

# MammaGene<sup>®</sup>: ensaio quantitativo de 21 genes para prognóstico do câncer de mama receptor de estrogênio positivo

*MammaGene<sup>®</sup>: a quantitative 21-gene assay for prognostic of breast cancer estrogen receptor-positive*

Filomena M. Carvalho<sup>1</sup>, Elida B. Ojopi<sup>2</sup>, Francini de Mattos Lima Lin<sup>3</sup>, Ana Paula Torres<sup>2</sup>, Carlos E. Bacchi<sup>2</sup>

## Descritores

Câncer de mama  
Reação em cadeia da polimerase  
via transcriptase reversa  
Variação genética  
Prognóstico  
Imunoistoquímica  
Receptores estrogênicos

## Keywords

Breast cancer  
Polymerase Chain Reaction,  
Reverse Transcriptase; RT-PCR  
Genetic variation  
Prognosis  
Immunohistochemistry  
Estrogen receptors

## RESUMO

**Objetivos:** Padronizar em nosso meio um ensaio que analisa, por RT-PCR, 21 genes e descrever a experiência inicial com 95 casos consecutivos de carcinoma inicial de mama receptor de estrogênio positivo. **Métodos:** O teste foi desenvolvido a partir dos relatos publicados por Cronin et al. (2004) e Paik et al. (2004) para a avaliação da expressão de genes em tecido fixado em formalina e incluído em parafina. O teste foi aplicado em uma coorte consecutiva de 95 amostras de câncer de mama receptor de estrogênio positivo e os escores finais foram comparados com a idade da paciente, o tamanho do tumor, o tipo e o grau histológico, expressão imunoistoquímica do receptor de estrogênio, índice de Ki67 e subtipo molecular. **Resultados:** Os escores finais variaram de 3 a 90 e as categorias de risco de recorrência em dez anos foram: baixa (34 casos), intermediária (38 casos) e alta (23 casos). Não houve associação das categorias de risco com idade, comprometimento linfonodal e tipo histológico. A média do tamanho dos tumores foi maior no grupo de alto escore (2,0 *versus* 1,2 cm). Observou-se associação entre o escore obtido pelo teste e grau histológico, Ki-67, nível de expressão de receptor de estrogênio e subtipo molecular. **Conclusão:** A realização do teste de 21 genes foi factível em nosso meio. Além disso, os dados preliminares, aliados aos dados da literatura, sugerem que tal teste pode ser uma ferramenta útil na avaliação do risco de recorrência à distância em câncer de mama receptor de estrogênio positivo. No entanto, estudos adicionais são necessários para comparar os resultados deste trabalho com séries amplas publicadas na literatura.

## ABSTRACT

**Objectives:** To standardize a homemade RT-PCR-based 21-gene assay and to describe the preliminary experience with 95 early positive estrogen receptor breast cancer consecutive cases. **Methods:** The test was developed using the reports described by Cronin et al. (2004) and Paik et al. (2004) for the evaluation of gene expression in fixed, paraffin-embedded tumor tissue. The test was performed in a consecutive cohort of 95 positive estrogen receptor breast carcinomas, and the final scores were compared with the patient's age, tumor size, histological type, histological degree, estrogen receptor immunohistochemical expression, Ki-67 expression, and molecular luminal subtype. **Results:** Final scores

Trabalho realizado na Consultoria em Patologia, Botucatu (SP), Brasil.

<sup>1</sup> Professora-associada; Livre docente do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP) – São Paulo (SP), Brasil; Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

<sup>2</sup> Consultoria em Patologia – Botucatu (SP), Brasil.

<sup>3</sup> Pós-graduanda do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina da USP – São Paulo (SP), Brasil.

Endereço para correspondência: Filomena M. Carvalho – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – Avenida Dr. Arnaldo, 455 – CEP 01246-903 – São Paulo (SP), Brasil – E-mail: filomena@usp.br.

Conflito de interesse: nenhum.

