

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

A EXPRESSÃO DAS CLAUDINAS 1, 3, 4, 7 E E-CADERINA EM UMA SÉRIE
DE TUMORES DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS

Ermani Cadore

Porto Alegre

2012

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

A EXPRESSÃO DAS CLAUDINAS 1, 3, 4, 7 E E-CADERINA EM UMA SÉRIE
DE TUMORES DE MAMA TRIPLO-NEGATIVOS

*Dissertação entregue para obtenção de título
de Mestre no Programa de Pós-Graduação em
Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul*

Aluno: Ermani Cadore

Orientadora: Prof^a. Dra. Marcia Silveira Graudenz

Porto Alegre

2012

DEDICATÓRIA

Dedico esse trabalho a todas pacientes com câncer de mama que são acometidas por uma doença de alta mortalidade em um órgão que simboliza e representa extrema sensualidade, feminilidade e a maternidade.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente gostaria de agradecer aos meus pais Geraldo e Angelina por, da forma mais simples e humilde, me apoiarem à sua maneira nos momentos em que encontrei dificuldades nesta caminhada: ser médico e atender às pessoas.

À minha esposa Elaine, aos meus filhos Michel, Érico, Otávio, Antônio e Amanda que suportaram minhas ausências para, além de trabalhar muito, realizar esse trabalho de mestrado. Além disso, me apoiaram sempre que puderam.

A todos os meus familiares que, mesmo distantes, sempre me apoiaram.

À minha orientadora Dr. Márcia que desde o início me incentivou para a realização da pós-graduação. Além disso, esteve sempre disponível fazendo importantes sugestões sobre o estudo da patologia molecular da mama que fizeram com que eu me sentisse valorizado profissionalmente, proporcionando conhecimento e argumentação científica no atendimento das pacientes, principalmente aquelas com câncer de mama grave.

Ao Dr. Diego Uchôa, Patologista do HCPA, por ter sempre se colocado a disposição desde o início do trabalho.

Agradeço ao Dr. Clóvis Klock, patologista do laboratório Medicina diagnóstica, e ao biólogo Rudinei Cella, pela assistência técnica em parte fundamental do trabalho.

A Dra. Ana Gaiger, patologista que auxiliou na realização desse trabalho.

Agradeço à Dra. Maria Isabel Edelweiss que me apoiaram inicialmente para realizar a pós-graduação.

Agradeço ao Dr. Alexandre Rocha, que me apoiou no início do mestrado com excelentes idéias e apoio.

Às acadêmicas Clarissa Borba, Bruna Pellini, Renata Schulz, Francine Ziquinatti e Amanda Klein, que colaboraram muito na realização deste trabalho.

A professora de inglês Graciela e ao professor de informática Rômulo.

Aos demais professores e funcionários do Hospital de Clínicas de Porto Alegre.

O homem deve se reinventar todos os dias.

(Jean Paul Sartre)

Todos temos momentos brilhantes, e a maioria deles são graças ao estímulo de outra pessoa.

(George Adams)

RESUMO

INTRODUÇÃO: O câncer de mama é uma importante causa de morbimortalidade, é conhecido por ser uma doença heterogênea. A caracterização clínica e molecular de seus subtipos é fundamental para nortear o prognóstico e o tratamento dessas pacientes. Novos estudos são necessários na melhor caracterização dos tumores triplo-negativos. O estudo da expressão das claudinas pode auxiliar na caracterização desses tumores. **OBJETIVO:** Investigar a associação da expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 e E-caderina com variáveis clínico-patológicas e fatores prognósticos, em uma série de tumores de mama triplo-negativos (RE-, RP- e HER2-). **MÉTODOS:** 80 tumores triplo-negativos foram analisados por imunistoquímica automatizada para as claudinas 1, 3, 4, 7 e E-caderina. A expressão imunistoquímica foi avaliada pelo escore H (intensidade multiplicada pela porcentagem de marcação). Foram avaliadas as associações entre características clínico-patológicas e o escore H. Para a avaliação prognóstica das pacientes, curvas de Kaplan-Meier foram construídas a partir dos dados de seguimento das pacientes e do escore H. **RESULTADOS:** Foi encontrada associação significativa entre o alto escore H da CLDN-1 (HCLDN-1) e pacientes mais idosas e com a presença de necrose, alto escore H da E-caderina (HE-CAD) em pacientes mais jovens e baixo escore H da CLDN-7 (HCLDN-7) e Ki67 positivo. Além disso, pacientes com elevado HCLDN-1 tiveram menor sobrevida geral. Por outro lado, o elevado HCLDN-3 apresentou uma tendência à associação com maior sobrevida geral e sobrevida livre de doença. **CONCLUSÕES:** A expressão diferencial das claudinas e E-caderina podem auxiliar na caracterização clínico-patológica dos tumores triplo-negativos. Além disso, as claudinas 1 e 3 parecem ser fatores prognósticos para esses tumores.

PALAVRAS-CHAVES:

Câncer de Mama, imunistoquímica, triplo-negativo, claudinas, prognóstico

ABSTRACT

INTRODUCTION: Breast cancer is a major cause of morbidity and mortality, is known to be a heterogeneous disease. The clinical and molecular characterization of its subtypes is critical to guide the prognosis and treatment of these patients. Further studies are needed for the best characterization of triple-negative tumors. The study of the expression of claudins can aid in the characterization of these tumors.

OBJECTIVE: To investigate the association of expression of claudins 1, 3, 4 and 7 and E-cadherin with clinicopathological variables and prognosis in a series of triple-negative breast cancers (ER-, PR- and HER2-).

METHODS: 80 triple negative tumors were analyzed by automated immunohistochemistry for the claudins 1, 3, 4, 7 and E-cadherin. The immunohistochemical expression was assessed by H-Score (intensity multiplied by the percentage of staining). We evaluated the associations between clinicopathological characteristics and H-Score. For the prognostic assessment of patients, Kaplan-Meier curves were constructed from the follow-up data of patients and H-Score.

RESULTS: We found a significant association between high H-Score of CLDN-1 (HCLDN-1) and older patients and the presence of necrosis, high H-Score of E-cadherin (H-CAD) in younger patients and low H-Score CLDN-7- (7-HCLDN) and Ki67 positive. Furthermore, patients with high-HCLDN1 had a lower overall survival. On the other hand, the high HCLDN-3 showed a trend toward association with greater overall survival and disease-free survival.

CONCLUSIONS: Differential expression of claudins and E-cadherin can help in clinic-pathological characterization of triple-negative tumors. Furthermore, claudin 1 and 3 appear to be prognostic factor for these tumors.

Key words

Breast Cancer, Immunohistochemical markers, claudins, E-cadherin, triple-negative

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Incidência e Mortalidade de Câncer de Mama no mundo (por 100.000 mulheres)	17
Figura 2. Incidência do câncer de mama estimada em países selecionados ao longo dos anos.....	18
Figura 3. Mortalidade por câncer de mama estimada em países selecionados ao longo dos anos	18
Figura 4. Relação entre Renda <i>per capita</i> e sobrevida em 5 anos.....	22
Figura 5. Incidência do Câncer de Mama de acordo com a idade nos USA, Japão em Reino Unido em 2002.....	25
Figura 6. Estrutura Morfológica do Câncer.....	26
Figura 7. Histologia esquemática do Epitélio Mamário.....	27
Figura 8. Desenvolvimento Molecular da Célula Tumoral de Mama	33
Figura 9. Diagrama esquemático dos tumores triplo-negativo versus os basal- <i>like</i> ..	35
Figura 10. Mortalidade dos Tumores Triplo-Negativos ao longo dos anos	36
Figura 11. Tempo Livre de Metástases dos Tumores Triplo-Negativos ao longo dos anos	37
Figura 12. Estrutura esquemática das claudinas.....	39
Figura 13. Estrutura esquemática do complexo juncional celular.....	40
Figura 14. Gráfico de Kaplan-Meier para a sobrevida das pacientes segundo subtipo molecular.....	47

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Incidência e Mortalidade mundial estimada para todos os cânceres em mulheres.....	16
Tabela 2. Estimativa do INCA para 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, no Brasil, Rio Grande do Sul e Porto Alegre (números arredondados para 10 ou múltiplos de 10).....	20
Tabela 3. Quadro-Resumo do Rastreamento Preconizado para o Câncer de Mama no Brasil	21
Tabela 4. Custo do Câncer de Mama no Brasil e no Rio Grande do Sul em 2009 ...	23
Tabela 5. Quadro-resumo dos fatores reprodutivos	25
Tabela 6. Classificação Histomorfológica Resumida dos Carcinomas Invasivos da Mama	28
Tabela 7. Sistema de Classificação de Nottingham	29
Tabela 8. Subtipos moleculares de câncer de mama com seus respectivos fenótipos	32
Tabela 9. Características Epidemiológicas dos Tumores Triplo-Negativos.....	34
Tabela 10. Características morfológicas dos tumores triplo-negativos	36
Tabela 11. Resposta dos Tumores Triplo-Negativos aos Quimioterápicos	37
Tabela 12. Publicações sobre Claudinas ao longo dos anos	42

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CLDN	Claudina
OMS	Organização Mundial da Saúde
BRCA-1	Breast cancer gene 1
BRCA-2	Breast cancer gene 2
ALDH1	Aldeído Desidrogenase 2 (ALDEFLUOR)
RE+	Receptor de estrógeno
RP+	Receptor de progesterona
<i>HER-2</i>	Receptor do Fator de Crescimento Epidermal - tipo 2
CK+	Citoqueratinas
EGFR+	Receptor de fator de crescimento epitelial

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DA LITERATURA.....	16
2.1	Epidemiologia.....	16
2.2	Os subtipos do câncer de mama	25
2.3	Os tumores triplo-negativos.....	34
2.4	As Claudinas	38
3	JUSTIFICATIVA.....	52
4	OBJETIVOS.....	54
4.1	Objetivo Primário.....	54
4.2	Objetivos Secundários.....	54
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55
6	ARTIGO EM INGLÊS.....	61
	ABSTRACT.....	63
	INTRODUCTION	64
	MATERIALS AND METHODS	65
	Sample	65
	Clinicopathological data.....	66
	Tissue microarray	66
	Immunohistochemistry.....	66
	Claudins and E-cadherin Expression Evaluation	67
	Ki-67 and p53 Expression Evaluation.....	67

Statistical Analysis.....	67
RESULTS	68
Immunohistochemical Expression of Claudins and E-cadherin	70
Expression of Claudins and E-cadherin and clinicopathological parameters 71	
Analysis of survival curves	74
Overall survival	74
Disease-free survival	76
DISCUSSION	77
REFERENCES	82
7 ANEXOS	86

1 INTRODUÇÃO

A mama é o sítio primário neoplásico mais frequentemente acometido pelas mulheres no mundo. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), em 2010, demonstram que essa enfermidade ocupa o primeiro lugar na lista de mortalidade por câncer entre mulheres no mundo e o Brasil (1). Analisando as estatísticas do estado do Rio Grande do Sul, entre 1980 e 2002, é possível observar um alarmante aumento da mortalidade entre as mulheres por esse tipo de tumor (2).

O câncer de mama é reconhecido atualmente como uma doença heterogênea, pois apresenta grande diversidade genotípica e fenotípica. Esta heterogeneidade vem sendo muito estudada nas últimas décadas em função da descoberta de receptores hormonais como o Receptor do Fator de Crescimento Epitelial do tipo 2 (*HER2*), o receptor de estrógeno (RE) e o receptor de progesterona (RP) - os quais são importantes alvos terapêuticos da oncologia clínica atual. Entretanto, estudos indicam que até 15% das neoplasias de mama são triplo-negativas, ou seja, não expressam nenhum desses últimos três receptores acima citados (3-4).

A partir de 1998 foi identificada uma nova família de marcadores tumorais associada aos tumores triplo-negativos: as claudinas. Essas proteínas são integrantes da membrana plasmática celular e formam as *tight junction* das células epiteliais e endoteliais (5). A perda da interação célula-célula e célula-estroma parece ser responsável pela progressão das metástases, como é o caso da claudina 1 (6). A E-caderina é outra das moléculas de adesão celular, sendo relatado que pode estar relacionada com a invasão de células cancerosas (7).

Paradoxalmente, em alguns casos, a super-expressão das claudinas 3 e 4 predispõe ao câncer de mama. Recentemente, os estudos têm tentado relacionar as diferentes claudinas a fatores prognósticos e facilitadores de metástases. Elas podem representar no futuro uma nova via terapêutica para tumores triplo-negativos (8).

Este estudo busca determinar a expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 e da E-caderina em uma serie de 137 tumores de mama triplo-negativos e comparar a expressão das claudinas com dados clínico-patológicos e fatores prognósticos clássicos.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Epidemiologia

O câncer de mama é um importante problema de saúde pública tanto no Brasil quanto no mundo. Afinal, esse tumor é o sítio neoplásico com maior incidência nas mulheres atualmente. Segundo números da Organização Mundial da Saúde (OMS), foram estimados 1,38 milhões de casos novos desta neoplasia para o ano de 2008. Esse índice representa 23% de todos os novos casos de cânceres entre mulheres no mundo (1).

A neoplasia de mama, todavia, é considerada de relativa baixa letalidade (1). Como podemos observar na Tabela 1, o tumor mamário ocupa o primeiro lugar na lista de mortalidade por câncer entre mulheres na América do Sul e no mundo. Essa enfermidade, segundo a GLOBALCAN, deve se responsabilizar por 477 mil óbitos em 2008 (1).

Tabela 1. Incidência e Mortalidade mundial estimada para todos os cânceres em mulheres

Tipo de Câncer	Incidência	Mortalidade	Mortalidade/Incidência
Mama	1.384.155	458.506	33,13%
Colo-retal	571.204	288.654	50,53%
Cérvix Uterina	530.232	275.008	51,87%
Pulmão	515.999	427.586	82,87%
Estômago	348.571	273.489	78,46%
Útero	288.387	73.854	25,61%
Fígado	226.312	217.592	96,15%
Ovário	22. 4.747	140.163	62,36%
Tireóide	163.968	24.177	14,74%
Linfoma Não-Hodking	156.695	82.115	52,40%
Esôfago	155.400	130.526	83,99%
Outros tipos de cânceres	1.005.608	624.948	62,15%

Fonte: Adaptado de Globalcan, 2010 (1)

O carcinoma mamário apresenta um padrão discrepante de incidência e mortalidade entre as diferentes regiões do mundo. Conforme os dados da OMS, apresentados na Figura 1, a incidência do tumor mamário ainda é mais freqüente em países desenvolvidos. A mortalidade, todavia, apresenta comportamento inverso nos

países pobres. Nos países desenvolvidos, a incidência é de 68,4 para 100.000 mulheres e a mortalidade é de 15,3/100.000. A incidência nos países em desenvolvimento é comparativamente menor (27,3/100.000), enquanto o índice de mortalidade é de 10,8/100.000.

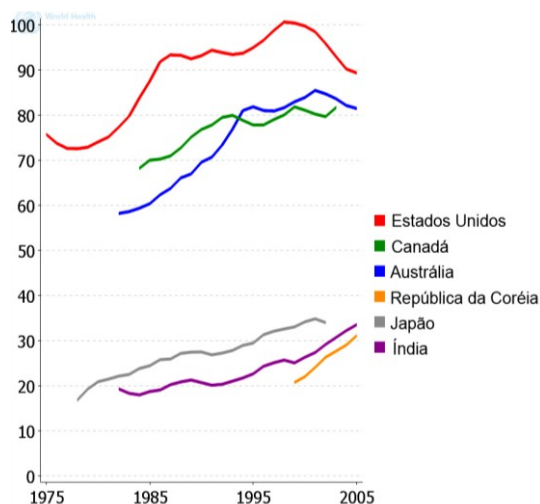
Figura 1. Incidência e Mortalidade de Câncer de Mama no mundo (por 100.000 mulheres)



Fonte: Ferlay, 2010 (1)

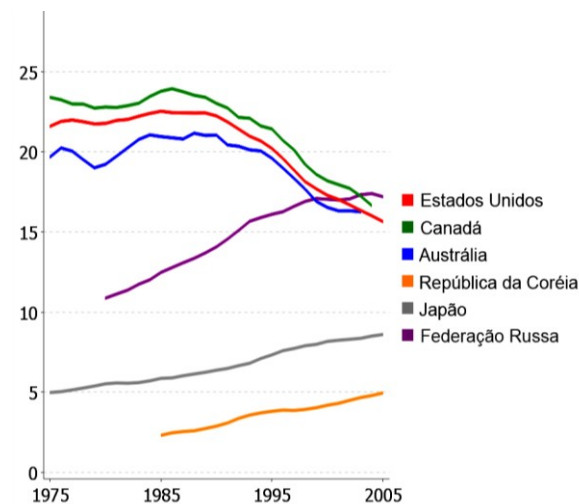
As regiões em ascensão econômica, conforme se nota nas Figuras 2 e 3 apresentam taxas de incidência e mortalidade por câncer de mama em franca elevação nas últimas décadas. Esse fato sugere que, apesar do enriquecimento das nações e da melhora da qualidade de vida da população, previamente considerados responsáveis pelo aumento da incidência dessa enfermidade, ainda existe baixo investimento para a prevenção e o tratamento do câncer de mama nesses locais. Esse evento é responsável, possivelmente, por essa grande taxa de mortalidade (1, 9). Não se pode esquecer a dificuldade de captação de dados nas regiões mais pobres do mundo, como a África. Nesses locais tanto a identificação quanto o armazenamento de indicadores de saúde pública parecem muito deficitários (1).

Figura 2. Incidência do câncer de mama estimada em países selecionados ao longo dos anos



Fonte: Ferlay, 2010 (1)

Figura 3. Mortalidade por câncer de mama estimada em países selecionados ao longo dos anos

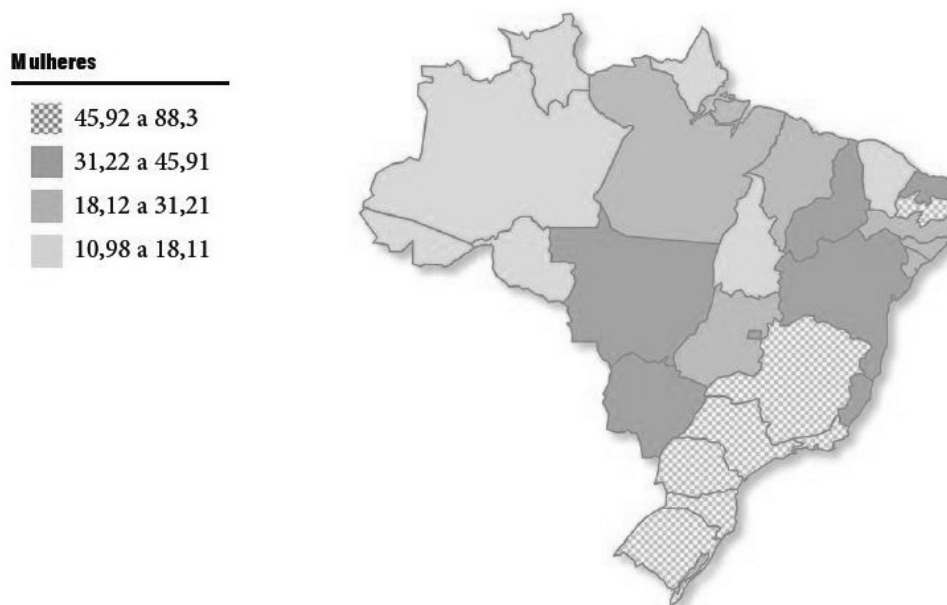


Fonte: Ferlay, 2010 (1)

Os elementos socioambientais relacionados com o processo de urbanização e o estilo de vida da sociedade moderna tais como o sedentarismo, o tabagismo e a alta ingestão alcoólica (9-10) são os maiores responsáveis pela alarmante incidência da neoplasia mamária entre os países com renda mais elevada. Os estudos de *Swerdlow e col.* entre irmãs-gêmeas demonstram importante associação entre o peso e a incidência de câncer de mama (11). Nesse sentido, é possível observar um impressionante crescimento dessa doença entre os países que estão adquirindo riquezas e hábitos ocidentalizados como Índia e Japão, respectivamente, conforme observamos na Figura 2.

