869-74, Sep 11 2001.

SORLIE, T. et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 14, p. 8418-23, Jul 8 2003.

SOTIRIOU, C. et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 100, n. 18, p. 10393-8, Sep 2 2003.

SOUDER, C. et al. Serum epidermal growth factor receptor/HER-2 predicts poor survival in patients with metastatic breast cancer. **Cancer**, v. 107, n. 10, p. 2337-45, Nov 15 2006.

SUH, E. J. et al. Comparative profiling of plasma proteome from breast cancer patients reveals thrombospondin-1 and BRWD3 as serological biomarkers. **Exp Mol Med**, v. 44, n. 1, p. 36-44, Jan 31 2012.

TAN, L. D. et al. Serum HER2 level measured by dot blot: a valid and inexpensive assay for monitoring breast cancer progression. **PLoS One**, v. 6, n. 4, p. e18764, 2011.

TAS, F. et al. Clinical significance of serum epidermal growth factor receptor (EGFR) levels in patients with breast cancer. **Cytokine**, v. 71, n. 1, p. 66-70, Jan 2015.

TSE, C. et al. HER2 shedding and serum HER2 extracellular domain: biology and clinical utility in breast cancer. **Cancer Treat Rev**, v. 38, n. 2, p. 133-42, Apr 2012.

TUSZYNSKI, G. P. et al. Thrombospondin levels in patients with malignancy. **Thromb Haemost**, v. 67, n. 6, p. 607-11, Jun 1 1992.

VARANI, J. et al. Characterization of thrombospondin synthesis, secretion and cell surface expression by human tumor cells. **Clin Exp Metastasis**, v. 7, n. 3, p. 265-76, May-Jun 1989.

VOGEL, V. G. Epidemiology, genetics, and risk evaluation of postmenopausal women at risk of breast cancer. **Menopause**, v. 15, n. 4 Suppl, p. 782-9, Jul-Aug 2008.

WANG, T. N. et al. Thrombospondin-1 (TSP-1) promotes the invasive properties of human breast cancer. **J Surg Res**, v. 63, n. 1, p. 39-43, Jun 1996.

WEIGEL, M. T.; DOWSETT, M. Current and emerging biomarkers in breast cancer: prognosis and prediction. **Endocr Relat Cancer**, v. 17, n. 4, p. R245-62, Dec 2010.

WEIGELT, B. et al. Breast cancer molecular profiling with single sample predictors: a retrospective analysis. **Lancet Oncol**, v. 11, n. 4, p. 339-49, Apr 2010.

WIGHT, T. N. et al. Light microscopic immunolocation of thrombospondin in human tissues. **J Histochem Cytochem**, v. 33, n. 4, p. 295-302, Apr 1985.

WILSON, T. J. et al. Cathepsin G enhances mammary tumor-induced osteolysis by generating soluble receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand. **Cancer Res**, v. 68, n. 14, p. 5803-11, Jul 15 2008.

WINSTANLEY, J. et al. The long term prognostic significance of oestrogen receptor analysis in early carcinoma of the breast. **Br J Cancer**, v. 64, n. 1, p. 99-101, Jul 1991.

WOLFF, A. C. et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. **J Clin Oncol**, v. 25, n. 1, p. 118-45, Jan 1 2007.

WONG, R. W.; GUILLAUD, L. The role of epidermal growth factor and its receptors in mammalian CNS. **Cytokine Growth Factor Rev**, v. 15, n. 2-3, p. 147-56, Apr-Jun 2004.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. International Agency for Research on Cancer (IARC). Globocan 2012: Estimated cancer incidence, mortality and prevalence worldwide in 2012. Lyon, France. Disponível em: < <http://www.iarc.fr/>>. Acessado em: 09 jan. 2014.

WORTHYLAKE, R.; OPRESKO, L. K.; WILEY, H. S. ErbB-2 amplification inhibits down-regulation and induces constitutive activation of both ErbB-2 and epidermal growth factor receptors. **J Biol Chem**, v. 274, n. 13, p. 8865-74, Mar 26 1999.

YAMADA, M.; IKEUCHI, T.; HATANAKA, H. The neurotrophic action and signalling of epidermal growth factor. **Prog Neurobiol**, v. 51, n. 1, p. 19-37, Jan 1997.

YAU, C. et al. Aging impacts transcriptomes but not genomes of hormone-dependent breast cancers. **Breast Cancer Res**, v. 9, n. 5, p. R59, 2007.

YAZIJI, H. et al. HER-2 testing in breast cancer using parallel tissue-based methods. **JAMA**, v. 291, n. 16, p. 1972-7, Apr 28 2004.

ZAMPINO, M. G. et al. Epidermal growth factor receptor serum (sEGFR) level may predict response in patients with EGFR-positive advanced colorectal cancer treated with gefitinib? **Cancer Chemother Pharmacol**, v. 63, n. 1, p. 139-48, Dec 2008.

## ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar da pesquisa intitulada **Investigação do perfil dos promotores relacionados ao câncer de mama como possíveis biomarcadores durante o estadiamento inicial**, sob a responsabilidade dos pesquisadores **Marcelo José Barbosa Silva**. A razão da sua participação é que você é uma paciente com câncer de mama ou voluntária saudável (grupo controle).