**Recebido em:** 06/08/2010. **Aceito em:** 07/12/2010

ranged from 3 to 90 and risk categories of recurrence in ten years were: low (34 cases), intermediate (38 cases), and high (23 cases). There was no association between score categorical distribution and age, lymph node status, or histological type. Mean tumor size was higher in the high score group (2.0 versus 1.2 cm). We have observed an overall concordance between the score obtained by the test, and the histological degree, Ki-67, estrogen receptor level, and molecular subtype. **Conclusion:** The developed 21-gene assay is a feasible test to be performed in a homemade setting. Besides, the preliminary data from this study suggest, in comparison with data from the literature, that this test has the potential to be a useful tool to evaluate the risk of breast cancer distant recurrence. However, further data are necessary in order to compare this paper's results with larger series published in the literature.

## Introdução

A heterogeneidade clínica e morfológica do câncer de mama ocorre, em grande parte, pela expressão anormal dos genes que compõem o tumor<sup>1</sup>. O comportamento da neoplasia depende da complexa relação entre centenas ou milhares de diferentes genes, que atuam por meio de suas respectivas proteínas em diferentes estágios da função celular<sup>1,2</sup>. Embora o uso da imunohistoquímica seja considerado como padrão de prática no manejo do câncer de mama, prevendo tanto a resposta ao tratamento hormonal, como orientando para a terapia dirigida ao HER2, esse método apresenta algumas limitações, dentre elas, o número de marcadores que podem ser avaliados em cada caso ou mesmo em uma coleção de casos. Além disso, ela não é suficientemente objetiva na previsão da eficácia e toxicidade de drogas citotóxicas<sup>3</sup>. O desenvolvimento de tecnologias de sequenciamento do genoma proveu a oportunidade de estudar simultaneamente vários genes implicados no comportamento biológico do tumor, gerando o desenvolvimento de vários testes comerciais envolvendo a pesquisa de múltiplos genes e que são usados como ferramentas preditivas e prognósticas no manejo do câncer de mama, com o objetivo de individualizar o tratamento da doença<sup>3</sup>. Oncotype Dx<sup>®</sup>, MammaPrint<sup>®</sup>, grau genômico (MapQuant Dx) e o teste de dois genes *HOXB13:IL17BR* (Quest Diagnostics) estão, atualmente, entre os testes multigênicos mais populares<sup>4-9</sup>. Alguns destes testes requerem tecido a fresco para sua realização, enquanto outros podem ser realizados usando amostras de tecidos fixados em formalina e incluídos em parafina. Embora a coincidência dos genes testados por esses testes comerciais seja baixa, todos possuem importante influência de genes relacionados à proliferação<sup>10</sup>. Oncotype Dx<sup>®</sup> é um ensaio de RT-PCR de 21 genes realizado em amostras de tecido parafinado e utilizado como ferramenta prognóstica e preditiva de câncer de mama primário, por meio da previsão individualizada dos benefícios da quimioterapia baseado no risco de recorrência à distância em dez anos. Oncotype Dx<sup>®</sup> analisa os níveis de mRNA de cinco genes relacionados à proliferação que têm grande influência no escore de recorrência (RS), além de genes relacionados ao receptor de estrogênio (RE) e do oncogene *HER-2*, grupos com peso importante no

RS. O teste é recomendado pela American Society of Clinical Oncology (ASCO)<sup>11</sup>.

De acordo com o Instituto Nacional do Câncer (INCA), o câncer de mama é o tumor mais prevalente na mulher brasileira. Com um número esperado de 49.240 casos novos diagnosticados em 2010, esse representa um risco estimado de 49 casos para cada 100.000 mulheres<sup>12</sup>. A região Sudeste do Brasil tem os índices mais elevados com um risco estimado de 88,3 casos a cada 100.000 mulheres<sup>12</sup>. Considerando que o subtipo luminal é o mais frequente, inclusive entre os tumores de alto grau histológico<sup>13</sup>, o desafio deste trabalho é identificar as neoplasias mais agressivas no subgrupo de pacientes cujos tumores apresentem RE positivo.