As estatísticas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para 2010 (12) estimaram 49.240 casos novos de câncer de mama no Brasil. Dessa forma, o risco calculado seria de 49 casos novos a cada 100.000 mulheres. A incidência estimada para cada região pode ser vista na Figura 4.

Figura 4. Representação espacial das taxas brutas de incidência por 100 mil mulheres, estimadas para o ano de 2010, segundo a Unidade da Federação



Fonte: INCA, 2010 (12)

Entre as várias regiões do país há uma importante diferença no número absoluto de casos novos, à semelhança daquilo que se observa em escala mundial em relação à incidência do câncer de mama. Os estados do Sudeste, aqueles com maior renda na nação, apresentam um risco estimado de 65 casos novos por 100.000 mulheres. Dessa mesma forma, a região Sul tem uma incidência estimada de 64/100.000 casos de neoplasia de mama, representando o tumor mais freqüente nessa região, atrás apenas dos cânceres de pele não-melanoma. Já nas regiões Norte e Nordeste a incidência é menor, permanecendo entre 11 e 32 casos por 100.000 mulheres.

Analisando a Tabela 2 a respeito das estatísticas do Rio Grande do Sul sobre os tumores de mama, é possível observar uma alarmante incidência entre as mulheres residentes nesse estado. A estimativa do INCA para 2010 nesse estado é de 81,57 casos novos e de 127,71 casos a cada 100.000 mulheres em Porto Alegre (12). Fato que reitera a disposição prévia sobre a natureza urbana do câncer de mama.

O estudo de *Gonçalves e col.* (13) sobre a epidemiologia dos tumores da mama sugere que no Rio Grande do Sul essa elevada incidência pode estar relacionada à formação sócio-demográfica dessa região. O Rio Grande do Sul, de

acordo com as estatísticas do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), encontra-se em posição privilegiada quando se analisam indicadores sociais para todas as regiões brasileiras (14-15). A formação racial desse local é composta por grande número de descendentes de europeus. O artigo de *Harper e col.* (16) sugere maior número de casos de câncer de mama entre as mulheres brancas. Acredita-se que alguma alteração intrínseca, ainda pouco conhecida da genômica racial dessas mulheres, as coloque em ser situação de maior susceptibilidade para a neoplasia mamária.

Tabela 2. Estimativa do INCA para 2010 das taxas brutas de incidência por 100.000 e de número de casos novos por câncer, em mulheres, segundo localização primária, no Brasil, Rio Grande do Sul e Porto Alegre (números arredondados para 10 ou múltiplos de 10)

Localização primária da neoplasia maligna	Estimativa dos Casos Novos					
	Brasil		Rio Grande do Sul		Porto Alegre	
	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta	Casos	Taxa Bruta
Mama feminina	49.240	49,27	4.750	81,57	1.040	127,71
Colo do útero	18.430	18,47	1.250	21,53	210	25,55
Cólon e reto	14.800	14,80	1.610	27,69	360	44,45
Traqueia, brônquio e pulmão	9.830	9,82	1.250	21,43	240	29,74
Estômago	7.680	7,70	560	9,57	90	11,25
Leucemias	4.340	4,33	350	6,01	60	7,21
Cavidade oral	3.790	3,76	250	4,38	60	7,41
Pele melanoma	2.970	2,92	450	7,68	70	9,02
Esôfago	2.740	2,69	420	7,18	40	5,58
Outras localizações	78.770	78,83	8.860	152,17	1.920	236,28
Subtotal	192.590	192,74	19.750	339,21	4.090	503,32
Pele não melanoma	60.440	60,51	4.660	80,12	490	60,23
Todas as neoplasias	253.030	253,23	24.410	419,19	4.580	564,13

Fonte: Adaptado de INCA, 2010 (12)

A prevenção primária do tumor mamário não é inteiramente plausível devido à intrincada rede de fatores de risco participantes de sua etiologia. Não obstante, apesar da falta de consenso sobre os programas de rastreamento (17-18), o diagnóstico mamográfico e o exame clínico da mama são as estratégias

recomendadas para controle desse tipo de câncer pelo Ministério da Saúde do Brasil.

Dessa forma, o *Consenso para Controle do Câncer de Mama do INCA (19)*, considera como principais estratégias de rastreamento um exame radiográfico das mamas - pelo menos a cada dois anos - para mulheres de 50 a 69 anos e o exame clínico anual mamário, para a população feminina de 40 a 49 anos. No caso especial de mulheres pertencentes a grupos populacionais com risco elevado de desenvolver câncer de mama recomenda-se o exame clínico da mama e a mamografia, anualmente, a partir de 35 anos. Essas mulheres são aquelas com história familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau com menos de 50 anos, doença bilateral ou câncer de ovário; qualquer caso de câncer de mama masculino na família e a população de mulheres com diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular *in situ*. Um resumo das estratégias de rastreamento pode ser visualizado na Tabela 3.

Tabela 3. Quadro-Resumo do Rastreamento Preconizado para o Câncer de Mama no Brasil

	Medidas de Rastreamento
< 49 anos	✓ Exame clínico anual da mama
50 a 69 anos	✓ Exame clínico anual da mama ✓ Mamografia pelo menos a cada dois anos
<p><i>Alto Risco</i></p> <ul style="list-style-type: none"> • História familiar de câncer de mama em parentes de primeiro grau com menos de 50 anos • Doença bilateral ou câncer de ovário • Diagnóstico histopatológico de lesão mamária proliferativa com atipia ou neoplasia lobular <i>in situ</i> • Câncer de mama masculino na família 	<ul style="list-style-type: none"> ✓ Exame clínico da mama ✓ Mamografia anual a partir dos 35 anos

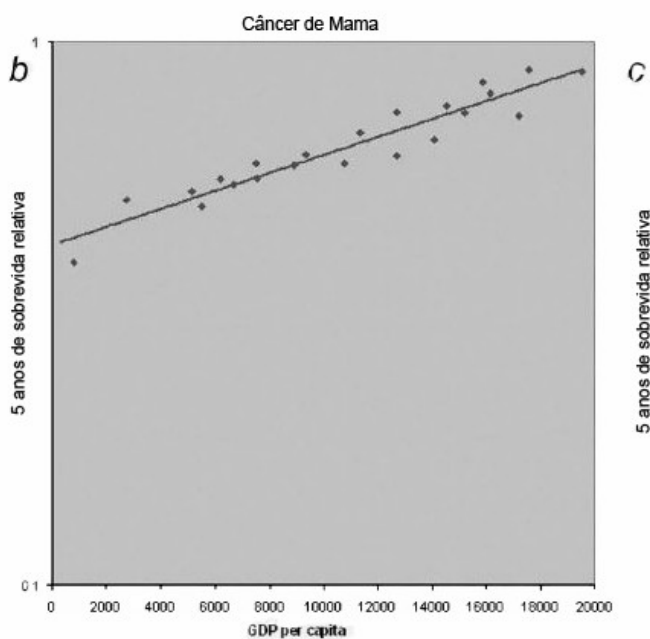
Fonte: Baseado no *Consenso para Controle do Câncer de Mama do INCA - 2004 (19)*

A mortalidade do câncer de mama para 2010 foi estimada em aproximadamente 12% (1), apesar de o arsenal terapêutico disponível no Brasil estar bastante avançado (19). Os dados mostram uma importante diferença de mortalidade entre as classes sociais brasileiras. Essa evidência alude que, provavelmente, a disparidade social permanece como um obstáculo fundamental ao

acesso das mulheres pobres para prevenção e tratamento dos tumores mamários (16).

Nos dados da Figura 4 é possível observar uma relação entre a realidade financeira individual das pacientes com câncer de mama e a sobrevivência dessas mulheres. Estudos indicam que as mulheres de classes sociais mais carentes apresentam maior mortalidade, pois iniciam tratamento em estágios mais avançados da doença e têm menor acesso à rede terapêutica (16). Assim sendo, na população mundial, a sobrevivência média após cinco anos é de 61%, sendo que para países desenvolvidos essa sobrevivência aumenta para 73%. Já nos países em desenvolvimento a sobrevivência fica em 57% (12).

Figura 4. Relação entre Renda *per capita* e sobrevivência em 5 anos



Fonte: Ferlay, 2010 (1)

Assim sendo, devido à significativa importância do câncer de mama na sociedade atual, diversos estudos têm sido propostos na tentativa de diminuir o impacto desta doença tanto na morbimortalidade quanto nos custos gerados aos sistemas públicos de financiamento de saúde (17-18).

Estudos de novos modelos para otimizar o orçamento empenhado para o combate da neoplasia mamária no Brasil e no Rio Grande do Sul demonstram o alto

custo isolado e proporcional para o rastreamento e também para a correção cirúrgica do câncer de mama no país e no estado em questão (ver Tabela 4).

Tabela 4. Custo do Câncer de Mama no Brasil e no Rio Grande do Sul em 2009

	<i>Brasil</i>	<i>Rio Grande do Sul</i>
Procedimentos Cirúrgicos	R\$ 98.766.859,00	R\$ 4.222.711,00
Cirurgias de Mama	R\$ 1.710.802,80	R\$ 9.667,56
Procedimentos diagnósticos	R\$ 36.609.154,00	R\$ 32.816.000,00
Mamografias de Rastreamento	R\$ 47.810.700,00	R\$ 3.943.620,00

Fonte: Adaptado de Caderno de Indicadores de Saúde (20)

O câncer de mama pode ser explicado por uma conjunção bastante complexa de fatores de risco, os quais incluem múltiplos componentes pessoais (9), reprodutivos (21) e, até mesmo ambientais (10).

Embora 90% dos tumores da mama sejam causados por mutações somáticas adquiridas e não se relacionam à história familiar, a avaliação de risco individual inicia pelos fatores genéticos (22). Esses são primariamente identificados através da história prévia pessoal ou familiar positiva para tumores de mama e/ou ovário. Alterações em inúmeros locais do genoma produzem um fenômeno complexo de suscetibilidade genética para essa doença. Nesse contexto, algumas síndromes oncogênicas, como Síndrome de Li-Fraumeni e de Cowden, por exemplo, compreendem importantes fatores predisponentes para múltiplas neoplasias – inclusive de mama (22).

Dentre as síndromes familiares, a Síndrome Hereditária de Câncer de Mama e Ovários é uma doença autossômica dominante responsável pela maioria dos tumores de mama de etiologia genética. Os genes supressores tumorais *BRCA1* e *BRCA2* estão envolvidos na gênese dessa enfermidade. Esses genes estão envolvidos no reparo cromossômico em resposta à quebra do filamento duplo de DNA. Mutações nesses genes podem também ocorrer na população em geral na proporção de aproximadamente 1/800 pessoas (23).

Algumas populações apresentam incidência maior de mutações específicas nesses genes – como os Judeus Ashkenazi do leste americano – os quais possuem esses genes mutados em até 1/40 indivíduos (23). A penetrância *dos BRCA* 1/2 é

variável. Sendo assim, a presença de mutação nesses sítios genéticos pode aumentar a chance média individual de um portador desenvolver câncer de mama de forma variável, podendo atingir até 86% (24).

Diversos fatores de risco reprodutivos estão relacionados ao câncer de mama e estão listados juntamente aos seus riscos relativos (RR) ou *odds ratio* (OR) na Tabela 5. Os estudos indicam que a menacme longa, ou seja - menarca precoce e menopausa tardia - está relacionada com maior incidência de câncer de mama. A principal hipótese é a de que a cada ciclo menstrual a mama seria induzida à proliferação. Dessa forma, um número maior de ciclos aumentaria a susceptibilidade à mutações no tecido mamário (25-26).

A nuliparidade aumenta o risco para desenvolver essa doença, ao passo que número maior de gestações tem um efeito protetor para o câncer de mama (9, 25). Nessa mesma linha, a idade avançada da primeira gestação corresponde a um relevante componente de predisposição ao câncer de mama (9). Esse fato pode ser explicado pela alteração fundamental provocada pela gravidez na arquitetura e na biologia da glândula mamária (26).

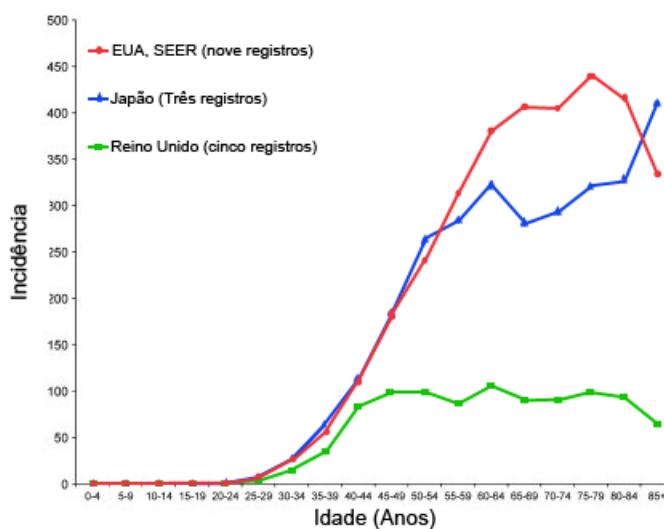
A amamentação representa também importante fator protetor contra o desenvolvimento da neoplasia mamária. Atualmente, credita-se este efeito antineoplásico à significativa diferenciação secretora do epitélio da mama induzida pela lactação e à interrupção dos ciclos menstruais provocada pelo aleitamento (10, 21). Por fim, reposição hormonal e o uso prolongado de anticoncepcional oral também estão relacionados com maior incidência desse câncer nas mulheres (10, 27).

Tabela 5. Quadro-resumo dos fatores reprodutivos

	Fatores de Risco	Fatores Protetores
Menarca (<12 anos)	RR 1,00	
Menopausa (>55 anos)	RR 1.20	
Nuliparidade	RR 1.64	
Número de Gestações (> 4)		RR 0.31
Idade da primeira gestação (> 35 anos)	RR 2.12	
Amamentação		OR 0.8

Fonte: Adaptado de Tamakoshi, 2005 (21) e Jordan, 2009 (9); RR (*Risco Relativo*)/ OR (*Odds Ratio*)

Por fim, é fundamental observar que o Diabetes Melito agrega risco para tumores da mama (9). Porém, a idade permanece como um dos principais de fatores de risco para os tumores da mama, como o observado na Figura 5.

Figura 5. Incidência do Câncer de Mama de acordo com a idade nos USA, Japão em Reino Unido em 2002

Fonte: Iwasaki, 2005 (10)

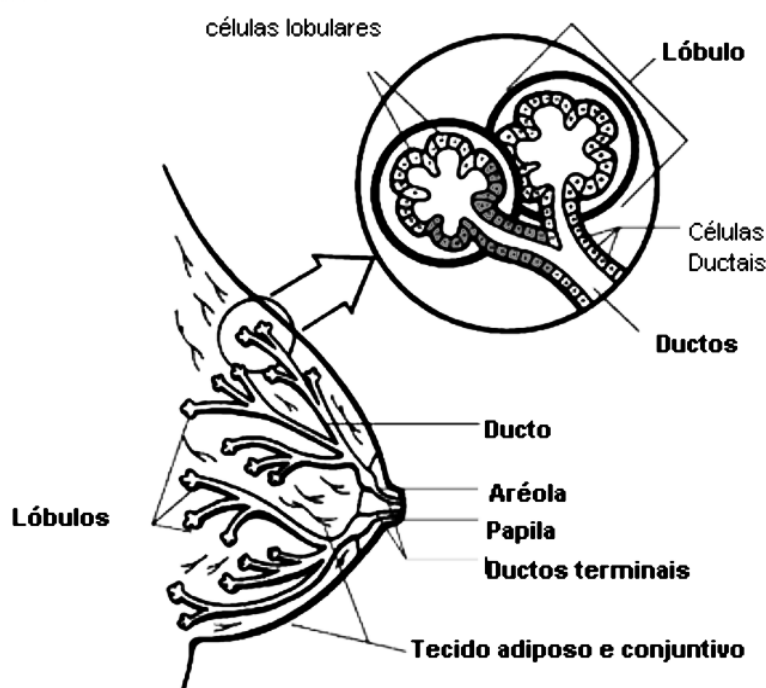
2.2 Os subtipos do câncer de mama

A neoplasia de mama é considerada atualmente uma doença heterogênea com múltiplas apresentações fenotípicas e biológicas. Esta heterogeneidade, no

entanto, já havia sido identificada em 1896 pelo cirurgião escocês originário de Glasgow: George Thomas Beatson (1848–1933). Ele identificou que a ooforectomia bilateral era terapêutica para algumas pacientes com neoplasia de mama, mas não para outras com esse mesmo mal. Mesmo assim, a retirada dos ovários tornou-se por muitos anos medida realizada por muitos cirurgiões com valor paliativo para o tratamento do tumor mamário (28).

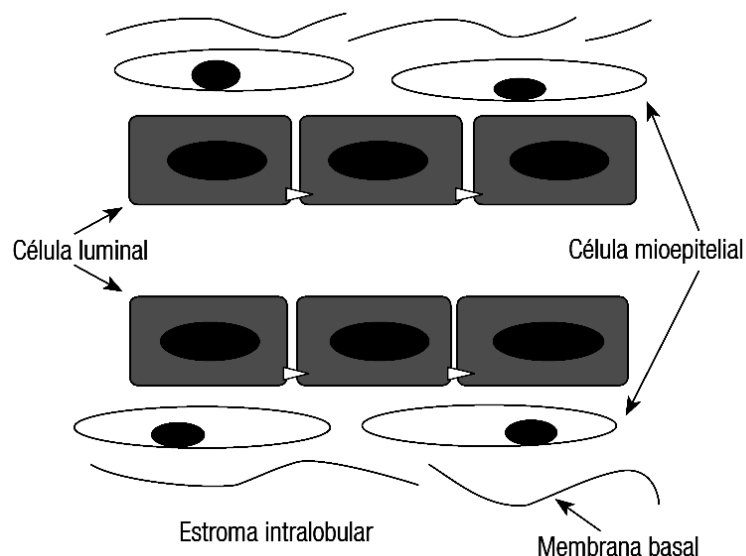
Para estudar a classificação histomorfológica dos tumores mamários, é importante lembrar a estrutura da mama. Esse órgão glandular encontra-se localizado bilateralmente sobre os músculos peitorais maiores. Ela exerce função apócrina de produção láctea quando recebe correta estimulação neuroendócrina. A estrutura básica dessa glândula são as unidades terminais ducto-lobulares (Figura 6). Os ductos mamários são compostos por 3 zonas celulares – epitélio luminal, estroma intralobular e mioepitélio (29) (Figura 7).

Figura 6. Estrutura Morfológica do Câncer



Fonte: Adaptado de Rotinas em Mastologia, 2007 (30)

Figura 7. Histologia esquemática do Epitélio Mamário



Fonte: Baseado em Fernandes, 2009 (31)

A maior parte das neoplasias da mama é derivada das unidades terminais ducto-lobulares das mamas. O carcinoma invasivo da mama é aquele em que as células tumorais rompem a membrana basal dos ductos e lóbulos e invadem os tecidos vizinhos, ou seja, a gordura e tecido conjuntivo. Esse tumor é caracterizado como um tumor epitelial maligno com alta tendência à invasão de tecidos adjacentes e à disseminação de metástases a distância (32).

Em 2003, a OMS lançou uma atualização da histologia dos tumores mamários (32). A Tabela 6 apresenta um quadro-resumo desse sistema de classificação.

Tabela 6. Classificação Histomorfológica Resumida dos Carcinomas Invasivos da Mama

Tumores Ductais invasivos	Papilares invasivos
Lobular invasivo	Micropapilares invasivos
Tubular	Tumor Filóide
Cribiforme invasivo	Tumor Inflamatório
Medular	Metaplásico
Tumores Mucinosos	Secretório
Tumores Neuroendócrinos	

Fonte: Baseado em Tavassoli, 2003 (32)

Os tumores são graduados histologicamente de acordo com a similaridade microscópica das células malignas com o tecido mamário normal. O sistema de graduação subdivide os tumores em bem (Grau 1), moderadamente (Grau 2) e pouco diferenciados (Grau 3), refletindo que a perda de diferenciação está relacionada a pior prognóstico.

