

PATRÍCIA CHAVES DE FREITAS CAMPOS JUCÁ

**ANÁLISE COMPARATIVA E CONTROLADA ENTRE OS PERFIS
MOLECULARES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO CARCINOMA
MAMÁRIO, DA METÁSTASE GÁSTRICA DE ORIGEM MAMÁRIA E
DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO PRIMÁRIO**

Tese apresentada à Escola Paulista de
Medicina, Universidade Federal de São
Paulo, para obtenção de título de Doutor
em Ciências.

**SÃO PAULO, SP
2016**

PATRÍCIA CHAVES DE FREITAS CAMPOS JUCÁ

**ANÁLISE COMPARATIVA E CONTROLADA ENTRE OS PERFIS
MOLECULARES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO CARCINOMA
MAMÁRIO, DA METÁSTASE GÁSTRICA DE ORIGEM MAMÁRIA E
DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO PRIMÁRIO**

Tese apresentada à Escola Paulista de
Medicina, Universidade Federal de São
Paulo, para obtenção de título de Doutor
em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Delcio Matos

Coorientadora: Prof. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay

SÃO PAULO, SP

2016

Campos Jucá, Patrícia Chaves de Freitas

Análise comparativa e controlada entre os perfis moleculares imuno-histoquímicos do carcinoma mamário, da metástase gástrica de origem mamária e do adenocarcinoma gástrico primário /

Patrícia Chaves de Freitas Campos Jucá. -- São Paulo, 2016.

xii, 72 f.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal de São Paulo. Escola Paulista de Medicina. Programa de Pós-graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar.

Comparative and controlled analysis between immunohistochemical profiles of breast carcinoma, gastric metastasis of mammary origin and primary gastric adenocarcinoma.

1. HNF4A. 2. Imuno-histoquímica. 3. Biomarcador. 4. Câncer gástrico. 5. Metástase gástrica. 6. Neoplasia mamária.

PATRÍCIA CHAVES DE FREITAS CAMPOS JUCÁ

**ANÁLISE COMPARATIVA E CONTROLADA ENTRE OS PERFIS
MOLECULARES IMUNO-HISTOQUÍMICOS DO CARCINOMA
MAMÁRIO, DA METÁSTASE GÁSTRICA DE ORIGEM MAMÁRIA E
DO ADENOCARCINOMA GÁSTRICO PRIMÁRIO**

Tese apresentada à Escola Paulista de
Medicina, Universidade Federal de São
Paulo, para obtenção de título de Doutor
em Ciências.

Aprovada em de de 2016.

Presidente da banca:

Prof. Dr. Delcio Matos (orientador/Unifesp)

Banca examinadora:

Prof. Dr. José Francisco Rinaldi (Fcmscsp)

Prof. Dr. José Roberto Filassi (Fmusp)

Profa. Dra. Edna Frasson de Sousa Montero (Unifesp)

Prof. Dr. Sarhan Sydney Saad (Unifesp)

Suplentes:

Prof. Dr. José Eduardo Gonçalves (Iamspe)

Prof. Dr. Marcelo Moura Linhares (Unifesp)

Dedicatória

Ao meu pai e minha mãe, pelo apoio incondicional, incentivo e parceria em todos os projetos da minha vida.

Aos meus filhos, Gustavo e Paula, razão da minha vida, pelo estímulo e compreensão.

Agradecimentos

À Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, que proporcionou tal pesquisa.

Ao Instituto Nacional de Câncer, minha escola, que mais uma vez apoiou meu aprimoramento acadêmico e profissional.

À Profa. Dra. Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay, pelo acolhimento, ensinamentos e parceria, sem os quais essa pesquisa não seria possível.

Ao Prof. Dr. Delcio Matos, meu orientador, pelo incentivo, disponibilidade e sabedoria na construção dessa tese de doutorado.

Ao Dr. José Humberto Simões Correa, pelo companheirismo, amizade e apoio, essenciais para meu crescimento pessoal e intelectual.

À Dra. Giselle Maria Vignal, pelo conhecimento, ensinamentos, compromisso e parceria na análise anatomopatológica e imuno-histoquímica, fundamentais no desenvolvimento desta pesquisa.

À Profa. Dra. Maria Theresa Accioly, pelos ensinamentos sobre a técnica de imuno-histoquímica.

À Juliana Bahiense e Gianni Santos, pela valiosa contribuição na análise estatística.

À Iris Maria de Souza Carvalho, bibliotecária incansável na busca por artigos.

À Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela valiosa retaguarda financeira que permitiu a realização deste estudo.

A todos aqueles que contribuíram de alguma forma, para que este sonho pudesse tornar-se realidade.