Neste estudo, foi proposto desenvolver um teste multigênico quantitativo inteiramente baseado nos métodos descritos por Cronin et al.<sup>14</sup> e Paik et al.<sup>4</sup>, utilizados para desenvolver o Oncotype Dx<sup>®</sup>. Nesses trabalhos, é descrita a avaliação da expressão de mRNA de 16 genes relacionados ao câncer e de 5 genes Controles em amostras tumorais fixadas em formalina e incluídas em parafina. A seguir, avaliou-se a associação entre os escores ou índices do próprio ensaio de 21 genes e as seguintes características: idade da paciente, estado linfonodal, tamanho do tumor, tipo e grau histológicos, subtipo luminal (A ou não-A), níveis de imunexpressão dos RE e progesterona (RP) (alto ou baixo) e índice de proliferação celular avaliado pela expressão do Ki67.

## Métodos

Toda a preparação das amostras foi realizada na Consultoria em Patologia, um laboratório de referência em Patologia Diagnóstica que está localizado na cidade de Botucatu, em São Paulo, Brasil. Foram revisados e selecionados 95 casos de tumores de mama RE positivo, fixados em formalina e incluídos em parafina, os quais continham áreas representativas de carcinoma invasivo. Realizou-se a microdissecção com lâmina cirúrgica da área de interesse, excluindo componente *in situ*, necrose e tecido mamário normal. O RNA foi extraído do tecido reidratado, utilizando reagente TRIzol<sup>®</sup> (Invitrogen,

Carlsbad, CA) e solubilizando-o em água livre de RNase. Um micrograma de RNA total foi utilizado para a síntese de cDNA, por SuperScript II transcriptase reversa (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) e *primers* aleatórios. Foi incluso um passo para controle de qualidade do cDNA amplificando fragmentos de 100 a 600 pares de bases (pb). Foram selecionados exatamente os mesmos 16 genes relacionados ao câncer e os mesmos 5 genes de referência que correspondem àqueles que compõem o teste Oncotype Dx<sup>®4</sup>. Os genes analisados e os números de acesso dos respectivos mRNA utilizados neste estudo estão listados na Tabela 1.

A expressão gênica foi avaliada como descrita por Cronin et al.<sup>14</sup> e Paik et al.<sup>4,14</sup>. Em sùmula, após extração do RNA e tratamento com DNase I, o conteúdo total de RNA foi medido por meio da transcrição reversa seguida da reação de polimerização em cadeia quantitativa em tempo real (RT-PCR), em placas de 96 poços. As reações foram realizadas com o equipamento 7500 Fast Real-Time PCR System utilizando *primers* e sondas TaqMan<sup>®</sup>, ambos da Applied Biosystems (Foster City, CA). A expressão de cada gene foi medida em

quadruplicata, agregada e normalizada de acordo com os cinco genes de referência selecionados. A  $C_T$  de referência (ciclo de corte) para cada amostra testada foi definida como a média das  $C_T$  medidas dos cinco genes de referência. O nível relativo do mRNA de um gene-alvo dentro de uma amostra de tecido foi definido como  $2^{\Delta CT} + 10.0$ , onde  $\Delta CT = CT$  (gene teste) –  $C_T$  (ciclo de corte).

Para cálculo do score, aplicou-se para cada grupo de genes (proliferação, RE, HER-2 e invasão) o peso descrito por Paik et al. para cálculo do RS<sup>4</sup>. O teste foi registrado como MammaGene<sup>®</sup>.