O Sistema de Graduação de Nottingham, desenvolvido há mais de 20 anos e utilizado para a classificação do câncer de mama leva em conta o padrão tubular de crescimento do tumor, o pleomorfismo nuclear e a velocidade de proliferação das células malignas (33). Um escore parcial é dado para cada um destes 3 critérios e adicionados para formar um escore final que corresponde ao grau, como demonstrado na Tabela 7.

Tabela 7. Sistema de Classificação de Nottingham

Pleomorfismo Nuclear	Índice Mitótico	Formação Tubular
Células pequenas, uniformes e regulares 1	0-9 Mitoses/10 1	Maioria do Tumor (>75%) 1
Moderado tamanho nuclear e variações nucleares 2	10-19 Mitoses/10 2	Moderada quantidade (10-75%) 2
Marcada variação nuclear 3	20 ou > Mitoses/10 3	Pouca ou nenhuma (<10%) 3
$I = 0,2 \times \text{Tamanho Tumoral (cm)} + \text{Estádio de Linfonodos}^* + \text{Grau Histológico}$		
* Linfonodos (LN): 0 LN + = 1 / 1-3 LN + = 2 / >3 LN + ou pelo menos 1 LN+ no nível 3 = 3)		
Índice Prognóstico de Nottingham (P):		
✓ P ≤ 3,4 - bom prognóstico (Mortalidade 3% ao ano; Sobrevida em 15 anos - 81%)		
✓ P 3,4 a 5,4 - intermediário (Mortalidade 7% ao ano)		
✓ P ≥ 5,4 - mau prognóstico (Mortalidade 30% ao ano; Sobrevida em 15 anos - 16%)		

Fonte: Baseado em Todd *et al*, 1987 (33)

No final da década passada, surgiram pesquisas demonstrando que a classificação puramente morfológica do câncer de mama impossibilitava tratar todos os pacientes com sucesso (34). Essas observações reconheciam que casos com mesmo diagnóstico e estadiamento histológico apresentavam, muitas vezes, desfechos clínicos marcadamente diferentes.

Foi com o desenvolvimento de novas técnicas de análise molecular, a partir da década de 90, que se iniciou um processo fundamental para desvendar as diferenças genéticas existentes entre os diversos tumores originários do tecido mamário. A introdução das técnicas de mapeamento das expressões genéticas de tecidos, os microarranjos de *DNA*, possibilitou medidas simultâneas de milhares de genes para criar uma matriz molecular dos cânceres de mama (35).

A caracterização do perfil desses carcinomas, por conseguinte, tem avançado significativamente nos últimos anos. A separação prognóstica atual dos tumores mamários leva em conta a organização clássica dos grupos histológicos e os

subtipos moleculares, descritos inicialmente pelo grupo de Perou há 12 anos (35-36).

É importante compreender que essa heterogeneidade celular e gênica do câncer de mama se relaciona ao grande número de genes envolvidos no controle do crescimento, no metabolismo, na diferenciação e na morte celular. Os estudos de *Stingl e col.* sugerem que a expressão molecular de cada tipo tumoral propicia variações fundamentais de resposta aos quimioterápicos existentes (37). Atualmente são reconhecidos 5 (cinco) subtipos moleculares diferentes e um grupo *normal-like* de tumores da mama. Os subtipos luminais são assim chamados por expressarem genes presentes no epitélio luminal mamário normal. Esses tumores representam a maioria dos cânceres de mama - quase 60% de todos os carcinomas invasivos mamários. Os luminais são ainda subdivididos em 2 grupos: o luminal A e o luminal B. O grupo dos luminais A representa aproximadamente 40% dos cânceres de mama. Tais tumores expressam tipicamente receptores hormonais para estrógeno (RE) e/ou progesterona (RP) e as citoqueratinas 8 e 18, essas últimas características das células normais do epitélio luminal mamário (34). As células tumorais classificadas como luminais A apresentam vantagem intrínseca na sobrevida sobre todos os outros subtipos moleculares. Pode-se apontar como um dos motivos do melhor prognóstico desses tipos tumorais, além do privilégio inerente desse grupo, a descoberta do tamoxifeno – uma molécula anti-estrógeno capaz de agir especificamente nas células tumorais ricas em receptores deste hormônio (34, 38).

Um terceiro subtipo é aquele chamado *HER2 overexpressed*. Esses tumores ocupam até 15% de todos os tumores da mama. A composição gênica desse grupo é bastante peculiar. Esses tumores apresentam superexpressão do proto-oncogene do receptor-2 do fator de crescimento epidérmico humano (*HER2*) e quantidade variável dos receptores hormonais (39).

O subgrupo *HER2 overexpressed* é heterogêneo em relação à resposta à terapêutica quimioterápica e às medicações baseadas em terapias-alvo (40). Ainda assim, o prognóstico desses tumores se alterou substancialmente há aproximadamente duas décadas. No início da década de 1990 foi desenvolvido um anticorpo monoclonal anti-*HER2*-humanizado, chamado Trastuzumab, o qual se liga com grande afinidade ao domínio extracelular do *HER2*. Esta medicação inibe a transmissão de sinais de estimulação ao crescimento das células tumorais (41).

O outro subtipo molecular chama-se *basal-like*. Análises preliminares indicam que essas neoplasias representam de 15 a 20% dos carcinomas mamários (36). Sabe-se que, em geral, esse tipo tumoral não expressa citoqueratinas do epitélio luminal, os receptores hormonais, e tampouco expressa *HER2*. Seu padrão de expressão molecular é positividade ao receptor de fator de crescimento epitelial (EGFR) e as citoqueratinas 5, 6, 14 e 17 (42). Ainda que sejam entidades distintas, não estão plenamente elucidadas as diferenças entre esses tumores e os chamados triplo-negativos, ou seja, aqueles que não expressam RE, RP e/ou *HER2* (43).

Recentemente, foi sugerida a inclusão de um novo subtipo molecular de câncer – o *claudin-low* (44), o qual é responsável por em torno de 7 a 14% dos tumores da mama. Acredita-se que a expressão gênica desses tumores é semelhante àquela das células-tronco: CD44+/CD24-. O exame da sobrevida dos pacientes com esses marcadores não parece demonstrar aumento importante na mortalidade comparado com outros subtipos de tumores triplo-negativos (45) e, portanto, sua real importância prognóstica é ainda debatida.

O chamado grupo *Normal Breast-like* não é ainda considerado um subtipo, visto que não há uniformidade no padrão de expressão desses tumores. Estudos questionam a existência dessa entidade, pois essas neoplasias podem, inclusive, representar amostras de tecidos mamários normais equivocadamente classificadas nos bancos tumorais (46). De qualquer maneira, é prudente aguardar os resultados das muitas pesquisas atuais a respeito do espectro gênico e do prognóstico desse grupo de tumores (40).

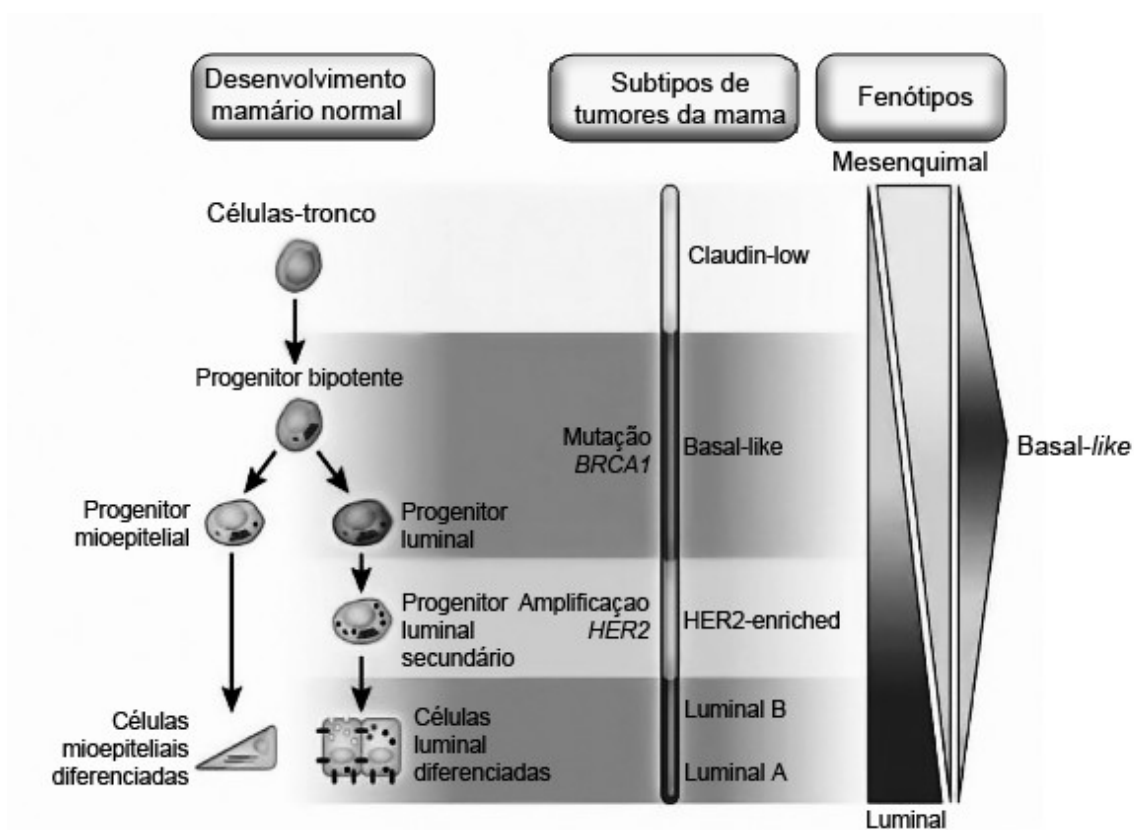
A Tabela 8 mostra um quadro-resumo dos subgrupos moleculares dos carcinomas de mama, citando os autores que inicialmente descreveram cada uma dessas categorias (36, 45). Ainda permanecem muitas dúvidas quanto à classificação molecular desses tumores. Não existe uma uniformidade na interpretação dos autores a respeito dos resultados de muitos estudos.

Tabela 8. Subtipos moleculares de câncer de mama com seus respectivos fenótipos

Subtipos	Fenótipo	Autores
Luminal A (40%)	RE+ e/ou RP+/ <i>HER2</i> -	Perou, 2000 (35) Sorlie, 2001 (47)
Luminal B (20%)	RE+ e/ou RP+/ <i>HER2</i> +	Perou, 2000 (35) Sorlie, 2001 (47)
<i>HER2-overexpressed</i> (10-15%)	RE-/ RP-/ <i>HER2</i> +	Perou, 2000 (35)
<i>Basal-like</i>	RE-/ RP-/ <i>HER2</i> - ou +/ CK 5,6,14,17+/ EGFR+	Perou, 2000 (35) Carey, 2006 (48)
<i>Claudin-Low</i> (7-14%)	Claudin 3,4,7^{low}/ E-Caderin^{low}	Herschkowitz, 2007(44)
<i>Normal-like</i>	Sem identificação homogênea	Perou, 2000 (35)
Triplo-negativo	RE-/ RP-/ <i>HER2</i>-	Carey, 2004/2007 (49) Haffty, 2006 (50)

Os estudos de *Stingl e Prat e col.* (3, 37) indicam que os tumores mamários derivam todos de um mesmo tipo de célula-tronco da mama. Esse fato é comparado aos tumores hematológicos, cuja classificação se baseia no reconhecimento das mutações pelas quais passaram as células cancerígenas para se diferenciarem da linhagem celular original. Dessa forma, alterações na expressão gênica dessas células mamárias precursoras causariam a evolução fenotípica desses tumores, como esquematizado na Figura 8.

Figura 8. Desenvolvimento Molecular da Célula Tumoral de Mama



Fonte: Adaptado de Perou, 2011

Esse mecanismo de expressão gênica ainda não é totalmente elucidado. Sabe-se que as células tronco-tumorais da mama expressam as proteínas CD44 e ALDH1 (Aldeído Desidrogenase 1) em alta quantidade e, em mínima contagem, expressam as moléculas CD24 (51).

Nos dias atuais, o tratamento do câncer de mama é realizado cada vez mais por meio de terapias-alvo, portanto é fundamental a identificação do perfil genético da amostra individualizada de cada paciente. Neste sentido, tem sido utilizadas as técnicas moleculares como *Mamaprint*® (Agendia, Amsterdam, Holanda) e *OncotypeDX*® (Genomic Health Inc, Redwood City, Estados Unidos) para prever resposta terapêutica e definir risco de recorrência tumoral antes de se iniciar com as medidas quimioterápicas. (38).

2.3 Os tumores triplo-negativos

Os tumores triplo-negativos são um grupo de neoplasias de mama extensamente estudado, pois apresentam características moleculares, histológicas e clínicas bastante distintas entre os carcinomas invasivos da mama. Os cânceres triplo-negativos são definidos pela ausência de expressão dos receptores de estrógeno e de progesterona e pela de expressão nula de *HER2* (52).

Estima-se que em torno de 10 a 17% das mulheres com câncer de mama apresentam tumores triplo-negativos. Esses valores variam dependendo dos critérios utilizados para definir positividade dos receptores hormonais e do *HER2* (43).

As neoplasias triplo-negativas são notáveis por uma relevante diferença prognóstica se cotejadas com as demais doenças malignas da mama. Esses tumores acometem mulheres mais jovens em geral na pré-menopausa, são mais comuns em afro-descendentes e nas pacientes portadoras de mutações nos genes *BRCA 1* e *2* (48, 50). Um estudo de 2010 analisou uma população brasileira com câncer de mama, mostrando uma maior prevalência do fenótipo triplo-negativo em afro-descendentes, quando comparadas com mulheres brancas (53). As características epidemiológicas dos tumores triplo-negativos estão apresentadas na Tabela 9.

Tabela 9. Características Epidemiológicas dos Tumores Triplo-Negativos

	Tumores Triplo-Negativos	Outros	P value
Idade (< 50 anos)	62%	45%	0,002
Raça (Negras)	21%	11%	0,0172
História Familiar de Câncer de Mama (História Moderada a Forte)	45%	40%	0,001
Mutação em <i>BRCA1</i>	25,9%	1,7%	0,001
Mutação em <i>BRCA2</i>	3,7%	8,6%	> 0,99

Fonte: Adaptado de Haffty, 2006 (50)

De acordo com o site de pesquisa *Web of Science*, foram publicados 1.523 artigos a respeito desse grupo de cânceres de 1993 a janeiro de 2012 (54). O termo triplo-negativo apareceu na literatura médica em um abstract encabeçado por Lysa

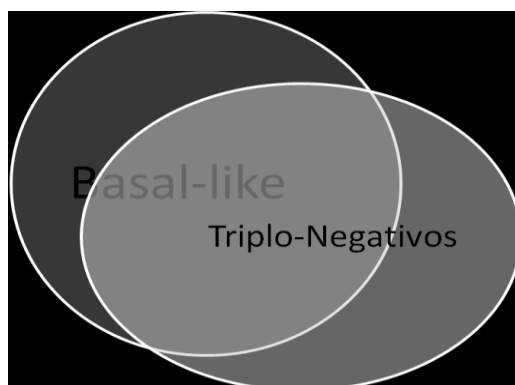
Carey em 2004, o qual foi apresentado no *27th Annual Charles A Colman San Antonio Breast Cancer Symposium*.

Essa pesquisa foi posteriormente publicada em 2007 e relatava a diferença de resposta aos quimioterápicos neoadjuvantes entre os subtipos *basal-like* e os *HER2+*. A maioria dos pacientes que expressavam *HER2+* respondeu completamente à quimioterapia. Ainda assim, aqueles que eram *basal-like* e *HER2-* negativos tinham pior prognóstico, o paradoxo do triplo-negativo (49).

Inicialmente o grupo de neoplasias chamado triplo-negativo foi reconhecido como sinônimo para o fenótipo *basal-like* (55). Esse último grupo foi descrito pelo *Carolina Breast Cancer Study*, no ano de 2000 (35, 48). Dent e col., em 2007, concluíram que a maioria dos tumores triplo-negativos apresenta fenótipo *basal-like* e que a maioria dos tumores *basal-like* era classificada como triplo-negativa (55-56).

Como podemos observar na Figura 9, os tumores *basal-like* representam 10%-25% de todos os tumores. Contudo, cerca de 50%-75% dos tumores de células basais apresentam expressão molecular triplo-negativa (3, 57).

Figura 9. Diagrama esquemático dos tumores triplo-negativo versus os *basal-like*



Admite-se que os tumores *basal-like* são derivados de um tipo de célula em estágio posterior de desenvolvimento do tecido mamário ao das células-tronco da mama (37, 40). Sabe-se que essas neoplasias são marcadas pela expressão de vários genes expressos nas células mioepiteliais ou basais: *RE- / RP- / HER2-ou+ / CK 5, 6, 14, 17+ / EGFR+* (48, 58). No entanto, análises do subgrupo *basal-like* revelaram que em torno de 15-54% desses tumores expressa pelo menos um dos marcadores hormonais ou *HER2* (43).

É possível observar que os tumores do tipo basal e os triplo-negativos têm prognóstico semelhante, quando comparados com os outros carcinomas de mama. Por outro lado, estudos indicam que pacientes com tumores triplo-negativos do subtipo *basal-like* apresentam tempo de sobrevida livre de doença menor que os pacientes que perderam os marcadores do tipo basal (59). Como podemos observar na Tabela 10 a maioria dos tumores triplo-negativos exibe histologia ductal invasiva e alto grau histológico (56).

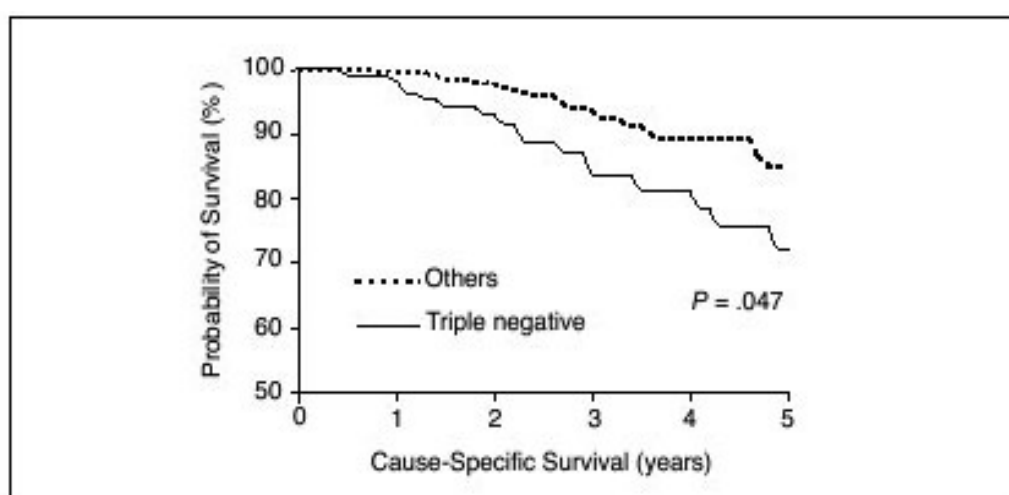
Tabela 10. Características morfológicas dos tumores triplo-negativos

	Tumores Triplo-Negativos	Outros
Histologia (Ductal)	85% ($P = 0,01$)	84%
Tamanho do Tumor (T2)	42% ($P < 0,0001$)	21%
Grau tumoral (Grau III)	66% ($P < 0,0001$)	28,3%

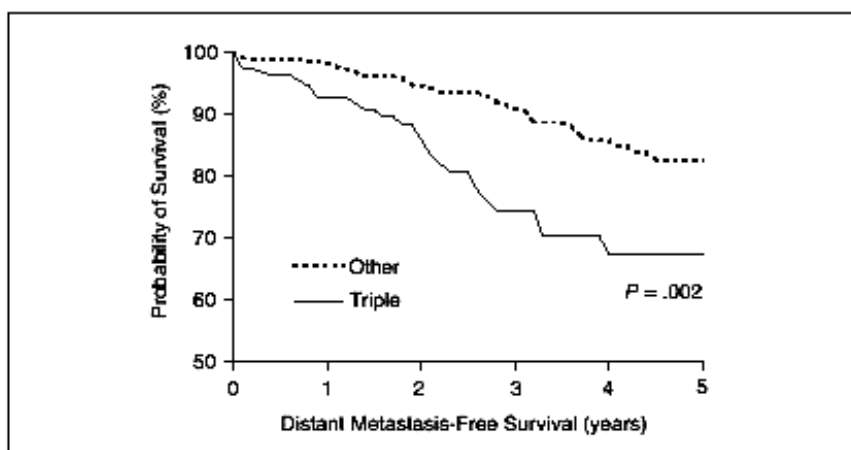
Fonte: Adaptado de Haffty, 2006 (50) e Dent, 2007 (56)

Os estudos de *Haffty* e col., em 2006, sugerem que, apesar do uso de quimioterapia sistêmica adjuvante, o prognóstico dos tumores triplo-negativos é ruim. A Figura 10 e a Figura 11 mostram os piores resultados dos carcinomas triplo-negativos quando confrontados com os demais tumores da mama (50).