Nesta pesquisa nós estamos buscando entender quais são as substâncias em seu sangue que estão alteradas e que poderiam ser correlacionadas com o câncer de mama na fase inicial. Se você der o seu consentimento para participar deste estudo, um pouco do seu sangue (aproximadamente 2 mL) será retirados através de uma punção da veia do seu braço. Serão três momentos de coleta: após o laudo histopatológico, 1 e 6 meses após a biópsia. Todas as informações coletadas durante o estudo serão mantidas de forma confidencial, o que permitirá que a sua identidade não seja revelada. Os resultados serão analisados individualmente, e os mesmos serão mantidos com o grupo de pesquisa.

O Termo de Consentimento Livre e Esclarecido será obtido pelo pesquisador Marcelo José Barbosa Silva ou por qualquer outro participante dessa pesquisa, após a biópsia inicial no Hospital do Câncer – UFU. Os outros participantes são: Brunna dos Anjos Pultz, Grasielle de Sousa Igídio, Lívia de Paula Peres e Rogério Agenor de Araújo.

Na sua participação, 2 mL de sangue serão removidos do seu braço por punção da veia. O sangue será estudado para a detecção de substâncias que possam estar alteradas em seu sangue e que possam indicar o desenvolvimento inicial do câncer de mama.

Em nenhum momento você será identificada. Os resultados da pesquisa serão publicados e ainda assim a sua identidade será preservada. Você não terá nenhum gasto e ganho financeiro por participar da pesquisa.

Os riscos consistem em formação de hematoma ou flebite no local que foi retirado o sangue. Embora as análises das amostras de sangue possam não beneficiá-lo diretamente, os resultados poderão futuramente ajudar outros pacientes com doenças similares à sua.

Você é livre para deixar de participar da pesquisa a qualquer momento sem nenhum prejuízo ou coação.

Uma via original deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com você.

Qualquer dúvida a respeito da pesquisa, você poderá entrar em contato com: Dr. Marcelo José Barbosa Silva no bloco 4C, Laboratório de Imunologia, no campus Umuarama da Universidade Federal de Uberlândia. Fone: 3218 – 2058. Também, o Dr. Rogério Agenor de Araújo nos seguintes telefones (34) 3291-6100 - (34) 2101-1929, no Hospital do Câncer, campus Umuarama.

Poderá também entrar em contato com o Comitê de Ética na Pesquisa com Seres-Humanos – Universidade Federal de Uberlândia: Av. João Naves de Ávila, nº 2121, bloco A, sala 224, Campus Santa Mônica – Uberlândia – MG, CEP: 38408-100; fone: 34-32394131

Uberlândia, ..... de .....de 20.....

---

Assinatura dos pesquisadores

Eu aceito participar do projeto citado acima, voluntariamente, após ter sido devidamente esclarecido.