Os casos incluídos no estudo foram analisados por dois dos autores (FMC, APS), e foram determinados de acordo com a classificação de tumores da Organização Mundial da Saúde (OMS) e graduados pelo Sistema de Nottingham<sup>15</sup>. Foi realizada análise imunoistoquímica de RE, RP, HER-2 e Ki67 em todos os casos. Os fornecedores e as diluições destes anticorpos e método de recuperação de epitopos estão listados na Tabela 2. O sistema de detecção foi Novolink<sup>TM</sup> (Thermo Scientific, USA), 45 minutos em temperatura ambiente. O RE

**Tabela 1.** Lista de genes usados no método de ensaio dos 21 genes

Gene	Outras designações	mRNA	Categoria	Descrição
<i>ACTB</i>	Beta-actin ACTB	NM_001101.3	Referência	actina, beta
<i>GAPDH</i>	GAPDH	NM_002046.3	Referência	gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase
<i>GUSB</i>	GUS, BG	NM_000181.2	Referência	glucuronidase, beta
<i>RPLP0</i>	RPP0, MGC88175	NM_001002.3	Referência	proteína ribossomal, grande, P0
<i>TFRC</i>	CD71, TFR, TFR1, TRFR	NM_003234.2	Referência	Receptor de transferrina (p90, CD71)
<i>GRB7</i>	GRB-7	NM_005310.2	HER2	Gene da proteína 7 ligada ao receptor de fator de crescimento
<i>ERBB2</i>	HER2, Her2, CD340, HER-2, HER-2/neu	NM_004448.2	HER2	Receptor do fator de crescimento 2
<i>ESR1</i>	ER, ESR, ESRA	NM_000125.3	Estrogênio	Receptor de estrogênio tipo 1
<i>PGR</i>	PR	NM_000926.4	Estrogênio	Receptor de progesterona
<i>BCL2</i>	Bcl2, BCL-2	NM_000633.2	Estrogênio	Gene envolvido com a inibição da apoptose
<i>SCUBE2</i>	CEGB1, CEGF1, CEGP1, FLJ16792	NM_020974.1	Estrogênio	Gene supressor do crescimento
<i>BIRC5</i>	Survivin, API4, EPR-1	NM_001168.2	Proliferação	Survivina
<i>MKI67</i>	KIA, Ki-67, Ki67	NM_002417.3	Proliferação	Antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki-67
<i>MYBL2</i>	B-MYB, BMYB	NM_002466.2	Proliferação	Oncogene homólogo ao v-myb
<i>CCNB1</i>	Cyclin B1, CCNB	NM_031966.2	Proliferação	ciclina B1
<i>AURKA</i>	AIK, ARK1, AURA, STK6, STK7, STK15	NM_003600.2	Proliferação	aurora quinase A
<i>CTSL2</i>	Cathepsin L2, CTSU, CTSV, CATL2	NM_001333.2	Invasão	catepsina L2
<i>MMP11</i>	Stromelysin 3, SL-3, ST3, STMY3	NM_005940.3	Invasão	Metalopeptidase de matrix 11 (stromelisin 3)
<i>CD68</i>	GP110, SCARD1	NM_001251.2	--	Molécula CD68
<i>GSTM1</i>	GST1, GSTM1-1, GSTM1a-1a, GSTM1b-1b, GTH4, GTM1,	NM_000561.3	--	glutathione S-transferase M1
<i>BAG1</i>	HAP, RAP46	NM_004323.4	--	athanogene associado ao BCL2-

e o RP foram considerados positivos nos casos em que houve coloração nuclear de moderada a forte intensidade, em pelo menos 1% das células do tumor. Os casos RE/RP positivos foram categorizados como baixa ou alta expressão para valores  $\leq 75\%$  e  $> 75\%$ . Foram consideradas amostras positivas para HER-2 aquelas que apresentaram escore 3 positivo, conforme recomendações da ASCO e do Colégio Americano de Patologistas (CAP)<sup>16</sup>. Ki-67 foi avaliado em pelo menos 200 células tumorais nas áreas de mais forte expressão, e os valores foram expressos em porcentagem de células positivas. Os casos também foram classificados em dois grupos, de acordo com a classificação molecular do câncer de mama: luminal A e B. No Grupo luminal A, foram incluídos os casos com forte expressão de RE, HER-2 negativo (0 ou 1+) e expressão de Ki-67 abaixo de 13,5%, conforme sugerido por Cheang et al.<sup>17</sup>. Os demais casos foram categorizados como Luminal B.