Figura 10. Mortalidade dos Tumores Triplo-Negativos ao longo dos anos



Fonte: Haffty, 2006 (50)

Figura 11. Tempo Livre de Metástases dos Tumores Triplo-Negativos ao longo dos anos

Fonte: Haffty, 2006 (50)

Os tumores triplo-negativos, por serem tumores agressivos e de pior prognóstico, despertam especial interesse para o desenvolvimento de alternativas de tratamento menos invasivas e que aumentem a sobrevida das pacientes acometidas (40). Conforme observamos na Tabela 11 esses tumores se diferenciam dos outros por apresentarem resposta importante aos quimioterápicos adjuvantes (50, 56).

Tabela 11. Resposta dos Tumores Triplo-Negativos aos Quimioterápicos

	<i>Tumores Triplo-Negativos</i>	<i>Outros</i>
Resposta à Quimioterapia Adjuvante	69% ($P < 0,0001$)	41,6%
Baixa Resposta ao Tamoxifeno	7,3% ($P < 0,0001$)	57,8%

Fonte: Haffty, 2006 (50)

O estudo de Carey e col., em 2007 relatou uma sensibilidade importante desses tumores aos tratamentos neoadjuvantes – doxorrubicina e ciclofosfamida (49). A resposta à quimioterapia pré-operatória, ou seja, neoadjuvante, foi indicada como um forte fator preditivo de sobrevivência nas pacientes com esses tumores. O grupo de tumores triplo-negativo positivos para CK 5/6 e/ou EGFR apresentou menor benefício com uso de antraciclinas que o grupo negativo para os marcadores hormonais, HER2 e para CK 5/6 e/ou EGFR (60).

Ainda não há uma completa diferenciação entre os carcinomas triplo-negativos e aqueles do subtipo basal-like. Aproximadamente 70% dos tumores

basal-*like* tem expressão molecular semelhante a dos triplo-negativos. Esses dois grupos se sobrepõem em alguns pontos, tais como um pior prognóstico e mau resultado às terapias-alvos. Outros subtipos tumorais também não expressam os receptores de estrógeno e progesterona, nem o *HER2* (58).

Em resumo, as neoplasias triplo-negativas são um grupo de tumores marcadamente heterogêneo em sua classificação clínica e histológica. Ainda há muitas questões práticas a serem solucionadas, incluindo os critérios classificatórios desses tumores. Atualmente, é aceita a idéia que os tumores triplo-negativos não representam um subtipo, e sim, uma característica fenotípica (3, 43).

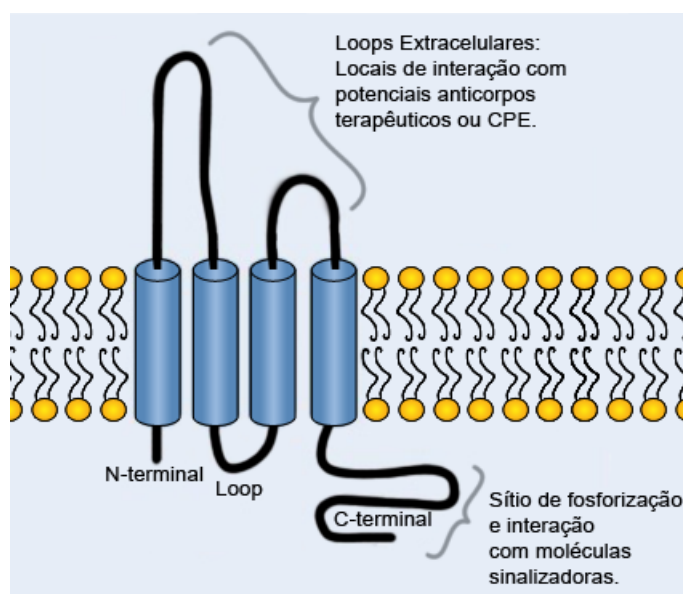
2.4 As Claudinas

A avaliação do papel das claudinas na carcinogênese da mama tem sido investigada mais intensamente na última década (61). As claudinas foram primeiramente descritas por *Furuse e col.* (5, 62), em 1998, como uma nova família de proteínas das junções ocludentes. Até esse estudo, as ocludinas eram as únicas proteínas integrais da membrana conhecidas nas *tight junctions*.

As primeiras claudinas foram identificadas no fígado das galinhas, assim como as ocludinas. Neste estudo, as claudinas 1 e 2 foram identificadas por imunofluorescência e microscopia imunoeletrônica como constituintes das fitas das *tight junctions* (sozinhas ou em combinação com as ocludinas). Esse estudo revelou ainda que a estrutura molecular das *tight junctions* eram mais complexas do que o esperado e que essas eram compostas tanto por ocludinas quanto por claudinas (5, 62).

O conhecimento sobre as claudinas evoluiu e hoje esta família compreende 24 moléculas identificadas como proteínas integrais de membrana nas *tight junction* das células epiteliais e endoteliais. Os genes das claudinas codificam proteínas de 20 a 27 kDa, estruturalmente muito semelhantes, com 4 domínios transmembrana, 2 loops extracelulares e caudas intracelulares amino e carboxi-terminal (Figura 12). A E-caderina é outra das moléculas de adesão celular, sendo relatado que também pode estar relacionada com a invasão de células cancerosas (7).

Figura 12. Estrutura esquemática das claudinas

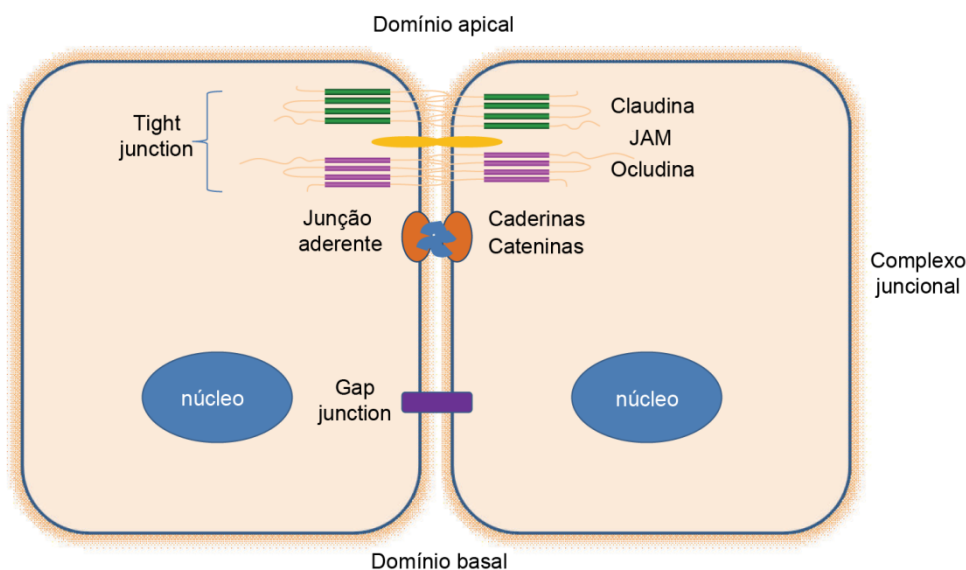


Fonte: Adaptado de Davidson, 2010 (63).

As claudinas participam das *tight junction* ou junções ocludentes que com outras junções celulares são responsáveis por manter as células adjacentes unidas umas as outras ou a lâmina basal. O epitélio sofre um grande estresse mecânico e tem a função de barrar ou permitir seletivamente a passagem de moléculas por ele, por isso apresenta um especializado complexo juncional.

O complexo juncional é constituído por estruturas de membrana especializadas que regulam a adesão célula-célula, sendo essencial para morfologia e função epitelial. O complexo juncional pode ser dividido: junções ocludentes, aderentes e comunicantes. As junções comunicantes medeiam a passagem de sinais elétricos ou químicos de uma célula à outra (64). As junções aderentes formadas pelas caderinas e desmossomos são a conexão mecânica das células e os filamentos do citoesqueleto às células vizinhas ou à matriz extracelular. A junção aderente está presente no complexo juncional apical logo abaixo da junção ocludente – como na Figura 14 (65).

Figura 13. Estrutura esquemática do complexo juncional celular



Fonte: Adaptado de Myal (66)

As *tight junction* estão presentes na região superior do complexo juncional apical, no epitélio dos vertebrados. Desempenham um papel muito importante na modulação do fluxo paracelular, atuando como uma barreira semipermeável que regula a passagem de íons, solutos e água. Possuem também uma função conhecida como “cerca” que atua na determinação da polaridade celular, discriminando um domínio apical e um domínio basolateral, os quais apresentam composição lipídica e protéica distintas, refletindo diferenças de funcionalidade entre essas regiões (66).

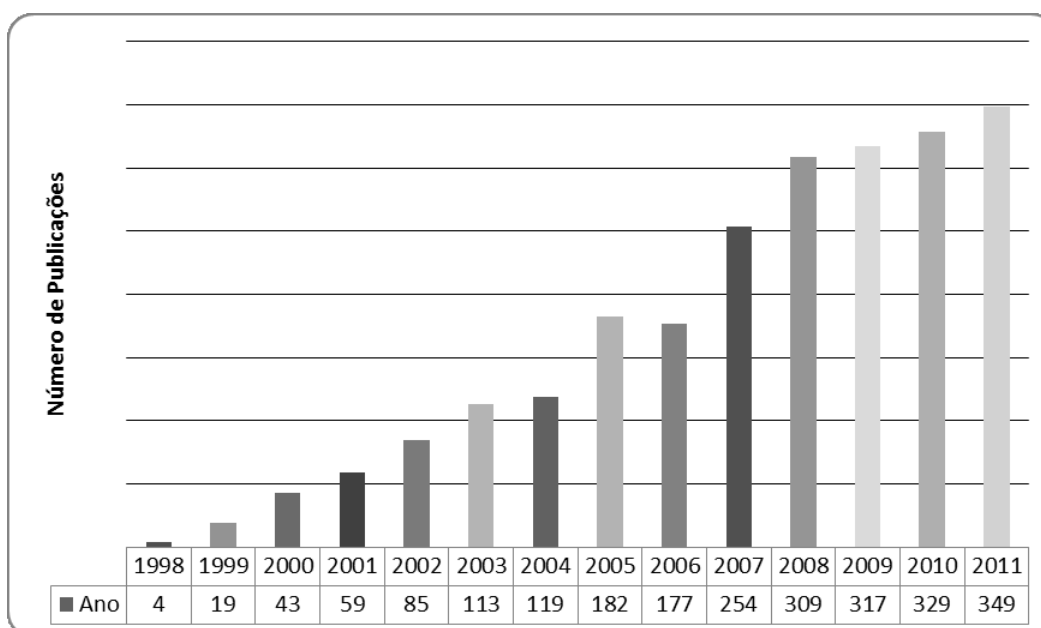
Em nível molecular, as proteínas que constituem as *tight junction* participam de diversas vias de sinalização, que atuam na regulação dos mais variados processos celulares, como proliferação e diferenciação. As *tight junction* são constituídas por proteínas integrais transmembrana, como a molécula de adesão juncional (JAM), ocludina, claudina e tricelulina, e por proteínas scaffold responsáveis pela associação da *tight junction* ao citoesqueleto, como as proteínas zonula occludens (ZO), ZO-1, ZO-2, ZO-3 e ainda por complexos protéicos citoplasmáticos que atuam na construção e manutenção da polaridade celular como PAR6/PAR3/aPKC e CRB/PALS/PATJ7,16,17.

Falhas nos componentes das *tight junction* têm sido cada vez mais associadas ao desenvolvimento do câncer. Segundo *Cerejido e col.*, a perda das

tight junction pode ser particularmente importante na permissividade da difusão de nutrientes e outros fatores necessários para a sobrevivência e crescimento do tumor (67). Já *Myal e col.* defendem que a ruptura das *tight junction* leva a perda da coesão entre as células, ao desenvolvimento da capacidade de invasão e perda da diferenciação celular, culminando assim na neoplasia (66).

A adesão célula-célula desempenha um importante papel na manutenção da homeostase do tecido epitelial. A ocorrência de desorganização do complexo juncional apical influencia no desenvolvimento da carcinogênese epitelial. Durante o processo de formação de carcinomas, a ocorrência de desestabilização da junção aderente é observada, tendo como principal indício, a diminuição da expressão da E-caderina ou sua translocação da membrana plasmática para o citoplasma (68). Este processo de diminuição da E-caderina muitas vezes está associado à transição epitelial-mesenquimal, situação em que as células epiteliais tornam-se independentes de ancoragem e exibem aumento na motilidade, adquirindo um fenótipo similar ao da célula mesenquimal. Assim, a perda das junções célula-célula e a desregulação das proteínas juncional pode ser um passo crucial para a invasão e metástase (66).

Nos últimos anos um interesse crescente em estudar alterações nas proteínas do complexo juncional e sua possível associação a diferentes cânceres. Segundo o banco de dados PubMed, de 1990 até novembro de 2011 foram publicados 2112 artigos sobre claudinas e 125 artigos sobre as claudinas e o câncer de mama. Pode-se notar na Tabela 12 um impressionante aumento no volume de publicações as quais versam sobre claudinas ao longo dos anos. No Brasil, têm-se conhecimento de apenas um estudo que avaliou os imunofenótipos CD24, CD44 e claudina 7 no subgrupo de carcinomas ductais invasivos de mama e seu potencial marcador prognóstico (69).

Tabela 12. Publicações sobre Claudinas ao longo dos anos

Fonte: Site de pesquisa científica *Web of Science*, dezembro/2011 (54)

A despeito dessa falta de entendimento sobre o mecanismo real pelo qual as claudinas se relacionam com o desenvolvimento do câncer de mama, sabe-se que a pesquisa do padrão dessas moléculas nos diferentes tecidos é promissora no que diz respeito a diagnóstico, prognóstico e terapêutica dos diferentes cânceres (8, 70).

A maioria dos tecidos expressa múltiplas claudinas e, dependendo do padrão dessa expressão, as células apresentam diferentes propriedades de permeabilidade e seletividade. O mais intrigante sobre a relação entre as claudinas e o câncer é que dependendo do tecido, pode ocorrer o aumento ou diminuição da expressão dessas moléculas. Em alguns casos, a superexpressão predispõe ao câncer, como parecer ser o caso das claudinas 3 e 4 na neoplasia de mama; por outro lado, a claudina 1 parece estar subexpressa nas neoplasias de mama (6). Diversos estudos têm mostrado que a expressão das claudinas está alterada nos diferentes tipos de câncer de mama, como apresentado na Tabela 13 (71).

Tabela 13: Localização cromossômica das 24 claudinas e exemplos de sua expressão em tecidos normais e neoplásicos

Gene	Localização cromossômica	Expressão tecidual							
		Mama		Próstata		Pulmão		Fígado	
		Normal	Câncer	Normal	Câncer	Normal	Câncer	Normal	Câncer
CLDN-1	3q28-q29	8,7	2,4	1,5	0,8	5	10,1	21,1	14,9
CLDN-2	Xq22.3-q23	0,5	1,1	0,7	1,2	1,3	2,5	0	0
CLDN-3	7q11.23	29,2	85,1	7,5	37,8	1,3	47,8	6	7,4
CLDN-4	7q11.23	134,5	192,8	6	27,2	10	70,4	0	14,9
CLDN-5	22q11.21	8,7	3,2	0,7	0,4	7,5	2,5	0	0
CLDN-6	16p13.3	0,3	0,5	0	0	0	0	0	0
CLDN-7	17p13	20,4	13,4	24	9,8	7,5	25,1	0	37,2
CLDN-8	21q22.11	0,9	0,4	0,7	0,4	0	0	0	0
CLDN-9	16p13.3	0,3	1,7	0	0	0	0	0	0
CLDN-10	13q31-q34	0,3	0,1	0,7	0,4	0	1,3	0	0,9
CLDN-11	3q26.2-q26.3	1,7	1	1,5	0,8	0	0	0	2,8
CLDN-12	7q21	12,4	9,3	3,7	4,5	15	1,3	15,1	6,5
CLDN-13	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CLDN-14	21q22.3	0	0,6	0	0	0	0	0	0
CLDN-15	7q11.22	1,9	2,5	0,7	2,8	0	7,5	0	1,9
CLDN-16	3q28	0	0,1	0	0	0	0	0	0
CLDN-17	21q22.11	0,2	0,1	0	0	0	0	0	0
CLDN-18	3q22.3	0	0	0	0	2,5	1,3	0	0
CLDN-19	1p34.2	0	0,1	0	0	0	0	0	0
CLDN-20	6q25	0,2	0,7	0	3,3	0	1,3	0	1,9
CLDN-21	4q35.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
CLDN-22	4q35.1	2,6	5,5	7,5	6,5	3,8	5	9	6,5
CLDN-23	8p23.1	2,1	5,7	14,2	23,2	11,3	8,8	3	11,2
CLDN-24	4q35.1	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A

Fonte: Adaptado de Myal (66)

Singh e col. descreveram, mais claramente, o mecanismo pelo qual a diminuição da expressão das claudinas levaria à desorganização das *tight junction*, seguida pelo desenvolvimento do câncer: a diminuição na expressão das proteínas responsáveis pelas *tight junctions* provocaria uma perda de adesão entre as células, exercendo um papel importante na coesão, capacidade de invasão e perda da diferenciação em células tumorais. Porém, o mecanismo pelo qual a super expressão das claudinas levaria ao câncer não é bem esclarecido. Uma das teorias que suporta a idéia de que as claudinas estando super-reguladas desestruturariam o tecido, comprometendo a função das *tight junction* e levando ao desenvolvimento da neoplasia (72).

Diferentes grupos têm buscado estudar a expressão das claudinas em tumores de mama na tentativa de melhor compreender essa doença tão heterogênea e encontrar associações com variáveis clínicas, metástase e o prognóstico das pacientes. *Kulka e col.* estudaram a expressão imunoistoquímica da claudina 4 em 38 pacientes *basal-like* e 66 com outros subtipos tumorais e observaram que a maioria dos tumores *basal-like* era de alto grau histológico e tinham um elevado Ki67, um marcador de proliferação celular. Além disso, a claudina 4 parecia ser mais expressa em carcinomas do tipo *basal-like* e nos tumores grau 3 não *basal-like* (73).

Já *Soini e col.* estudaram 20 pacientes com a doença de Paget e as compararam com 195 pacientes com carcinoma de mama de diferentes subtipos. O objetivo era verificar se a expressão das claudinas 2, 3, 4 e 5 diferia entre essas doenças ou entre os subtipos de câncer mamário. Os autores encontraram que a claudina 2 estava diminuída e as claudinas 3, 4 e 5 estavam aumentadas nas pacientes com doença de Paget em relação a outras lesões de pele. Entretanto a análise dos tumores não revelou qualquer diferença nas claudinas entre os diferentes graus histológicos, subtipos tumorais ou receptores hormonais (74).