---

Participante da pesquisa

## ANEXO B – FICHA CLÍNICA



Projeto Marcadores Séricos Tumorais

Formulário para aplicação no paciente  
Versão 1.0



Iniciais / Código da Paciente:		Data: / /
Raça: <input type="checkbox"/> Branca <input type="checkbox"/> Negra <input type="checkbox"/> Amarela <input type="checkbox"/> Parda <input type="checkbox"/> Índigena		Data da biópsia: ___ / ___ (mês/ano)
<b>Hábitos:</b> <b>Em uma semana típica, em quantos dias você come:</b> (1) Nunca (2) Menos que 1 vez/semana (3) 1-3 dias (4) 3-4 dias (5) 5-6 dias <b>(6) Diariamente</b>		
<input type="checkbox"/> Dieta rica em gorduras: ___ <input type="checkbox"/> Legumes: ___ <input type="checkbox"/> Verduras: ___ <input type="checkbox"/> Frutas: ___ <input type="checkbox"/> Carnes vermelhas: ___ <input type="checkbox"/> Peixes e frutos do mar: ___ <input type="checkbox"/> Defumados: ___ <input type="checkbox"/> Charques: ___ <input type="checkbox"/> Enlatados: ___	<input type="checkbox"/> Alimentos com corantes: ___ <input type="checkbox"/> Alimentos com muito sal: ___ <input type="checkbox"/> Massas: ___ <input type="checkbox"/> Doces: ___ <input type="checkbox"/> Refrigerantes e/ou sucos artificiais ___ <input type="checkbox"/> Chá preto ___ <input type="checkbox"/> Chá verde ___ <input type="checkbox"/> Café ___	Entre 20 e 30 anos Peso: ___ Alt: ___ <input type="checkbox"/> Sobre peso <input type="checkbox"/> Obeso <input type="checkbox"/> Obeso mórbido  Atual (antes de ficar doente) Peso: ___ Alt: ___ <input type="checkbox"/> Sobre peso <input type="checkbox"/> Obeso <input type="checkbox"/> Obeso mórbido
<b>Álcool – quantos anos de uso: ___</b> <input type="checkbox"/> Uma dose menos que 3x semana <input type="checkbox"/> Uma dose mais que 3x semana <input type="checkbox"/> Pinga <input type="checkbox"/> Uísque <input type="checkbox"/> Cerveja <input type="checkbox"/> Vinho <input type="checkbox"/> Outros tipos de bebidas <input type="checkbox"/> Nunca bebeu		<b>Tabagismo</b> <input type="checkbox"/> cigarros/dia <input type="checkbox"/> ___ anos de uso <input type="checkbox"/> Convive com fumante <input type="checkbox"/> Ex-fumante <input type="checkbox"/> Parou há ___ anos <input type="checkbox"/> Nunca fumou <input type="checkbox"/> Faz uso regularmente de charutos, cachimbos ou outras drogas.
<b>Histórico Familiar:</b> <input type="checkbox"/> Nenhum caso de câncer na família <input type="checkbox"/> parentes de 1º grau (pais, irmãos, filhos) <input type="checkbox"/> 01 <input type="checkbox"/> 02 <input type="checkbox"/> 03 ou mais <input type="checkbox"/> Câncer de mama entre parentes <input type="checkbox"/> Outros tipos de câncer Quais: _____ <input type="checkbox"/> Com até 35 anos: <input type="checkbox"/> Entre 35 e 45 anos: <input type="checkbox"/> Entre 45 e 55 anos: <input type="checkbox"/> Mais de 55 anos: <input type="checkbox"/> parentes de 2º grau (avós, sobrinhos, tios, primos, netos) <input type="checkbox"/> 01 <input type="checkbox"/> 02 <input type="checkbox"/> 03 ou mais <input type="checkbox"/> Câncer de mama entre parentes <input type="checkbox"/> Outros tipos de câncer Quais: _____ <input type="checkbox"/> Com até 35 anos: <input type="checkbox"/> Entre 35 e 45 anos: <input type="checkbox"/> Entre 45 e 55 anos: <input type="checkbox"/> Mais de 55 anos: <b>Condição sócio-econômica</b> <b>Renda familiar:</b> <input type="checkbox"/> 01 salário <input type="checkbox"/> 02 salários <input type="checkbox"/> 03 salários <input type="checkbox"/> 04 ou mais		<input type="checkbox"/> Braçal e similares (na cidade) <input type="checkbox"/> Trabalhadores rurais e similares <input type="checkbox"/> Esportistas, atletas e similares <input type="checkbox"/> Outros: _____  <input type="checkbox"/> Contato com produtos tóxicos. Qual? _____ Por quanto tempo? _____ <b>Bens</b> <input type="checkbox"/> Geladeira <input type="checkbox"/> Televisão <input type="checkbox"/> Maquina de lavar roupa <input type="checkbox"/> Microondas <input type="checkbox"/> Maquina de lavar louça <input type="checkbox"/> Telefone fixo/celular <input type="checkbox"/> Carro/ moto
<b>Atividade de trabalho:</b> <input type="checkbox"/> Do lar <input type="checkbox"/> Aposentado <input type="checkbox"/> Escritório, professores e similares		<b>Outros fatores do Câncer de mama</b> <input type="checkbox"/> Primeira menstruação: ___ anos <input type="checkbox"/> Idade da menopausa: ___ anos <input type="checkbox"/> Data da última menstruação: ___ / ___ / ___ <input type="checkbox"/> 1º parto (+30 anos): ___ anos <input type="checkbox"/> 1º parto antes dos 18 anos: ___ anos <input type="checkbox"/> sem filhos <input type="checkbox"/> por opção <input type="checkbox"/> problemas de saúde
número de gestações: ___ número de partos: ___ número de abortos: ___  <input type="checkbox"/> uso de terapia de reposição hormonal <input type="checkbox"/> Quanto tempo? ___ anos <input type="checkbox"/> uso de anticoncepcional <input type="checkbox"/> Quanto tempo? ___ anos <input type="checkbox"/> caroços na mama (benignos/pré-malignos) <input type="checkbox"/> não amamentou <input type="checkbox"/> amamentação: ___ meses (soma de amamentação de todos os filhos) Especificar cada uma: _____ <input type="checkbox"/> fazia o auto exame das mamas (1x/mês) <input type="checkbox"/> não fazia o auto exame das mamas (ocasional) <input type="checkbox"/> não fazia o auto exame de mamas <input type="checkbox"/> visita ao ginecologista 1x ao ano <input type="checkbox"/> visita ao ginecologista ocasionalmente <input type="checkbox"/> nunca foi ao ginecologista/mastologista <input type="checkbox"/> mamografia anualmente (+ 40 anos) <input type="checkbox"/> mamografia ocasionalmente (+ 40 anos) <input type="checkbox"/> nunca fez mamografia (+40 anos)  <input type="checkbox"/> Nenhum outro problema de saúde <input type="checkbox"/> Pressão normal <input type="checkbox"/> Hipertensa <input type="checkbox"/> Glicose normal <input type="checkbox"/> Diabética <input type="checkbox"/> Hipotireoidismo <input type="checkbox"/> Hipertireoidismo Outros: _____		