As associações entre o escore final do presente teste de 21 genes e as variáveis categóricas foram testadas pelo teste do  $\chi^2$  de Pearson. Para a comparação das médias das variáveis numéricas (idade, tamanho do tumor e índice de Ki-67), de acordo com o escore, utilizou-se a Análise de Variância de Fisher (ANOVA). Para todos os testes, considerou-se um valor de p de 0.05 ou inferior.

## Resultados

A discordância entre os escores para determinações pareadas em cada amostra tumoral variou de - 3,948 a 6,425, com média de 0,681 (43% dos casos tiveram diferenças dentro de - 1.000 a 1.000). O escore final variou de 3 a 90 (intervalo total de 0 - 100); 34 casos abaixo de 18; 38 casos entre 18 e 30 e 23 casos acima de 30.

**Tabela 2.** Detalhes técnicos da análise imunoistoquímica

Antígeno	Diluição	Clone/Fonte	Método de recuperação antigênica
RE	1:500	SP1 (monoclonal de coelho)/ Thermo Scientific, USA	Panela de pressão (Tender Cooker, Nordic Wave, USA), tampão citrato (pH 6), 9 minutos.
Receptor de progesterona (RP)	1:1000	PgR636 (monoclonal de camundongo)/ Dako Corporation, USA	Panela de pressão (Tender Cooker, Nordic Wave, USA), tampão citrato (pH 6), 9 minutos.
HER2	1:100	SP3 (monoclonal de coelho)/ Thermo Scientific, USA	Forno micro-ondas, (Eletrolux, 900W), tampão citrato (pH 6), 15 minutos.
Ki-67	1:600	MIB-1(monoclonal de camundongo)/ Dako Corporation, USA	Panela de pressão (Tender Cooker, Nordic Wave, USA), tampão citrato (pH 6), 8 minutos.

**Tabela 3.** Variáveis clínico-patológicas de acordo com os escores de recorrência em dez anos obtidos com o MammaGene®

Variável	n	Escore baixo (< 18)	Escore intermediário (18 - 30)	Escore alto (> 30)	Valor p	
Idade	79	54,6 ± 9,53	52,58 ± 11,19	53,62 ± 10,98	0,773 <sup>2</sup>	
Tamanho do tumor (cm)	87	1,25 ± 0,49	1,24 ± 0,56	2,0 ± 1,66	0,010 <sup>2</sup>	
Metástases em linfonodos	11 (sim)	3(4,3%)	6(8,6%)	2(2,8%)	0,493 <sup>1</sup>	
	59 (não)	22(31,4)	21(30%)	16 (22,8%)		
Tipo histológico	ductal	76	27 (35,2%)	30 (39,4%)	19 (25%)	0,997 <sup>1</sup>
	lobular	14	5	6	3	
	outros	5	2	2	1	
Grau histológico <sup>3</sup>	1	35	15	15	5	0,027 <sup>1</sup>
	2	55	18	23	14	
	3	5	1	0	4	
Subtipo luminal	A	53	25	20	8	0,013 <sup>1</sup>
	B	42	9	18	15	
Expressão de RE	Fraca	18	2	8	8	0,022 <sup>1</sup>
	Forte	77	32	30	15	
Índice de Ki-67 (% de células positivas)	93	10,75 ± 8,18	15,27 ± 11,04	21,65 ± 23,35	0,027 <sup>2</sup>	

<sup>1</sup> $\chi^2$  de Pearson; <sup>2</sup>Análise de Variância (ANOVA); <sup>3</sup>Sistema de graduação de Nottingham.