O estudo de Tokes, 2005, investigou a expressão imunoistoquímica das claudinas 1, 2, 3, 4 e 7 em carcinomas ductais infiltrativos da mama e comparou a sua expressão em um grupo de 60 pacientes (30 pT1pN0 e 30 pT1pN1) (61). *Tokes e col.* encontraram expressão diminuída das claudinas 1 e 7 nas células tumorais quando comparadas as normais e a claudina 4 esteve diminuída apenas nos tumores grau 1. Nesta pesquisa, os autores não encontraram diferença na expressão das claudinas 2 e 3 entre células normais e neoplásicas. Além disso, o estudo não encontrou qualquer diferença entre os grupos pT1pN0 e pT1pN1, concluindo assim que a análise da expressão das claudinas (1, 2, 3, 4 e 7) não auxilia na avaliação de metástase em linfonodos (61).

Sauer e col. avaliaram um grupo heterogêneo de biopsias de carcinoma de mama e observaram que a expressão imunoistoquímica da claudina 7 estava diminuída naquelas pacientes com alto grau histológico, que apresentavam metástase linfática e que tinham alto grau de falta de coesão celular (75).

Com o objetivo de determinar se as claudinas 1, 3 e 4 são expressas em diferentes tipos de lesões de mama e se existem diferenças entre a expressão protéica e gênica das claudinas *Tokes e col.* avaliaram 56 amostras de mama por imunohistoquímica e imunofluorescência e 17 amostras por PCR quantitativo. Os autores observaram a diminuição acentuada da expressão protéica da claudina 1 nas lâminas avaliadas por imunohistoquímica e imunofluorescência. Esse dado foi corroborado pela expressão gênica da claudina 1 no tecido tumoral que apresentou 12 vezes menos expressão quando comparada ao tecido sadio. A claudina 4 apresentou ausência ou diminuição acentuada da expressão protéica nos tumores grau 1 quando comparados ao tecido sadio, enquanto os tumores grau 2 a 4 tiveram expressão elevada similar ao tecido saudável. A análise da expressão gênica não foi capaz de corroborar a associação da claudina 4 com tumores grau 1. Os autores concluíram assim que a claudina 1 está envolvida na invasão, metástase e carcinogênese mamária. A perda ou diminuição da claudina 4 nos tumores grau 1 pode sugerir um papel na diferenciação celular (76).

Kominsky e col. observaram a perda da expressão imunohistoquímica da claudina 7 nas pacientes com carcinoma ductal *in situ* e invasivo de alto grau e também nas biopsias de carcinoma lobular *in situ*. Para tentar identificar o mecanismo pelo qual essa perda da claudina 7 acontece, o mesmo trabalho estudou três culturas celulares com expressão positiva de claudina 7 e três culturas sem expressão e realizaram um ensaio que avalia a hipermetilação das ilhas CpG na região promotora do gene da claudina 7. Com esta avaliação observaram que a região promotora das culturas sem expressão de claudina 7 estava hipermetilada, ou seja, sua expressão gênica estava bloqueada, enquanto as culturas com expressão de claudina 7 não estavam hipermetiladas, ou seja, podiam ser transcritas normalmente. Porém, esses dados não foram encontrados nas biopsias das pacientes. Os autores atribuem a isso que diferentes mecanismos de regulação da expressão das claudinas possam ocorrer no tumor de mama *in vivo* (77).

Em 2007 *Herschkowitz e col.*, com o objetivo de identificar padrões de expressão gênica comuns entre modelos de câncer de mama em camundongos e amostras de tumores de mama humanos, identificaram um novo subtipo molecular denominado *claudin-low*. O subtipo molecular *claudin-low* era caracterizado pela baixa expressão de genes envolvidos com as junções ocludentes e adesão célula-

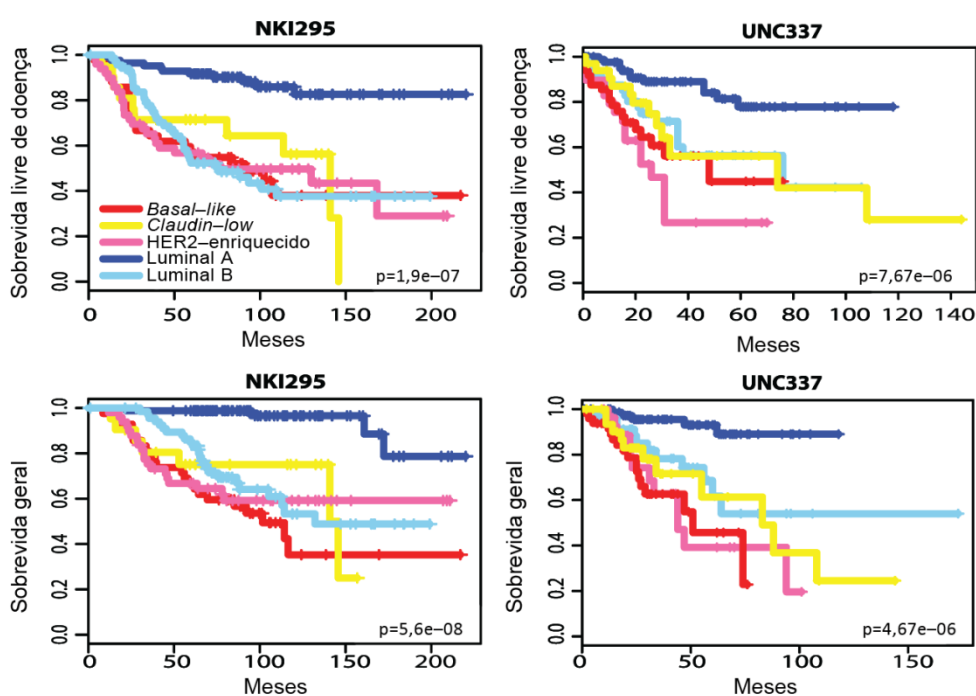
célula como a claudina-3, -4 e -7, ocludina e E-caderina. Esses tumores estavam presentes em 13 pacientes e também demonstraram baixa expressão de genes luminais, inconsistente expressão de genes basais e alta expressão de marcadores celulares linfocitários e endoteliais. Os tumores *claudin-low* eram ER-, diagnosticados como carcinomas ductais invasivos de grau II ou III, assim esses tumores não parecem ser lobulares como a baixa expressão de E-caderina poderia sugerir. Esse subtipo tumoral ainda compartilhou o padrão de expressão de tumores mesenquimais de camundongos (44).

A caracterização molecular do subtipo *claudin-low* estimulou outros estudos a identificar e caracterizar esse subtipo em sua população. *Perou e col.* em uma importante revisão descreveram os tumores *claudin-low* como parte do subtipo triplo-negativo juntamente com o *basal-like*. Além disso, os tumores *claudin-low* seriam naturalmente enriquecidos com células tronco ou células iniciadoras de tumor (40). Outro grupo tentou caracterizar uma linhagem celular *claudin-low* proveniente de tumores mamários induzidos em camundongos transgênicos MTB-IGF-IR (78). Essa linhagem (RJ348) tinha características *claudin-low* de diminuição de genes E-caderina, claudinas -3, -4 e -7 e aumento de genes mesenquimais Twist1, Twist2, Zeb1, Zeb2 e da proteína vimentina. Para avaliar o papel *in vivo* dessa linhagem celular *claudin-low* o mesmo estudo injetou essas células na glândula mamária de camundongos selvagens FVB e observou uma alta taxa de formação de tumores mamários em um curto período de iniciação do tumor, demonstrando que as células *claudin-low* são mais agressivas (78).

Prat e col. realizaram uma ampla caracterização clínica, prognóstica e molecular dos tumores *claudin-low*. Em seu trabalho esses tumores foram caracterizados pela ausente ou baixa expressão de marcadores de diferenciação luminal, elevados marcadores de transição epitelial-mesenquimal, genes de resposta imune e características de células tronco. Clinicamente, a maioria dos tumores *claudin-low* tem uma prevalência de 7 a 14%, são triplo negativos, ductais invasores, de alto grau histológico e com alta frequência de metaplasia e diferenciação medular. Uma diferença importante entre os *claudin-low* e os *basal-like* parece ser a alta expressão do Ki67 no último. Os *claudin-low* também têm uma taxa de resposta a quimioterapia padrão pré-operatória intermediária entre os tumores luminal e *basal-like*.

Além disso, este estudo demonstrou ainda que uma hierarquia de diferenciação prognóstica existe entre todos os cânceres de mama e que os *claudin-low* se assemelham as células tronco epiteliais mamárias. Por fim, o estudo fez uma avaliação da sobrevida em dois bancos de dados utilizados no estudo (NKI295 e UNC337) baseado na classificação por subtipos moleculares (Figura 14). Essa análise revelou que o subtipo *claudin-low* tem pior prognóstico que o subtipo luminal A e prognóstico semelhante a outros subtipos de pior prognóstico como luminal B, HER2 enriquecido e *basal-like* (45).

Figura 14. Gráfico de Kaplan-Meier para a sobrevida das pacientes segundo subtipo molecular



Fonte: Adaptado de Prat, 2010 (45)

Está estabelecido que a neoplasia de mama é uma doença heterogênea, composta por vários subtipos clínicos e moleculares. A utilidade dessas classificações vai além de melhor conhecer a doença e manifestação neoplasia, norteiam o tratamento e o prognóstico das pacientes. Desta forma, a classificação *claudin-low* parece ser de pouca utilidade, pois não defini tratamento ou prognóstico. Além disso, diversos trabalhos têm encontrado com padrões de expressão diferentes para as claudinas e pouco ainda se sabe sobre o seu verdadeiro papel na carcinogênese de mama.

As claudinas são atualmente bastante estudadas como potenciais fatores prognósticos para o câncer de mama. *Morohashi e col.* publicaram um trabalho, avaliando o padrão de expressão das claudinas 1 e 4 em um grupo de pacientes com recidiva e outro sem recidiva. Os autores observaram que a claudina 1 negativa era mais freqüente entre as pacientes que recidivaram e estava diminuída na metástase linfática. Além disso, a falta de expressão de claudina 1 foi um fator prognóstico, conferindo menor sobrevida livre de doença para as pacientes com claudina 1 negativa. A análise da claudina 4 não demonstrou qualquer associação com variáveis clínicas ou prognósticas (79).

Outros grupos também encontraram a associação da claudina 1 com o tempo livre de doença. *Szasz e col.* (8) inicialmente avaliaram a expressão das claudinas (1, 2, 3, 4, 5, 7), beta-catenina e E-caderina por imunistoquímica em 97 amostras de carcinomas ductais invasivos (CDI) e carcinomas lobulares invasivos (CLI) e as metástases em linfonodos auxiliares (LNMs). Este estudo observou a diminuição da claudina 1 e o aumento da beta-catenina e E-caderina nos carcinomas ductais. Nas comparações entre o CDI e a metástase no linfonodo, a última apresentava expressão diminuída das claudinas 1, 3, 4 e 7 e da beta-catenina. Resultados similares foram encontrados na comparação entre o carcinoma lobular e sua metástase linfática que apresentaram diminuição das claudinas 1, 2, 3, 4 e 7.

O estudo realizou uma avaliação prognóstica dessas proteínas e observou que a baixa expressão da claudina 1 (score 0 e +1) estava associada a menor sobrevida livre de doença. Por outro lado, a expressão positiva da claudina 4 (score $\geq +1$) nos linfonodos metastáticos também estaria associada ao pior prognóstico. Este estudo concluiu que a diminuição das claudinas nas *tight junctions* pode contribuir para a progressão tumoral e seu perfil de expressão pode ter relevância prognóstica (8).

Blanchard e col. estudaram a associação da expressão imunistoquímica das claudinas 1, 3 e 4 com variáveis clínicas e com o prognóstico em grupos de pacientes ER- e ER+. A freqüência de positividade das claudinas 1 e 4 foi maior no grupo ER-, enquanto a claudina 3 foi mais vezes positiva no grupo ER+. As claudinas 1 e 4 positivas também estavam associadas ao subtipo basal-like. No entanto, a análise de sobrevida não demonstrou qualquer associação das claudinas com o prognóstico das pacientes (6).

Lanigan e col. investigaram a distribuição e potencial valor clínico da claudina 4 em tumores de mama. Os autores tinham dados de duas coortes de pacientes, a primeira (coorte I) tinha 88 pacientes com câncer de mama primário e 10 pacientes normais; a segunda (coorte II) era composta de amostras de 299 tumores invasivos de mama. A coorte I foi utilizada para avaliar a expressão proteica da claudina 4 que demonstrou que pacientes ER- tinham maiores quantidade de CLDN-4 quando comparadas as ER+. Esse aumento também se associou ao maior grau tumoral (grau 3 comparado ao grau 1 e 2). A coorte II foi avaliada imunoistoquimicamente, nesta análise 47,5% das pacientes foram classificadas como alta expressão de claudina 4, esse subgrupo se associou á pacientes mais jovens, com maior grau tumoral e com os subtipos ER- e HER2 altamente expresso.

Além disso, as pacientes com alta expressão da claudina 4 tiveram menor sobrevida especificamente relacionada ao câncer de mama, livre de recidiva e geral. Nesta coorte foram analisadas separadamente as pacientes com ER+ e as que faziam uso de tamoxifeno, e se observou que a claudina 4 elevada estava associada a menor sobrevida relacionada ao câncer de mama. Os autores ainda corroboraram a associação da expressão gênica da claudina 4, a partir de banco de dados, com prognóstico, grau tumoral e com a negatividade do ER. Os autores concluíram que o alto nível da claudina 4 é um fator prognóstico adverso independente para o câncer de mama, incluindo o subgrupo de pacientes em tratamento com tamoxifeno (80).

Até o momento, apenas um estudo brasileiro avaliou claudinas em tumores de mama. O objetivo inicial de *Bernardi e col.* era identificar os imunoistoquimicamente diversas proteínas, entre elas a claudina 7, dentro dos subgrupos de CDI de mama (95 casos) e determinar sua influência no prognóstico e na associação entre marcadores. A CLD-7+ foi menos freqüente no subgrupo triplo-negativo e teve uma relação positiva com HER2 e inversa com RP. A alta expressão de CLD-7 também se associou com menor sobrevida livre de recidiva. Desta forma, a positividade da CLD-7 foi associada com reduzido tempo de sobrevida livre de recidiva, sugerindo que esse marcador pode ser usado em combinação com outras características clínico-patológicas para melhorar a avaliação prognóstica do câncer de mama (69).

Park e col. analisaram a associação entre as proteínas de adesão E-caderina, α - β - e γ -catenina, claudina-7 e os parâmetros clínico-patológicos em tumores primários e na suas lesões metastáticas. Além disso, avaliar o valor prognóstico

dessas moléculas de adesão. Foram avaliadas imunohistoquímica 196 pacientes, a maioria dos tumores eram ductais, grau II, RE- e RP-. Praticamente todas as amostras tinham reduzida expressão das moléculas estudadas no carcinoma primário comparado a metástase. A claudina-7 estava aumentada nos tumores de maior tamanho (pT) do subtipo ductal. A claudina-7 não apresentou associação com o prognóstico dos pacientes, enquanto a baixa expressão de E-caderina demonstrou ser um fator independente de mau prognóstico, quanto à sobrevida livre de recidiva e de recidiva a distância (81).

Por fim, um trabalho recente de *Szasz e col.* realizou uma ampla avaliação da expressão gênica das claudinas 1, 3, 4, 5, 7, 8, 10, 15 e 18 e a E-caderina e as correlacionou com dados de sobrevida de uma coorte para validar seus achados. O perfil imunohistoquímico das claudinas 2, 4 e E-caderina foi capaz de prever desfechos. No entanto, a combinação de um escore entre claudina 4 e E-caderina (CURIO) foi mais acurado em prever sobrevida livre de recidiva na coorte de validação. Na análise multivariada, incluindo as variáveis clínico-patológicas, o escore CURIO manteve-se um fator prognóstico independente. Além disso, o escore CURIO foi capaz de refinar os dados prognósticos separando bom e mau prognóstico nos subtipos luminal A e B e triplo negativo. No entanto, esse estudo pode ser questionável, pela falta de dados sobre o padrão de expressão do escore CURIO (82).

Além das associações com variáveis clínico-patológicas e prognósticas em cancer de mama as claudinas podem ser alvos terapêuticos através da enterotoxina do *Clostridium perfringens* (CPE), um ligante natural das claudinas 3 e 4. Em tumores que superexpressam estas claudinas poderia ser uma opção de terapia alvo. Por isso, *Kominsky e col.* (2004) estudaram a ação desta enterotoxina em culturas celulares de tumores de mama e em modelos animais de câncer de mama (83). Inicialmente, testaram a ação da enterotoxina sobre culturas celulares e observaram que as linhagens com superexpressão de claudinas 3 e 4 apresentaram uma rápida e completa citólise, enquanto as células sem expressão foram resistentes a citotoxicidade do CPE. Posteriormente, os pesquisadores induziram tumores em camundongos e após o estabelecimento do carcinoma administraram CPE. Os animais não apresentaram sinais de toxicidade sistêmica, no entanto o tumor reduziu significativamente de tamanho em 14 dias. Além disso, a análise

histológica revelou amplas áreas de necrose e morte celular e a presença de poucas células tumorais viáveis. Portanto, a enterotoxina do *Clostridium perfringens* pode ser uma terapia alvo para o câncer de mama quando há a superexpressão de claudinas 3 e 4 (83).

Outro trabalho do mesmo grupo (84) avaliou o efeito da enterotoxina sobre metástases cerebrais. O estudo observou que o sistema nervoso central (SNC) não expressa claudinas 3 e 4 em condições normais. Porém, a análise de metástase cerebral a partir de tumores de mama demonstrou a expressão dessas claudinas. Esse estudo avaliou inicialmente a toxicidade das células do SNC a enterotoxina do *Clostridium perfringens* e observou a resistência à toxicidade nessas células. Após os autores estimularam a formação de um carcinoma invasivo no cérebro de camundongos com células de tumor de mama, após o estabelecimento do tumor, tratou os animais com CPE intracranial por 4 dias. Esse tratamento foi capaz de inibir o crescimento tumoral e o aumentar da sobrevida desses animais. Este estudo conclui que a CPE pode ser eficiente para o tratamento da metástase cerebral sem toxicidade para o SNC (84).

3 JUSTIFICATIVA

O câncer de mama é uma das neoplasias com maior mortalidade no mundo. Dessa maneira, a busca por novas e mais específicas alternativas de tratamento é importante tema a ser investigado.

Devido ao fato do câncer de mama ser uma doença heterogênea, é importante conhecer e definir seus diversos subtipos. Assim sendo, a identificação de novas proteínas com diferentes expressões que auxiliem na diferenciação de tumores benignos e malignos, de diferentes subtipos histológicos e diferentes prognósticos possam proporcionar a direção a ser investigada na busca por novos tratamentos e drogas específicas para cada tipo molecular.

A escolha de condutas terapêuticas individualizadas proporciona uma abordagem mais eficaz e custo-efetiva. Além disso, o estudo do perfil genético dos tumores pode permitir a identificação de vias de sinalização ativadas ou reprimidas e potenciais alvos de modulação no tratamento dessa doença.

Os subtipos tumorais já estabelecidos hoje norteiam o tratamento e prognóstico das pacientes. No entanto, pouco se sabe sobre o subtipo triplo-negativo, citado como o de pior prognóstico. Até o momento, não há terapia-alvo para esse subtipo e também não há consenso sobre sua apresentação molecular. Recentes estudos têm identificado um padrão alterado na expressão de proteínas das *tight junction*, as claudinas, nos tumores triplo-negativos.

Diversos estudos, dessa forma, têm demonstrado diferentes expressões das claudinas nos tumores e buscando associar a expressão destas com características clinico-patológicas e prognósticas. No entanto não há estudos que avaliem a expressão das claudinas e E-caderina com enfoque em tumores triplo-negativos.

O papel exato das claudinas na carcinogênese da mama não está claro, até o momento. Além disso, as claudinas podem trazer um potencial terapêutico como um

receptor de drogas. Por isso sugere a necessidade de novos estudos que ampliem o conhecimento sobre a expressão das claudinas nesse subtipo de mau prognóstico e com poucas opções terapêuticas.

4 OBJETIVOS

4.1 *Objetivo Primário*

Investigar a associação da expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 e E-caderina com variáveis clínico-patológicas e fatores prognósticos, em uma série de tumores de mama triplo-negativos (RE-, RP- e HER2-).