A idade das pacientes variou de 34 a 76 anos (média  $\pm$  desvio padrão - DP; 53,84  $\pm$  10,31 anos). O tamanho do tumor variou de 0,2 a 8 cm (média  $\pm$  DP; 1,5  $\pm$  1,06 cm). O *status* linfonodal axilar estava disponível em 70 casos e foi negativo para a presença de metástases em 59 (84,2%) casos. RE e/ou PR foram positivos em todos os casos e em 77 (81%) com mais de 75% das células positivas. O teste HER-2 pelo exame imunoistoquímico foi negativo (escore 0 ou 1+) em 92 (96,8%) casos, escore 2+ em um caso, que permaneceu negativo após FISH, e positivo, (escore 3+) em dois casos. O índice de Ki-67 estava disponível em 93 casos e variou de 1 a 90% das células positivas (média  $\pm$  DP; 15,24  $\pm$  14,9%). Cinquenta e três (55,8%) casos foram classificados como subtipo molecular A e 42 (44,2%) como subtipo luminal B. Setenta e seis (80%) eram do tipo histológico ductal. Outros tipos histológicos foram lobular (14 casos; 14,7%), tubular (4 casos) e papilífero (1 caso). A distribuição de todas as variáveis com as diversas categorias do escore final é apresentada na Tabela 3.

## Discussão

A possibilidade de estudar múltiplas variáveis simultaneamente por meio de métodos como microarranjos de DNA e RT-PCR inaugurou novo estágio do conhecimento e manejo do câncer de mama. Quatro grandes classes moleculares de câncer de mama surgiram por vários estudos: luminal - A, luminal - B, HER-2 e tipo basal<sup>1,18</sup>. Com a incorporação do perfil genético, o câncer de mama passou de doença única a diferentes entidades candidatas a diferentes abordagens terapêuticas. A translação do perfil genético na prática pode ser feita pelas moléculas associadas a cada tipo de tumor e passíveis de determinação imunoistoquímica<sup>17,19,20</sup>. Embora não haja consenso sobre os critérios para a classificação molecular dos carcinomas de mama, de acordo com o perfil imunoistoquímico, a maioria dos pesquisadores usa basicamente RE, RP e HER-2, associados a Ki-67, citoqueratinas basais 5/6 (CK 5/6) e o receptor do fator de crescimento epidermal (EGFR ou HER1). Uma das classificações molecular mais aceita do câncer de mama na literatura é a de Carey et al.: luminal A (RE+ e /ou RP+, HER2 -), luminal B (RE+ e/ou RP+, HER2 +), basal-símile (RE-, RP-, HER-2-, CK 5/6 positivo, e/ou EGFR +), HER2 (RE-, RP- e HER2+) e não-classificados (negativos para os cinco marcadores)<sup>21</sup>. A determinação dos carcinomas do tipo luminal B é das mais controversas. Para Cheang et al., a expressão de Ki-67 acima de 13,25% é o melhor critério de identificação do subgrupo luminal B<sup>17</sup>. A expressão do RE é a característica dos carcinomas tipo luminal A e B, e é marcador preditivo de resposta a terapias dirigidas contra a síntese de estrogênio ou o bloqueio da ação do seu receptor. No entanto, a resistência inata ou adquirida à terapia endócrina é comum e o benefício da quimioterapia é fator importante de discussão para esses pacientes.

Sabe-se que o câncer de mama RE positivo é de fato grupo heterogêneo, e o perfil molecular sugere que existam pelo menos duas doenças distintas de origem luminal e que poderiam ser, provavelmente, tratadas de maneiras diferentes<sup>22</sup>. O grande desafio deste trabalho é transferir os dados dos microarranjos para a prática clínica por meio de testes viáveis que sejam capazes de auxiliar nas decisões terapêuticas. Entre os testes multi-gênicos comercialmente disponíveis, os dois mais amplamente utilizados são o ensaio de 21 genes (Oncotype Dx<sup>®</sup>) e o ensaio de 70 genes (MammaPrint<sup>®</sup>), ambos avaliando principalmente genes relacionados à proliferação, seguido por genes relacionados ao RE e HER-2<sup>4,7</sup>. Embora com menor número de genes e dados de análises contínuos ao invés de dicotômicos, OncotypeDx<sup>®</sup> tem a vantagem de ser realizado em tecido fixado em formalina e incluído em parafina. O teste desenvolvido pela Consultoria em Patologia e aqui descrito avalia a expressão do painel de 21 genes, que é combinado com algoritmo quantitativo, resultando em índice ou escore, o qual varia de 0 a 100, como descrito por Cronin et al. e Paik et al.<sup>4,14</sup>. Os resultados preliminares deste artigo com o ensaio desenvolvido em nosso laboratório mostraram concordância entre o índice final e as variáveis relacionadas à diferenciação celular (grau histológico), proliferação (índice de Ki-67), nível de expressão de RE/RP (conteúdo de RE) e subtipos luminal A ou B (conteúdo de RE e atividade de proliferação). A maior pontuação (90), nesta série, foi observada em caso com superexpressão de HER-2 pela técnica imunoistoquímica. Estes resultados indicam que o presente teste parece ser confiável, visto que avalia com precisão a expressão de genes relacionados ao RE e à proliferação, principais componentes do teste de 21 genes.

Flanagan et al., em elegante estudo, mostraram que o grau nuclear, a contagem mitótica e o *status* do RE, RP e HER2 são capazes de prever o RS<sup>23</sup>. Curiosamente, percebe-se que, entre os casos de baixo escore (22 casos), quatro deles (18%) mostraram Ki-67 de 25% ou superior. Estes quatro casos também expressavam altos níveis de RE, eram menores de 2,0 cm e grau nuclear 2, sendo que três deles eram grau histológico 2 e um deles, grau histológico 1. Alguns destes casos podem corresponder àqueles de RS baixo que recorrem, como sugerido por Gwin et al.<sup>24</sup>, e que, de acordo com relatos de Paik et, perfazem aproximadamente 6% dos tumores de baixo RS<sup>4</sup>. No geral, os presentes dados confirmam a importância das variáveis histopatológicas clássicas, ainda muito importantes para a decisão clínica, mas sugerem que a informação pode ser melhorada com o teste de 21 genes.

Conclui-se que a realização do teste de 21 genes é factível em laboratórios bem estruturados para técnicas de Biologia Molecular, e que a informação oferecida é coerente com o comportamento biológico esperado dos carcinomas de mama. Os resultados obtidos pelos autores deste artigo ainda são preliminares e necessitam análises com maior casuística, comparação com o desempenho de outros testes genéticos relatados na

literatura e, sobretudo, avaliação do seu impacto no prognóstico das pacientes. Entretanto, os dados até o presente indicam que sua aplicação prática não substitui os critérios utilizados no manejo terapêutico, mas os complementa, permitindo melhor individualização dos casos.

## Agradecimentos

Os autores agradecem às Doutoradas Luciana Hayashi Silva e Lucimara Chioato Benine pela hábil assistência técnica neste estudo.