4.2 *Objetivos Secundários*

Comparar os padrões de expressão das claudinas 1, 3, 4 e 7 e E-caderina quanto aos seguintes fatores: idade, tipo e grau histológico, tamanho do tumor, necrose, índice proliferativo Ki67, p53, comprometimento axilar, tempo livre de doença, sobrevida geral, metástases e óbito.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
2. Gonçalves ATea. Câncer de mama: mortalidade crescente na Região Sul do Brasil entre 1980 e 2002. *Cad Saúde Pública*. 2007;23(8):5.
3. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):5-23.
4. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2302-10.
5. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol*. 1998 Jun 29;141(7):1539-50.
6. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, et al. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch*. 2009 Jun;454(6):647-56.
7. Kashiwagi S, Yashiro M, Takashima T, Aomatsu N, Ikeda K, Ogawa Y, et al. Advantages of adjuvant chemotherapy for patients with triple-negative breast cancer at Stage II: usefulness of prognostic markers E-cadherin and Ki67. *Breast Cancer Res*. 2011 Nov 30;13(6):R122.
8. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, et al. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2011 Jan;28(1):55-63.
9. Jordan S, Lim L, Vilainerun D, Banks E, Sripaiboonkij N, Seubsman SA, et al. Breast cancer in the Thai Cohort Study: an exploratory case-control analysis. *Breast*. 2009 Oct;18(5):299-303.
10. Iwasaki M, Tsugane S. Risk factors for breast cancer: epidemiological evidence from Japanese studies. *Cancer Sci*. 2011 Sep;102(9):1607-14.
11. Swerdlow AJ, De Stavola BL, Floderus B, Holm NV, Kaprio J, Verkasalo PK, et al. Risk factors for breast cancer at young ages in twins: an international population-based study. *J Natl Cancer Inst*. 2002 Aug 21;94(16):1238-46.
12. (INCA) MdSdBINdC. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. 2009:98 p.

13. Cadaval Goncalves AT, Costa Jobim PF, Vanacor R, Nunes LN, Martins de Albuquerque I, Bozzetti MC. [Increase in breast cancer mortality in Southern Brazil from 1980 to 2002]. *Cad Saude Publica*. 2007 Aug;23(8):1785-90.
14. IBGE. Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira. *Estudos e Pesquisas e Informação Demográfica e Socioeconômica*. 2010(27).
15. IBGE. Indicadores Sociodemográficos e de Saúde no Brasil. *Estudos e Pesquisas Informação Demográfica e Socioeconômica*. 2009;25.
16. Harper S, Lynch J, Meersman SC, Breen N, Davis WW, Reichman MC. Trends in area-socioeconomic and race-ethnic disparities in breast cancer incidence, stage at diagnosis, screening, mortality, and survival among women ages 50 years and over (1987-2005). *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 2009 Jan;18(1):121-31.
17. Gotzsche PC, Nielsen, M. Screening for Breast Cancer with Mammography. *The Cochrane Library*. 2011(11).
18. Recommendations on screening for breast cancer in average-risk women aged 40-74 years. *CMAJ*. 2011 Nov 22;183(17):1991-2001.
19. INCA. Controle do Câncer de Mama: Consenso. 2004.
20. Datasus. Caderno de Informações de Saúde 2010.
21. Iwasaki M, Otani T, Inoue M, Sasazuki S, Tsugane S. Role and impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Japan. *Eur J Cancer Prev*. 2007 Apr;16(2):116-23.
22. Allain DC. Genetic counseling and testing for common hereditary breast cancer syndromes: a paper from the 2007 William Beaumont hospital symposium on molecular pathology. *J Mol Diagn*. 2008 Sep;10(5):383-95.
23. Shulman LP. Hereditary breast and ovarian cancer (HBOC): clinical features and counseling for BRCA1 and BRCA2, Lynch syndrome, Cowden syndrome, and Li-Fraumeni syndrome. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 2010 Mar;37(1):109-33, Table of Contents.
24. Struewing JP, Hartge P, Wacholder S, Baker SM, Berlin M, McAdams M, et al. The risk of cancer associated with specific mutations of BRCA1 and BRCA2 among Ashkenazi Jews. *N Engl J Med*. 1997 May 15;336(20):1401-8.
25. Tamakoshi K, Yatsuya H, Wakai K, Suzuki S, Nishio K, Lin Y, et al. Impact of menstrual and reproductive factors on breast cancer risk in Japan: results of the JACC study. *Cancer Sci*. 2005 Jan;96(1):57-62.
26. Eden JA. Breast cancer, stem cells and sex hormones. Part 2: the impact of the reproductive years and pregnancy. *Maturitas*. 2010 Nov;67(3):215-8.
27. Eden JA. Breast cancer, stem cells and sex hormones. Part 3: the impact of the menopause and hormone replacement. *Maturitas*. 2011 Feb;68(2):129-36.

28. Winchester DJ. Breast Cancer. Hamilton 2006.
29. Harris JR. Diseases of the breast. 4th ed. Philadelphia: Lippincott Williams Wilkins; 2010.
30. Menke CH. Rotinas em Mastologia. 2th ed. Porto Alegre 2007.
31. Fernandes GS, Calabrich A, Katz A. Câncer de mama triplo-negativo: aspectos clínicos, laboratoriais e terapêuticos. Rev Bras Mastol [Review]. 2009;19(2):76-82.
32. Tavassoli FA, Devilee P, International Agency for Research on Cancer., World Health Organization. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2003.
33. Todd JH, Dowle C, Williams MR, Elston CW, Ellis IO, Hinton CP, et al. Confirmation of a prognostic index in primary breast cancer. Br J Cancer. 1987 Oct;56(4):489-92.
34. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. Proc Natl Acad Sci U S A. 2003 Sep 2;100(18):10393-8.
35. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. Nature. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
36. Malhotra GK, Zhao X, Band H, Band V. Histological, molecular and functional subtypes of breast cancers. Cancer Biol Ther. 2010 Nov;10(10):955-60.
37. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. Nat Rev Cancer. 2007 Oct;7(10):791-9.
38. Perou CM, Borresen-Dale AL. Systems biology and genomics of breast cancer. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Feb;3(2).
39. Strelh JD, Wachter DL, Fasching PA, Beckmann MW, Hartmann A. Invasive Breast Cancer: Recognition of Molecular Subtypes. Breast Care (Basel). 2011;6(4):258-64.
40. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. Oncologist. 2011;16 Suppl 1:61-70.
41. Oliveira Marilene Almeida de SGdC, Kanamura Cristina Takami, Alves Venâncio Avancini Ferreira. Imunoexpressão da proteína Her-2 em punção aspirativa com agulha fina de carcinoma de mama: correlação com os achados da peça cirúrgica. Rev. Bras. Ginecol. Rev Bras Ginecol Obstet. 2003;25(1): 23-8.
42. Korsching E, Jeffrey SS, Meinerz W, Decker T, Boecker W, Buerger H. Basal carcinoma of the breast revisited: an old entity with new interpretations. J Clin Pathol. 2008 May;61(5):553-60.

43. Reis-Filho JS, Tutt AN. Triple negative tumours: a critical review. *Histopathology*. 2008 Jan;52(1):108-18.
44. Herschkowitz JI, Simin K, Weigman VJ, Mikaelian I, Usary J, Hu Z, et al. Identification of conserved gene expression features between murine mammary carcinoma models and human breast tumors. *Genome Biol*. 2007;8(5):R76.
45. Prat A, Parker JS, Karginova O, Fan C, Livasy C, Herschkowitz JI, et al. Phenotypic and molecular characterization of the claudin-low intrinsic subtype of breast cancer. *Breast Cancer Res*. 2010 Sep 2;12(5):R68.
46. Parker JS, Mullins M, Cheang MC, Leung S, Voduc D, Vickery T, et al. Supervised risk predictor of breast cancer based on intrinsic subtypes. *J Clin Oncol*. 2009 Mar 10;27(8):1160-7.
47. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
48. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
49. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2329-34.
50. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5652-7.
51. Guedj M, Marisa L, de Reynies A, Orsetti B, Schiappa R, Bibeau F, et al. A refined molecular taxonomy of breast cancer. *Oncogene*. 2011 Jul 25.
52. Gluz O, Liedtke C, Gottschalk N, Pusztai L, Nitz U, Harbeck N. Triple-negative breast cancer--current status and future directions. *Ann Oncol*. 2009 Dec;20(12):1913-27.
53. Paula Brito Corrêa MBPT, Kiyoko Abe-Sandes, Taisa Manuela Bonfim Machado Thaís, Ferreira Bonfim LM, Camila Abe-Sandes, Ivana Nascimento. Câncer de mama triplo negativo e sua associação com ancestralidade africana. *R Ci méd biol* 2010; 9(Supl1):3-7. 2010.
54. WEB OF SCIENCE. 2012.
55. Rakha EA, Tan DS, Foulkes WD, Ellis IO, Tutt A, Nielsen TO, et al. Are triple-negative tumours and basal-like breast cancer synonymous? *Breast Cancer Res*. 2007;9(6):404; author reply 5.
56. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34.

57. Reddy KB. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol*. 2011 Aug;18(4):e173-9.
58. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1368-76.
59. Rakha EA, El-Sayed ME, Green AR, Lee AH, Robertson JF, Ellis IO. Prognostic markers in triple-negative breast cancer. *Cancer*. 2007 Jan 1;109(1):25-32.
60. Adamo B, Anders CK. Stratifying triple-negative breast cancer: which definition(s) to use? *Breast Cancer Res*. 2011;13(2):105.
61. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Mathe M, Paska C, Lodi C, et al. The expression of five different claudins in invasive breast carcinomas: comparison of pT1pN1 and pT1pN0 tumors. *Pathol Res Pract*. 2005;201(8-9):537-44.
62. Furuse M, Sasaki H, Fujimoto K, Tsukita S. A single gene product, claudin-1 or -2, reconstitutes tight junction strands and recruits occludin in fibroblasts. *J Cell Biol*. 1998 Oct 19;143(2):391-401.
63. Davidson PL, J. Analysis of Microarray Data to Confirm Novel Subtype of Breast Cancer. [Requirements for the degrees of Bachelor of Science in Biology/Biotechnology and Computer Science]. 2010 4/29/2010.
64. Alberts B. *Biologia molecular da célula*. Artmed. 2004;4 ed.
65. Niessen CM, Gottardi CJ. Molecular components of the adherens junction. *Biochim Biophys Acta*. 2008 Mar;1778(3):562-71.
66. Myal Y, Leygue E, Blanchard AA. Claudin 1 in breast tumorigenesis: revelation of a possible novel "claudin high" subset of breast cancers. *J Biomed Biotechnol*. 2010;2010:956897.
67. Cereijido M, Contreras RG, Flores-Benitez D, Flores-Maldonado C, Larre I, Ruiz A, et al. New diseases derived or associated with the tight junction. *Arch Med Res*. 2007 Jul;38(5):465-78.
68. Gloushankova NA. Changes in regulation of cell-cell adhesion during tumor transformation. *Biochemistry (Mosc)*. 2008 Jul;73(7):742-50.
69. Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncology Reports*. [Article]. 2012 Jan;27(1):28-38.
70. Shin DY, Kim GY, Kim JI, Yoon MK, Kwon TK, Lee SJ, et al. Anti-invasive activity of diallyl disulfide through tightening of tight junctions and inhibition of matrix metalloproteinase activities in LNCaP prostate cancer cells. *Toxicol In Vitro*. 2010 Sep;24(6):1569-76.
71. Ouban A, Ahmed AA. Claudins in human cancer: a review. *Histol Histopathol*. 2010 Jan;25(1):83-90.

72. Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. *J Oncol*. 2010;2010:541957.
73. Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, et al. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res*. 2009 Mar;15(1):59-64.
74. Soini Y. Claudins 2, 3, 4, and 5 in Paget's disease and breast carcinoma. *Hum Pathol*. 2004 Dec;35(12):1531-6.
75. Sauer T, Pedersen MK, Ebeltoft K, Naess O. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology*. 2005 Aug;16(4):193-8.
76. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res*. 2005;7(2):R296-305.
77. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 2003 Apr 3;22(13):2021-33.
78. Campbell CI, Thompson DE, Siwicky MD, Moorehead RA. Murine mammary tumor cells with a claudin-low genotype. *Cancer Cell Int*. 2011;11:28.
79. Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, et al. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med*. 2007 Aug;20(2):139-43.
80. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer*. 2009 May 1;124(9):2088-97.
81. Park D, Karesen R, Axcrona U, Noren T, Sauer T. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. *APMIS*. 2007 Jan;115(1):52-65.
82. Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, Krenacs T, Baranyai Z, et al. Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci*. 2011 Dec;102(12):2248-54.
83. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol*. 2004 May;164(5):1627-33.
84. Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J, Brady K, Doucet M, Nell D, et al. *Clostridium perfringens* enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res*. 2007 Sep 1;67(17):7977-82.

6 ARTIGO EM INGLÊS

Title: Clinicopathological characteristics and outcomes associated with Claudins 1, 3, 4, 7 and E-Cadherin in triple-negative breast tumors

Ermani Cadore¹, Marcia Silveira Graudenz^{1,2}

¹Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, ²Serviço de Patologia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Corresponding author:

Marcia Silveira Graudenz, MD, Ph.D

Rua Ramiro Barcelos, 2400 - 2º andar • Tel.: +5551 3308-5605 •

Porto Alegre - RS - Brasil •

ppgcm@ufrgs.br

ABSTRACT

INTRODUCTION: Breast cancer is a major cause of morbidity and mortality and is known to be a heterogeneous disease. The clinical and molecular characterization of its subtypes is critical to guide its prognosis and treatment. Further studies are needed for the best characterization of triple-negative tumors. The study of the expression of claudins should help in the characterization of these tumors.

OBJECTIVE: To investigate the association of expression of claudins 1, 3, 4 and 7 and E-cadherin with clinicopathological variables and prognosis in a series of triple-negative breast cancers (ER-, PR- and HER2-).

METHODS: Eighty triple negative tumors were analyzed by automated immunohistochemistry for the claudins 1, 3, 4, 7 and E-cadherin. The immunohistochemical expression was assessed by H-Score (intensity multiplied by the percentage of staining). The associations between clinicopathological characteristics and H-Score were evaluated. For the prognostic assessment of patients, Kaplan-Meier curves were constructed from the follow-up data of patients and H-Score.

RESULTS: A significant association was found between high H-Score of CLDN-1 (HCLDN-1) in older patients and the presence of necrosis, high H-Score of E-cadherin (H-CAD) in younger patients and low H-Score CLDN-7-(7-HCLDN) and Ki67 positive. Furthermore, patients with high-HCLDN1 had a lower overall survival. High HCLDN-3 showed a trend toward association with longer overall and disease-free survival.

CONCLUSIONS: Differential expression of claudins and E-cadherin should help in clinicopathological characterization of triple-negative tumors. Moreover, claudins 1 and 3 appear to be prognostic factors for these tumors.

Key words

Breast Cancer, Immunohistochemical markers, claudins, E-cadherin, triple-negative

INTRODUCTION

Breast cancer (BC) is the most frequent cancer among women in the world and the leading cause of death by cancer in females worldwide (1). BC is recognized as a heterogeneous disorder with genotypic and phenotypic diversity (2-3). This heterogeneity has been extensively studied in recent decades due to the discovery of hormone receptors (estrogen receptor - ER, progesterone receptor – PR) and HER-2, which are important therapeutic targets in oncology today (4-6). More recently, BC immunohistochemical classification has been considered an important prognostic tool (7). Classification can be based on genetic profiling or immunohistochemical surrogates. Up to 23% of breast cancers are triple negative (TN), i.e., do not express any of these receptors (8). The TN tumors respond poorly to chemotherapy and still no targeted drug has been developed (9-10).

The identification and understanding of new proteins and biomarkers can help classify the subtype a more accurately and a more specific treatment to of each subgroup (11). The claudins are tight junction proteins, first identified by Furuse in 1998(12), while studying the occludin in the chicken liver. Today, the claudin family comprises 24 different members. The expressions of different claudins have been investigated by several previous studies to be associated with various cancer types. The possible relation between claudins and cancer can be the cellular discohesion, caused by the loss of the tight junction, allowing the epithelial invasion and the metastatic capacity of the tumor.

The role of claudins in breast cancer has not yet been fully established, neither its relationship with overall-survival and disease-free survival. Previous studies have related the loss of Claudin 1 (CLDN-1) expression with a poor outcome (13-14), lymphonode status (15) and invasive ductal carcinomas (IDC) (14). Claudin 3 (CLDN-3) was found to be reduced in metastasis of both IDC and invasive lobular carcinoma (ILC) (14).

Claudin 4 (CLDN-4) provides the most controversial results, and it was published that its overexpression is related with poor outcome (14, 16). The decrease

expression of Claudin 4 has also been associated with grade 1 tumors (15, 17), and when overexpressed it has been associated with higher grade and younger patients (16), and with the basal-like subtype (18-19).

The elevated expression of Claudin 7 (CLDN-7) correlated with shorter disease-free survival in breast cancer (20). The loss of Claudin 7 has also been associated with grade 3 tumors, metastasis and cellular discohesion (21) and primary tumors (22). The loss of the Claudin 7 expression was also associated with ductal carcinoma *in situ* (DCIS), IDC and lobular carcinoma *in situ* (LCIS) (23).

E-cadherin, a transmembrane protein that functions in cell-cell interactions, is linked to the membrane cytoskeletal matrix through interactions with beta-catenin. The negative expression of E-cadherin was associated with shorter disease-free survival in primary BC (22), and the positive E-cadherin expression was associated with IDC (14).

This study aimed to investigate the association between the expression of claudins 1, 3, 4 and 7 and E-cadherin with clinicopathological variables and prognostic factors, in a series of triple negative breast tumors.

MATERIALS AND METHODS

Sample

The triple-negative tumor samples were selected from a sequential series of pathological reports obtained from patients that underwent diagnostic or surgery procedures or immunohistochemical (IHC) reactions at the Hospital de Clínicas de Porto Alegre between January, 2001 and December, 2006. This study was submitted and approved by the Research Ethics Committee of the Research and Postgraduate Group of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG 110263).

The original cohort consisted of 133 tumors paraffin blocks, however 24 samples were excluded because their triple negative nature was not confirmed (ER+=1, PR+=1, HER-2 undetermined=9 and HER-2 positive=13), 17 samples were excluded for pathological reasons (no tumor=14, *in situ* carcinoma =1, artifact=1 and

bone marrow=1) and 12 samples were excluded because there was no data. The final cohort comprised 80 cases of human triple-negative BC.

Clinicopathological data

Histological type, tumor size, grade, nodal status and necrosis data were obtained from pathology reports. The Ki67 and p53 data were retrieved from the hospital immunohistochemical reports. Age at the primary treatment, primary treatment option and follow-up information were obtained from the hospital and private medical records, as well from telephone contacts with the patients.

Tissue microarray

Tissue microarrays (TMA) were composed of 59 formalin-fixed, paraffin-embedded tumors. All samples were histologically reexamined and the tumoral regions of interest were selected for core punching. The cores were 2mm in diameter. Small biopsy sample size (n=21), were analyzed individually and not submitted to TMA.

Immunohistochemistry

Immunohistochemical reactions were performed on 5 μ m thick sections obtained from the TMA blocks. After deparaffination, antigen retrieval was performed using Dako PT Link (DAKO, Carpinteria, CA, USA) at 98° for 20 minutes. The reactions for claudins 3, 4 and 7 were done under low pH, while claudin 1 and E-cadherin were recovered at a high pH, utilizing EnVision FLEX Target Retrieval Solution (DAKO, Carpinteria, CA, USA). The slides were washed for 5 minutes in a commercial washing buffer (Wash Solution) and all immunohistochemical reactions were performed in an automated Dako Autostainer Link 48 (DAKO, Carpinteria, CA, USA). Sections were incubated with pre-diluted rabbit polyclonal CLDN-1 (Cell Marque, USA), rabbit polyclonal CLDN-3, -4 and -7 (Spring, USA) and FLEX mouse monoclonal E-cadherin (DAKO, Carpinteria, CA, USA) for 30 minutes (CLDN-1 and E-cadherin) or for 15 minutes (CLDN-3, -4 and -7). EnVision kit (DAKO, Carpinteria, CA, USA) was used for visualization with the chromogen 2, 3-diamino-benzidine DAB (DAB Chromogen Solution, Dako, Carpinteria, CA, USA).