## Referências

- Perou CM, Sorlie T, Eisen MB, van de Rijn M, Jeffrey SS, Rees CA, et al. Molecular portraits of human breast tumours. *Nature*. 2000;406(6797):747-52.
- Sorlie T, Wang Y, Xiao C, Johnsen H, Naume B, Samaha RR, et al. Distinct molecular mechanisms underlying clinically relevant subtypes of breast cancer: gene expression analyses across three different platforms. *BMC Genomics*. 2006;7:127.
- Ross JS. Multigene classifiers, prognostic factors, and predictors of breast cancer clinical outcome. *Adv Anat Pathol*. 2009;16(4):204-15.
- Paik S, Shak S, Tang G, Kim C, Baker J, Cronin M, et al. A multi-gene assay to predict recurrence of tamoxifen-treated, node-negative breast cancer. *N Engl J Med*. 2004;351(27):2817-26.
- Sotiriou C, Wirapati P, Loi S, Harris A, Fox S, Smeds J, et al. Gene expression profiling in breast cancer: understanding the molecular basis of histologic grade to improve prognosis. *J Natl Cancer Inst*. 2006;98(4):262-72.
- Jansen MP, Sieuwerts AM, Look MP, Ritstier K, Meijer-van Gelder ME, van Staveren IL, et al. HOXB13-to-IL17BR expression ratio is related with tumor aggressiveness and response to tamoxifen of recurrent breast cancer: a retrospective study. *J Clin Oncol*. 2007;25(6):662-8.
- van de Vijver MJ, He YD, van't Veer LJ, Dai H, Hart AA, Voskuil DW, et al. A gene-expression signature as a predictor of survival in breast cancer. *N Engl J Med*. 2002;347(25):1999-2009.
- Liu R, Wang X, Chen GY, Dalerba P, Gurney A, Hoey T, et al. The prognostic role of a gene signature from tumorigenic breast-cancer cells. *N Engl J Med*. 2007;356(3):217-26.
- Carvalho FM. Assinaturas genéticas no câncer de mama. *Revista Brasileira de Mastologia*. [review]. 2009;18(3):5.
- Ross JS, Hatzis C, Symmans WF, Pusztai L, Hortobágyi GN. Commercialized multigene predictors of clinical outcome for breast cancer. *Oncologist*. 2008;13(5):477-93.
- Harris L, Fritsche H, Mennel R, Norton L, Ravdin P, Taube S, et al. American Society of Clinical Oncology 2007 update of recommendations for the use of tumor markers in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(33):5287-312.
- Institute BNC. Estimate/2010 - Incidence of Cancer in Brazil. Rio de Janeiro: INCA; 2009 [cited 2010 01/01/2010]; Available from: [http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo\\_view.asp&ID=2](http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/index.asp?link=conteudo_view.asp&ID=2).
- Fernandes RC, Bevilacqua JL, Soares IC, Siqueira SA, Pires L, Hegg R, et al. Coordinated expression of ER, PR and HER2 define different prognostic subtypes among poorly differentiated breast carcinomas. *Histopathology*. 2009;55(3):346-52.
- Cronin M, Pho M, Dutta D, Stephans JC, Shak S, Kiefer MC, et al. Measurement of gene expression in archival paraffin-embedded tissues: development and performance of a 92-gene reverse transcriptase-polymerase chain reaction assay. *Am J Pathol*. 2004;164(1):35-42.
- Elston CW, Ellis IO. Pathological prognostic factors in breast cancer. I. The value of histological grade in breast cancer: experience from a large study with long-term follow-up. *Histopathology*. 1991;19(5):403-10.
- Wolff AC, Hammond ME, Schwartz JN, Hagerty KL, Allred DC, Cote RJ, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for human epidermal growth factor receptor 2 testing in breast cancer. *J Clin Oncol*. 2007;25(1):118-45.
- Cheang MC, Chia SK, Voduc D, Gao D, Leung S, Snider J, et al. Ki67 index, HER2 status, and prognosis of patients with luminal B breast cancer. *J Natl Cancer Inst*. 2009;101(10):736-50.
- 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;98(19):10869-74.
- Goldstein NS, Decker D, Severson D, Schell S, Vicini F, Margolis J, et al. Molecular classification system identifies invasive breast carcinoma patients who are most likely and those who are least likely to achieve a complete pathologic response after neoadjuvant chemotherapy. *Cancer*. 2007;110(8):1687-96.
- Bhargava R, Striebel J, Beriwal S, Flickinger JC, Onisko A, Ahrendt G, et al. Prevalence, morphologic features and proliferation indices of breast carcinoma molecular classes using immunohistochemical surrogate markers. *Int J Clin Exp Pathol*. 2009;2(5):444-55.
- 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;295(21):2492-502.
- Loi S, Haibe-Kains B, Desmedt C, Lallemand F, Tutt AM, Gillet C, et al. Definition of clinically distinct molecular subtypes in estrogen receptor-positive breast carcinomas through genomic grade. *J Clin Oncol*. 2007;25(10):1239-46.
- Flanagan MB, Dabbs DJ, Brufsky AM, Beriwal S, Bhargava R. Histopathologic variables predict Oncotype DX recurrence score. *Mod Pathol*. 2008;21(10):1255-61.
- Gwin K, Pinto M, Tavassoli FA. Complementary value of the Ki-67 proliferation index to the oncotype DX recurrence score. *Int J Surg Pathol*. 2009;17(4):303-10.