Claudins and E-cadherin Expression Evaluation

The slides were evaluated by 2 independent experienced breast pathologists. Only the expression in the tumor cell membrane was considered for these analyses. Both staining intensity and the percentage of stained membranes were evaluated. The brown staining intensity was scored as 0 (negative), 1+ (weak), 2+ (intermediate) and 3+ (strong). Intensity and frequency of positive cells expressed in % were included in a scoring system called the H score, used to evaluate the expression of claudins and E-cadherin, as previously described (19, 24). Briefly, H-scores derived from a semi-quantitative assessment of both staining intensity (scale 0–3) and the percentage of positive cells (0–100%), when multiplied, generated a score ranging from 0–300. Primary categorical analysis was as follows: breast cancers with H-scores ≥ 50 were considered high expressions of claudins 1, 3, 4, 7 and E-cadherin and H-scores ≤ 50 were considered low expressions of claudins 1, 3, 4, 7 and E-cadherin (19).

Ki-67 and p53 Expression Evaluation

Ki67 expression (% of positive nuclei) was dichotomized into $\leq 10\%$ and $> 10\%$, as published by Blanchard (19). p53 positivity or negativity data were retrieved from pathological reports.

Statistical Analysis

Data is presented as mean \pm standard deviation or absolute numbers and percentages. Continuous variables were compared by the Student t-test and categorical variables by the chi-square test or Fisher Exact test, as appropriate. For the prognostic analysis, Kaplan-Meier survival curves were constructed from the date of surgery or biopsy collected samples to the last registry of follow-up or death, and compared by the log-rank statistics. Then, Cox proportional hazard regressions were created to obtain proportional hazards ratios for H-score of CLDN-1 and CLD-3. SPSS for Windows 18.0, GraphPad Prism 5, Excel 2007 or WinPepi were used for data analysis. A p value of 0.05 was considered statistically significant.

RESULTS

The clinicopathological characteristics are summarized in Table 1. The mean age of patients was 54.51 years. The results showed that 93.75% of the samples were invasive ductal carcinomas. Most of the sample was composed of grade 3 tumors (51.25%), more than 2 cm (85.00%) and with Ki-67 proliferation rate above 14% (47.50%). The mean follow-up time was 149.28 months (range 6-359). Half of the patients underwent surgery+radiotherapy+chemotherapy protocols and 43.75% had died by the end of the study. The great majority of the tumor tissue was obtained from primary disease (83.75%) while some tumors derived from secondary disease (16.25%).

Table 1. Clinicopathological characteristics of the sample

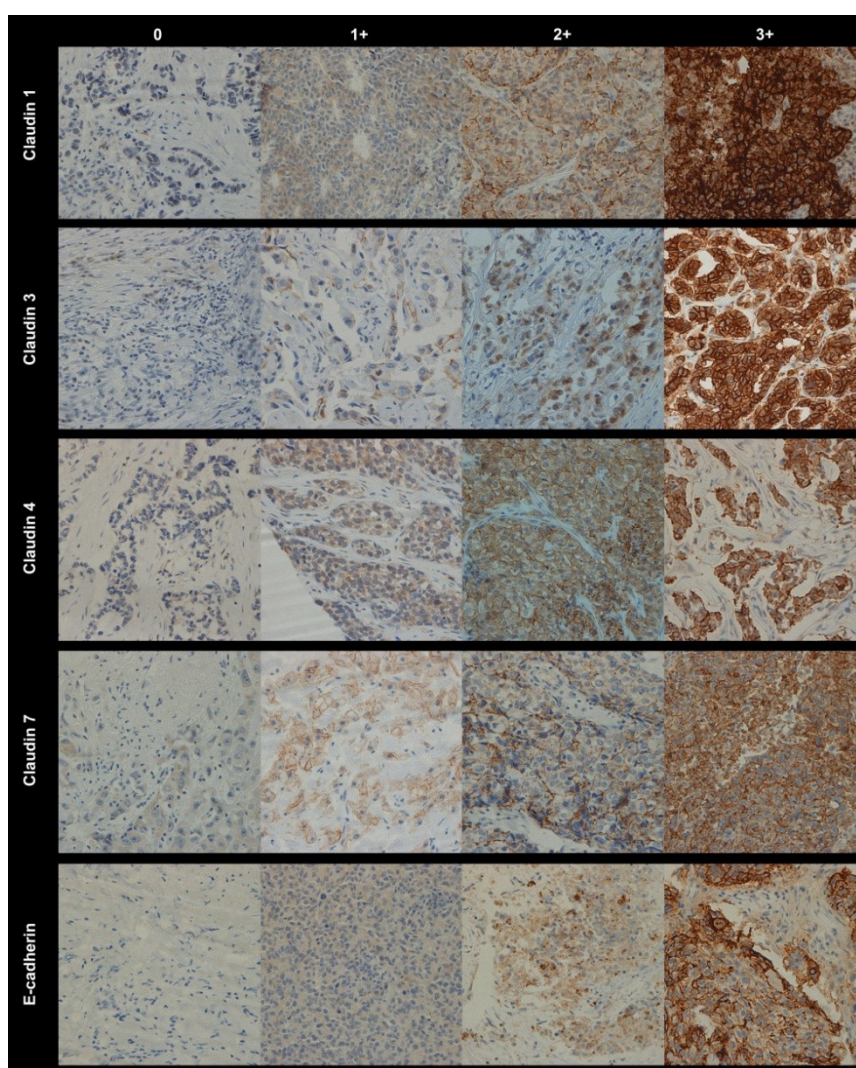
	Patients (%)	
Age, years		
Range (Mean)	25-81 (54.51)	
Histological type		
IDC	75	(93.75)
ILC	1	(1.25)
Atypical Medullary Carcinoma	1	(1.25)
Metaplastic Carcinoma	1	(1.25)
Mixed Invasive Carcinoma	1	(1.25)
NA	1	(1.25)
Tumor Size		
≤ 2cm	6	(15.00)
> 2cm	34	(85.00)
Histological Grade		
1	2	(2.50)
2	19	(23.75)
3	41	(51.25)
NA	18	(22.50)
Nodal Status		
Negative	28	(35.00)
Positive	34	(42.50)
NA	18	(22.50)
Necrosis		
Negative	41	(51.25)
Positive	33	(41.25)
NA	6	(7.50)
Ki67		
≤10	14	(17.50)
>10	38	(47.50)
NA	28	(35.00)
p53		
Negative	27	(33.75)
Positive	26	(32.50)
NA	27	(33.75)
Primary Treatment		
Surgery	6	(7.50)
Surgery+Radiotherapy	10	(12.50)
Surgery+Chemotherapy	14	(17.50)
Surgery+Radiotherapy+Chemotherapy	40	(50.00)
Palliative	1	(1.25)
NA	9	(11.25)
Follow-up time, months		
Range (Mean)	6-359 (149.28)	
Relapse		
No	37	(46.25)
Yes	34	(42.50)
NA	9	(11.25)
Condition		
Alive	31	(38.75)
Deceased	35	(43.75)
NA	14	(17.50)
Type of material analyzed		
Primary Biopsy	19	(23.75)
Primary Surgery	48	(60.00)
Secondary Biopsy	5	(6.25)
Secondary Surgery	8	(10.00)

NA Not Available

Immunohistochemical Expression of Claudins and E-cadherin

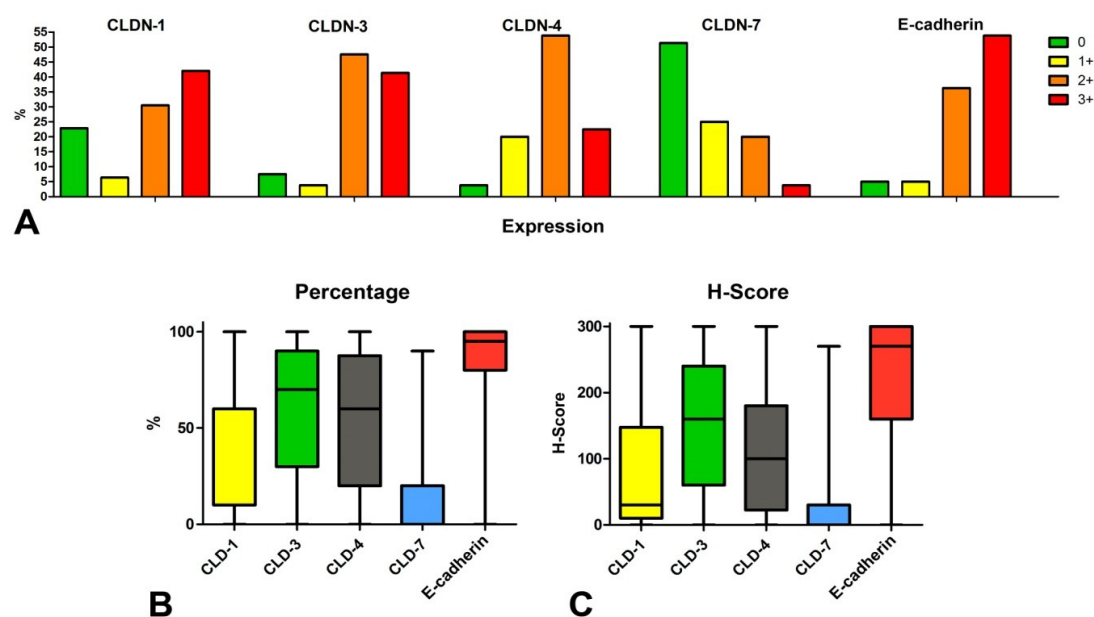
TMA and biopsy slides consisted of a total of 80 triple-negative tumors. Only those tumors from which we were able to retrieve interpretable data (intact, unfolded tumor sections) were considered for analysis. Protein expression examples are shown in Figure 1.

Figure 1. Representative immunostaining of triple-negative breast tumors with claudins 1, 3, 4, 7 and E-cadherin antibodies.



The staining intensity (A), the percentage of stained membranes (B) and the H-score (C) of each Claudin and E-cadherin can be seen in Figure 2.

Figure 2. Claudins and E-cadherin expression, percentage and H-score.



The staining intensity and median of H-Scores of Claudins and E-cadherin can be observed in Table 2. In this cohort, a total of 58.8% of the sample were high expressors (H-scores ≥ 50) of claudin 1, 77.5% of claudin 3, 67.5% of claudin 4, 18.8% of claudin 7 and 91.3% of E-cadherin.

Table 2. Protein expression pattern and median H-Scores of claudins and E-cadherin.

	CLDN-1	CLDN-3	CLDN-4	CLDN-7	E-Cadherin
Expression					
0	22.5%	7.5%	3.8%	51.3%	5.0%
1+	6.3%	3.8%	20.0%	25%	5.0%
2+	30.0%	47.5%	53.8%	20%	36.3%
3+	41.3%	41.3%	22.5%	3.8%	53.8%
median percentage	10%	70%	60%	0%	95%
median H-Scores	30	160	100	0	270

Expression of Claudins and E-cadherin and clinicopathological parameters

The association between clinicopathological characteristics of each Claudin and E-cadherin is shown in Table 3. There was a significant association between CLDN1 and age ($p=0.039$), where younger patients had a smaller H-score; between

E-cadherin and age ($p=0.041$), where younger patients had a higher H-score; and between CLDN1 and necrosis ($p=0.027$), where low expression (patients with an H-score lower than 50) had less tumor necrosis compared with an H-score ≥ 50 . Concerning CLDN7 and Ki67, patients with an H-score <50 had higher Ki67 positivity compared with H-score ≥ 50 ($p=0.050$). No significant association was observed between tumor size, histological grade, nodal status and p53 immunoreexpression.

Table 3. Association between Claudins and E-cadherin and clinicopathological characteristics.

	HCLDN 1			HCLDN3			HCLDN4			HCLDN7			HE-CAD		
	<50	≥50	p	<50	≥50	p	<50	≥50	p	<50	≥50	p	<50	≥50	p
Age (years)(n=73)	52±12	58±13	0.039	56±15	54±12	0.503	54±14	55±12	0.674	54±12	56±15	0.551	64±8	54±12	0.041
Tumor size(n=40)															
≤ 2cm	3 (11%)	3 (25%)		2 (33%)	4 (12%)		3 (27%)	3 (10%)		6 (20%)	0 (0%)		1 (33%)	5 (14%)	
> 2cm	25 (89%)	9 (75%)	0.341	4 (67%)	30 (88%)	0.215	8 (73%)	26 (90%)		24 (80%)	10 (100%)	0.307	2 (67%)	32 (86%)	0.394
Histological Grade(n=62)															
Grade 1	1 (3%)	1 (4%)		0 (0%)	2 (4%)		0 (0%)	2 (4%)		1 (2%)	1 (8%)		0 (0%)	2 (3%)	
Grade 2	14 (40%)	5 (18%)	0.160	4 (31%)	15 (31%)	0.641	5 (29%)	14 (31%)	0.473	14 (28%)	5 (42%)	0.078	1 (33%)	18 (31%)	0.903
Grade 3	20 (57%)	21 (78%)		9 (69%)	32 (65%)		12 (71%)	29 (65%)		36 (70%)	5 (50%)		2 (67%)	39 (66%)	
Nodal Status(n=62)															
negative	13 (37%)	15 (56%)		6 (54%)	22 (43%)		11 (65%)	17 (38%)		23 (48%)	5 (36%)		3 (60%)	25 (44%)	
positive	22 (63%)	12 (44%)	0.235	5 (46%)	29 (57%)	0.722	6 (35%)	28 (62%)	0.106	25 (52%)	9 (64%)	0.616	2 (40%)	32 (56%)	0.821
Necrosis(n=74)															
negative	29 (67%)	12 (39%)		11 (65%)	30 (53%)		15 (62%)	26 (52%)		32 (54%)	9 (60%)		3 (50%)	38 (56%)	
positive	14 (33%)	19 (61%)	0.027	6 (35%)	27 (47%)	0.548	9 (38%)	24 (48%)	0.548	27 (46%)	6 (40%)	0.912	3 (50%)	30 (44%)	>0.999
Ki67(n=52)															
negative	7 (25%)	7 (29%)		2 (20%)	12 (29%)		2 (13%)	12 (32%)		8 (19%)	6 (55%)		1 (33%)	13 (27%)	
positive	21 (75%)	17 (71%)	0.981	8 (80%)	30 (71%)	0.879	13 (87%)	25 (68%)	0.288	33 (81%)	5 (45%)	0.050	2 (67%)	36 (73%)	>0.999
p53(n=53)															
negative	17 (59%)	10 (42%)		6 (60%)	21 (49%)		8 (53%)	19 (50%)		21 (50%)	6 (55%)		3 (75%)	24 (49%)	
positive	12 (41%)	14 (58%)	0.341	4 (40%)	22 (51%)	0.776	7 (47%)	19 (50%)	>0.999	21 (50%)	5 (45%)	>0.999	1 (25%)	25 (51%)	0.631

Analysis of survival curves

Overall survival

Kaplan–Meier curves were constructed for survival analysis and the log rank test was used to compare curves. We were able to demonstrate that a high H-score of Claudin 1 is associated with poor overall survival ($p=0.018$) (Figure 3). High H-score of Claudin 3 shows a tendency of better outcome ($p=0.057$) (Figure 4). No statistical difference was observed in the overall survival of patients with low or high H-score of CLDN 4, CLDN7 and E-cadherin (Figure 5).

Figure 3. Kaplan–Meier curve for survival of low and high H-scores of Claudin 1.

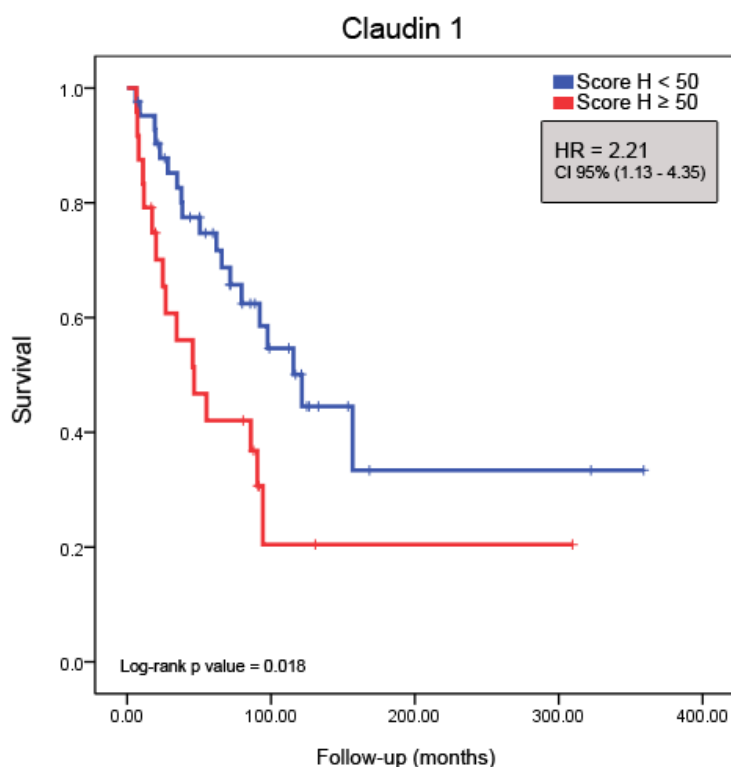


Figure 4. Kaplan–Meier curve for survival of low and high H-scores of Claudin 3.

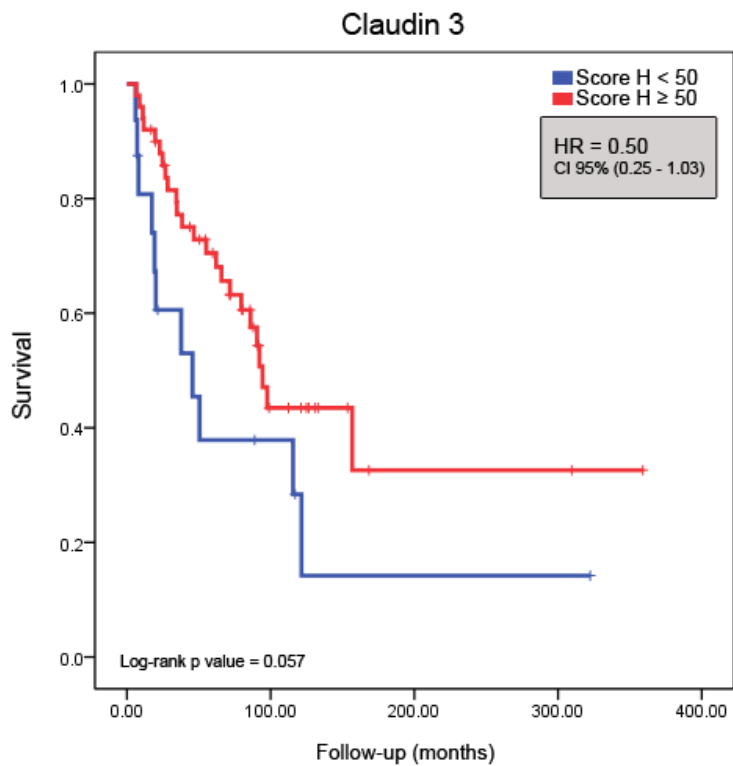
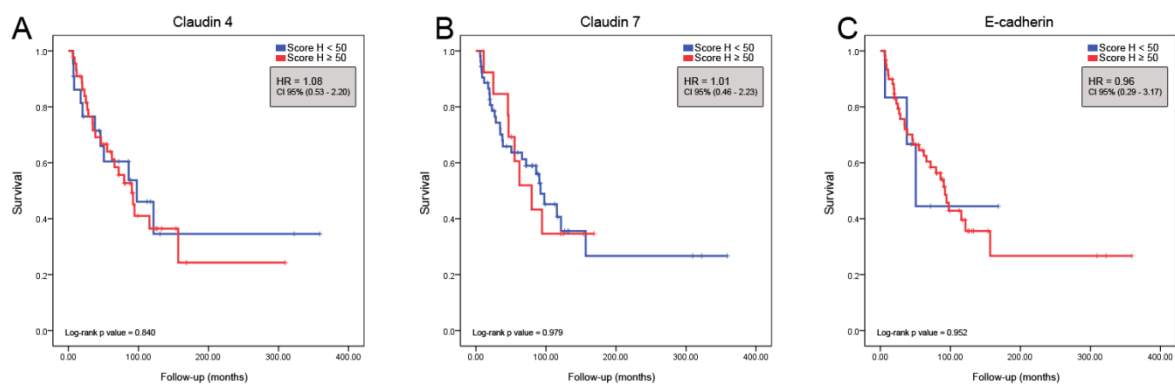


Figure 5. Kaplan-Meier curves for survival of Claudin 4, 7 and E-Cadherin



Disease-free survival

Using the log-rank test to generate Kaplan–Meier curves, we found a tendency ($p=0.057$) of Claudin-3 low expression (H-score <50) to have shorter disease-free survival in comparison with high expression.

No significant difference was observed between the Kaplan-Meier curves of Claudins 1, 4, 7 and E-cadherin (Figure 7).

Figure 6. Kaplan–Meier curve for disease-free survival of low and high H-scores of Claudin 3.

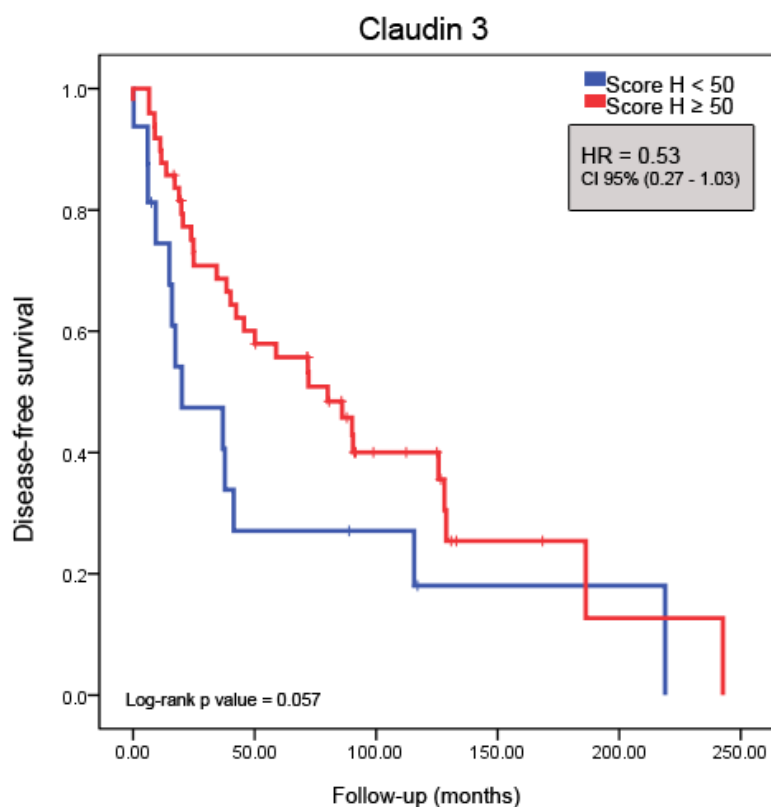
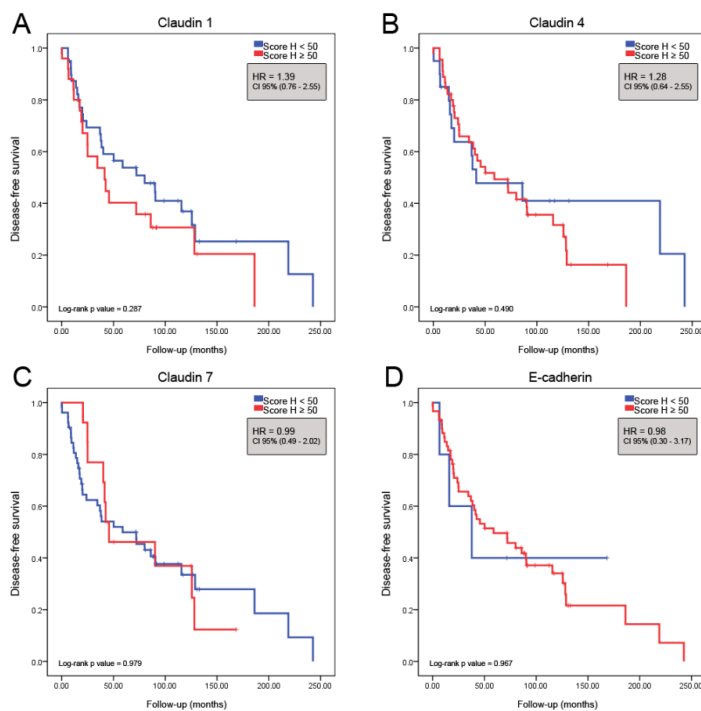


Figure 7. Kaplan-Meier curves for disease-free survival of Claudin 1, 4, 7 and E-Cadherin.



DISCUSSION

In this study we investigated the association of claudins 1, 3, 4 and 7 and E-cadherin expression with clinicopathological variables and prognostic factors, in a series of triple negative breast tumors. A significant association was found between CLDN1 and age, E-cadherin and age, CLDN1 and necrosis and CLDN7 and Ki67. A worse overall survival rate in patients with a high CLDN1 H-Score and a tendency toward a better overall survival rate in patients with a high CLDN3 H-Score were observed. Patients with low CLDN3 H-Score showed a tendency of shortened disease-free survival curves.

This was the first study to assess the Claudins expression in a large sample (n=80) of triple negative breast tumors. Previous studies had samples of 20 (20), 9 (14) and 38 (25) cases. Tissue microarrays and an automated system were used to process all the samples, trying to minimize human errors of the IHC technique and enhance the reproducibility of the methods.

Unfortunately, we were unable to obtain complete medical data of all patients. Many medical records were lost in the process and some patients were lost to follow-up. Another limitation of the study was that not all of the samples (83.75%), but most of them, were from the primary disease and it is known that the recurrent tumor can change its primary characteristics as well as its hormone receptors and Her-2.

It is difficult to compare the characteristics of our triple negative sample with other studies, since the definition of triple negative is not well explained. Some authors consider the triple negative subtype as part of the basal like subtype (11, 26-27), and some consider it an independent group (5, 9, 28). Triple negative samples were considered in this study ER-, PR- and Her2- cases, as described by Sorlie, Chen and Gucalp (29-31).

We compared our sample characteristics with other studies (5-6, 10, 32) (Table 3) and we were able to see that the difference between our sample and the others was that the profile of the patient was worse in all the aspects. This can be explained by the fact that breast cancer screening programs in Brazil are inefficient, and when patients arrive for treatment, the disease is already in more advanced stage. If the mean age of our patients at the diagnosis of the primary disease is observed, it will confirm our hypothesis that the patients are diagnosed in more advanced stages.

Table 3. Sample characteristics compared with other studies.

Characteristic	Present study	Haffty, 2006	Carey, 2006	Dent, 2007	Voduc, 2010
Age	54.51	NA	46	53	59
Histological Type	94.94% IDC	85% IDC	84% IDC	NA	NA
Histological Grade	66.13% G3	NA	81% G3	66% G3	67.5% G3
Tumor size	25% <2cm	58% <2cm	NA	36,5% <2cm	47% <2cm
Nodal Status	54.84% +	25% +	41% +	54.4% +	39% +

Comparison of our results with previous studies that assessed prognostic factors can be seen in Table 4. This was the first study to find significant association between CLDN1 and age, and between CLD1 and necrosis. Regarding the association between claudins and necrosis, we couldn't find another study to compare our results because most of the previous studies didn't investigate necrosis. Only Szasz (14) studied necrosis before us and they couldn't associate or correlate necrosis with claudins.

Table 4. Comparison of our results with previous studies that assessed prognostic factors.

Studies	Sample	Outcome	CLD-1	CLD-3	CLD-4	CLD-7	E-caderin
Present study	TNBC	OS and DFS	↑	↓	p>0.05	p>0.05	p>0.05
Szasz 2011	60 IDC and 37 ILC	DFS	↓	p>0.05	↑	p>0.05	p>0.05
Szasz 2011	13 datasets and 584 SST	DFS	p>0.05	p>0.05	CURIO Score*	p>0.05	CURIO Score*
Lanigan 2009	387 SST	OS and DFS	NA	NA	↑	NA	NA
Bernardi 2012	95 SST	DFS	NA	NA	NA	↑	NA
Morohashi 2007	57 RT and 26 NRT	DFS	↓	NA	p>0.05	NA	NA
Blanchard 2009	220 ER+ and 192 ER-	OS	p>0.05	p>0.05	p>0.05	NA	NA
Park 2007	174 IDC and 22 ILC	DFS	NA	NA	NA	p>0.05	↓
Kashiwagi 2011	190 TNBC	OS	NA	NA	NA	NA	↓

TNBC: triple-negative breast cancer; OS: overall survival; DFS: disease-free survival; IDC: invasive ductal carcinoma; ILC: invasive lobular carcinoma; SST: several subtypes tumors; NA: not available; RT: recurrence tumors; NRT: no-recurrence tumors; ER: estrogen receptor. *CURIO Score: was created with CLDN-4 and E-cadherin expression together.

The association between E-cadherin and age was previously investigated by Kashiwagi in triple negative breast tumors. They dichotomized the age at 55 years and didn't find any difference (p=0.935). We found that the high E-Cadherin H-Score was associated with younger patients.

We found association between a low H-Score of CLDN7 and a positive Ki67. This was previously studied by Bernardi (20), but no association was reported. Blanchard et al (19) found a weak correlation between Ki67 and claudins 3 and 4, but they used a different cut-off of 30%, and no association was found.

Regarding the prognostic factors, we verified that the high H-Score of CLDN1 had a significant worse outcome in the overall survival curve. This finding was not in agreement with the results reported by previous studies (13-14), where a low expression of CLDN1 was related to the worst outcome. However, Blanchard et al(19) observed that the high expression of CLDN1 was related to basal-like tumors.

Considering that the triple negative tumors share characteristics with basal-like subtype, our results can be explained by the different profile of our sample in relation to other studies (13-14).

To our knowledge, this was the first time that the low H-Score of CLDN3 showed a tendency associated with worse overall and disease-free survival.

Several studies have evaluated the potential therapeutic effect of *Clostridium perfringens* enterotoxin (CPE) (33). This enterotoxin is a specific ligand of claudins 3 and 4. CPE has the ability to lyse the cells that overexpress claudin 3 and 4.

Experimental studies have demonstrated sensitive and specific tumors cytolysis, including breast cancer and brain metastasis (34-38). Thus, the identification of claudins in breast cancer can guide therapy in the future.

Differential expression of claudins and E-cadherin can help in clinic-pathological characterization of triple-negative tumors. Furthermore, Claudine 1 and 3 appear to be prognostic factors for these tumors. Finally, the study of claudins can bring perspectives for the use of molecules with targeted therapy effect.

REFERENCES

1. Ferlay J, Shin HR, Bray F, Forman D, Mathers C, Parkin DM. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010 Dec 15;127(12):2893-917.
2. Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000 Aug 17;406(6797):747-52.
3. Sorlie T, Perou CM, Tibshirani R, Aas T, Geisler S, Johnsen H, et al. Gene expression patterns of breast carcinomas distinguish tumor subclasses with clinical implications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Sep 11;98(19):10869-74.
4. Stingl J, Caldas C. Molecular heterogeneity of breast carcinomas and the cancer stem cell hypothesis. *Nat Rev Cancer*. 2007 Oct;7(10):791-9.
5. Dent R, Trudeau M, Pritchard KI, Hanna WM, Kahn HK, Sawka CA, et al. Triple-negative breast cancer: clinical features and patterns of recurrence. *Clin Cancer Res*. 2007 Aug 1;13(15 Pt 1):4429-34.
6. Carey LA, Perou CM, Livasy CA, Dressler LG, Cowan D, Conway K, et al. Race, breast cancer subtypes, and survival in the Carolina Breast Cancer Study. *JAMA*. 2006 Jun 7;295(21):2492-502.
7. Sotiriou C, Neo SY, McShane LM, Korn EL, Long PM, Jazaeri A, et al. Breast cancer classification and prognosis based on gene expression profiles from a population-based study. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Sep 2;100(18):10393-8.
8. Prat A, Perou CM. Deconstructing the molecular portraits of breast cancer. *Mol Oncol*. 2011 Feb;5(1):5-23.
9. Reddy KB. Triple-negative breast cancers: an updated review on treatment options. *Curr Oncol*. 2011 Aug;18(4):e173-9.
10. Haffty BG, Yang Q, Reiss M, Kearney T, Higgins SA, Weidhaas J, et al. Locoregional relapse and distant metastasis in conservatively managed triple negative early-stage breast cancer. *J Clin Oncol*. 2006 Dec 20;24(36):5652-7.
11. Carey LA, Dees EC, Sawyer L, Gatti L, Moore DT, Collichio F, et al. The triple negative paradox: primary tumor chemosensitivity of breast cancer subtypes. *Clin Cancer Res*. 2007 Apr 15;13(8):2329-34.

12. Furuse M, Fujita K, Hiiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol.* 1998 Jun 29;141(7):1539-50.
13. Morohashi S, Kusumi T, Sato F, Odagiri H, Chiba H, Yoshihara S, et al. Decreased expression of claudin-1 correlates with recurrence status in breast cancer. *Int J Mol Med.* 2007 Aug;20(2):139-43.
14. Szasz AM, Tokes AM, Micsinai M, Krenacs T, Jakab C, Lukacs L, et al. Prognostic significance of claudin expression changes in breast cancer with regional lymph node metastasis. *Clin Exp Metastasis.* 2011 Jan;28(1):55-63.
15. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Mathe M, Paska C, Lodi C, et al. The expression of five different claudins in invasive breast carcinomas: comparison of pT1pN1 and pT1pN0 tumors. *Pathol Res Pract.* 2005;201(8-9):537-44.
16. Lanigan F, McKiernan E, Brennan DJ, Hegarty S, Millikan RC, McBryan J, et al. Increased claudin-4 expression is associated with poor prognosis and high tumour grade in breast cancer. *Int J Cancer.* 2009 May 1;124(9):2088-97.
17. Tokes AM, Kulka J, Paku S, Szik A, Paska C, Novak PK, et al. Claudin-1, -3 and -4 proteins and mRNA expression in benign and malignant breast lesions: a research study. *Breast Cancer Res.* 2005;7(2):R296-305.
18. Kulka J, Szasz AM, Nemeth Z, Madaras L, Schaff Z, Molnar IA, et al. Expression of tight junction protein claudin-4 in basal-like breast carcinomas. *Pathol Oncol Res.* 2009 Mar;15(1):59-64.
19. Blanchard AA, Skliris GP, Watson PH, Murphy LC, Penner C, Tomes L, et al. Claudins 1, 3, and 4 protein expression in ER negative breast cancer correlates with markers of the basal phenotype. *Virchows Arch.* 2009 Jun;454(6):647-56.
20. Bernardi MA, Logullo AF, Pasini FS, Nonogaki S, Blumke C, Soares FA, et al. Prognostic significance of CD24 and claudin-7 immunoexpression in ductal invasive breast cancer. *Oncology Reports.* [Article]. 2012 Jan;27(1):28-38.
21. Sauer T, Pedersen MK, Ebeltoft K, Naess O. Reduced expression of Claudin-7 in fine needle aspirates from breast carcinomas correlate with grading and metastatic disease. *Cytopathology.* 2005 Aug;16(4):193-8.
22. Park D, Karesen R, Axcrona U, Noren T, Sauer T. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. *APMIS.* 2007 Jan;115(1):52-65.

23. Kominsky SL, Argani P, Korz D, Evron E, Raman V, Garrett E, et al. Loss of the tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. *Oncogene*. 2003 Apr 3;22(13):2021-33.
24. Detre S, Saclani Jotti G, Dowsett M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. *J Clin Pathol*. 1995 Sep;48(9):876-8.
25. Szasz AM, Nemeth Z, Gyorffy B, Micsinai M, Krenacs T, Baranyai Z, et al. Identification of a claudin-4 and E-cadherin score to predict prognosis in breast cancer. *Cancer Sci*. 2011 Dec;102(12):2248-54.
26. Rakha EA, Elsheikh SE, Aleskandarany MA, Habashi HO, Green AR, Powe DG, et al. Triple-negative breast cancer: distinguishing between basal and nonbasal subtypes. *Clin Cancer Res*. 2009 Apr 1;15(7):2302-10.
27. Cheang MC, Voduc D, Bajdik C, Leung S, McKinney S, Chia SK, et al. Basal-like breast cancer defined by five biomarkers has superior prognostic value than triple-negative phenotype. *Clin Cancer Res*. 2008 Mar 1;14(5):1368-76.
28. Perou CM. Molecular stratification of triple-negative breast cancers. *Oncologist*. 2011;16 Suppl 1:61-70.
29. Sorlie T, Tibshirani R, Parker J, Hastie T, Marron JS, Nobel A, et al. Repeated observation of breast tumor subtypes in independent gene expression data sets. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Jul 8;100(14):8418-23.
30. Chen LH, Kuo WH, Tsai MH, Chen PC, Hsiao CK, Chuang EY, et al. Identification of prognostic genes for recurrent risk prediction in triple negative breast cancer patients in Taiwan. *PLoS One*. 2011;6(11):e28222.
31. Gucalp A, Traina, T.A. Triple-Negative Breast Cancer: Adjuvant Therapeutic Options. *Chemotherapy Research and Practice*. 2011;2011:13.
32. Voduc KD, Cheang MC, Tyldesley S, Gelmon K, Nielsen TO, Kennecke H. Breast cancer subtypes and the risk of local and regional relapse. *J Clin Oncol*. 2010 Apr 1;28(10):1684-91.
33. McClane BA, Hanna PC, Wnek AP. Clostridium perfringens enterotoxin. *Microb Pathog*. 1988 May;4(5):317-23.
34. Kominsky SL, Vali M, Korz D, Gabig TG, Weitzman SA, Argani P, et al. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast

carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. *Am J Pathol.* 2004 May;164(5):1627-33.

35. Kominsky SL, Tyler B, Sosnowski J, Brady K, Doucet M, Nell D, et al. Clostridium perfringens enterotoxin as a novel-targeted therapeutic for brain metastasis. *Cancer Res.* 2007 Sep 1;67(17):7977-82.

36. Walther W, Petkov S, Kuvardina ON, Aumann J, Kobelt D, Fichtner I, et al. Novel Clostridium perfringens enterotoxin suicide gene therapy for selective treatment of claudin-3- and -4-overexpressing tumors. *Gene Ther.* 2011 Oct 6.

37. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Tsunoda S, Mochizuki Y, Hamakubo T, et al. A novel tumor-targeted therapy using a claudin-4-targeting molecule. *Mol Pharmacol.* 2009 Oct;76(4):918-26.

38. Saeki R, Kondoh M, Kakutani H, Matsuhisa K, Takahashi A, Suzuki H, et al. A claudin-targeting molecule as an inhibitor of tumor metastasis. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Aug;334(2):576-82.

7 ANEXOS

Nome:			
Prontuário:		Nº na pesq.:	Data Nasc:
Telefone:			
Contato:	Data:	Encontrada: Não () Sim ()	
Contato Telefônico:	Recidiva: Sim, Local () A distância () Não ()		
	Morte: Não () Sim () Outra causa ()		
cTNM:		Data:	não consta ()
Procedimento:	Data:		
	Qual:	Biópsia ()	Cirurgia () Mastectomia () Setorectomia ()
	Tipo Histológico:		
	Grau histológico:	I ()	II () III ()
	Necrose:	Sim () Não ()	
	Linfonodos:	Retirados () Acometidos ()	
	Infiltração Linfocítica:	Nenhuma () Moderada ()	Pouca () Intensa ()
pTNM:		Data:	não consta ()
IHQ:	p53:	Ki67:	
Tratamento:	Químio NeoAdj () Químio Adj () Radio () Cirurgia ()		
Recidiva Pront:	Não () Se Sim, Local () A distância ()		
Morte Pront:	Morte: Não () Sim () Outra causa ()		