Sumário

Dedicatória	iv
Agradecimentos	v
Lista de Siglas	ix
Lista de Tabelas	x
Resumo	xi
Abstract	xii
1 INTRODUÇÃO	1
1.1 OBJETIVO.....	4
1.2 HIPÓTESE	4
2 REVISÃO DA LITERATURA	5
2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DA METÁSTASE GÁSTRICA DE ORIGEM MAMÁRIA.....	6
2.2 IDENTIFICAÇÃO DA METÁSTASE GÁSTRICA DE ORIGEM MAMÁRIA ATRAVÉS DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS	9
2.2.1 <i>Hepatocyte nuclear factor 4-alpha</i>	11
2.2.2 Receptores de estrogênio e de progesterona	12
2.2.3 Receptores de estrogênio e câncer de mama.....	13
2.2.4 Receptores de estrogênio e câncer gástrico	14
2.2.5 <i>Gross cystic disease fluid protein-15</i>	16
3 MÉTODOS	19
3.1 TIPO DE ESTUDO	20
3.2 ETAPAS DESENVOLVIDAS NA EXECUÇÃO DO PROJETO	20
3.2.1 Amostragem e coleta dos dados clínicos e histopatológicos.....	20
3.2.2 Amostra analisada.....	21
3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO NO ESTUDO.....	22
3.4 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA ANALISADA	23

3.5	PROCEDIMENTOS REALIZADOS	24
3.5.1	Levantamento dos blocos e respectivos prontuários.....	24
3.5.2	Classificação histopatológica	25
3.5.3	Análise imuno-histoquímica.....	25
3.5.4	Técnica de imuno-histoquímica.....	26
3.5.5	Crêterios adotados para mensura���� da express���� imuno- hstoqu�mica	27
3.5.6	Banco de dados amostrais e análise estatística.....	28
4	RESULTADOS	29
4.1	DADOS AMOSTRAIS E RESULTADOS GERAIS.....	30
4.2	RESULTADOS DAS IMUNOEXPRESS����S DOS MARCADORES SELECIONADOS	31
4.2.1	<i>Hepatocyte nuclear factor 4-alpha</i>	31
4.2.2	Receptor de estrogênio	33
4.2.3	Receptor de progesterona.....	33
4.2.4	<i>Gross cystic disease fluid protein-15</i>	34
4.3	INDICADORES DIAGNÓSTICOS DE CADA MARCADOR NO GRUPO TESTE COM OS INTERVALOS DE CONFIANÇA.....	36
4.4	RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTA INVESTIGA����	36
5	DISCUSS����	38
5.1	RELEV����IA DA PERGUNTA DA PESQUISA.....	39
5.2	A BAIXA PREVAL����NCIA DA METÁSTASE DO CÂNCER MAMÁRIO NO ESTÔMAGO E O SEU MECANISMO	40
5.3	MODELO DE PESQUISA.....	41
5.4	PROCEDIMENTOS EMPREGADOS E POSSÍVEIS VIESES.....	41
5.5	MARCADORES TUMORAIS SELECIONADOS.....	42
5.5.1	<i>Hepatocyte nuclear factor 4-alpha</i>	42
5.5.2	Receptor de estrógeno e receptor de progesterona.....	44
5.5.3	<i>Gross cystic disease fluid protein-15</i>	45
5.6	RESULTADOS OBTIDOS NESTA INVESTIGA����	46
5.7	IMPLICA������S PARA A PRÁTICA MÉDICA.....	46

5.8	IMPLICAÇÕES PARA A PESQUISA.....	47
5.9	CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	47
6	CONCLUSÕES.....	49
	REFERÊNCIAS.....	51
	ANEXOS	59
	BIBLIOGRAFIA CONSULTADA	71

Lista de Siglas

CDI	– Carcinoma ductal infiltrante
CDX2	– <i>Caudal type homeobox 2</i>
CK-20	– <i>Cytokeratin 20</i>
CK-7	– <i>Cytokeratin 7</i>
CLI	– Carcinoma lobular infiltrante
DIPAT	– Divisão de Patologia
GCDFP-15	– <i>Gross cystic disease fluid protein-15</i>
HER2	– <i>Human epidermal growth factor receptor-type 2</i>
HNF4A	– <i>Hepatocyte nuclear factor 4-alpha</i>
IHQ	– Imuno-histoquímica
INCA	– Instituto Nacional de Câncer
MAM	– <i>Mammaglobin</i>
MUC	– <i>Mucin</i>
NA	– Não avaliado
P1	– Promotor 1
P2	– Promotor 2
QT Neo	– Quimioterapia neoadjuvante
RE	– Receptor de estrogênio
RE-A	– Receptor de estrogênio alfa
RE-B	– Receptor de estrogênio beta
RH	– Receptor hormonal
RP	– Receptor de progesterona
TGI	– Trato gastrointestinal
VPN	– Valor preditivo negativo
VPP	– Valor preditivo positivo

Lista de Tabelas

Tabela 1 - Características da amostra.....	24
Tabela 2 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto às variáveis e valores de p, nos grupos estudados	30
Tabela 3 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto à imunexpressão do <i>Hepatocyte nuclear factor 4-alpha</i> e valores de p, por grupos de pacientes.....	31
Tabela 4 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto à imunexpressão do receptor de estrogênio e valor de p, por grupos de pacientes	33
Tabela 5 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto a Imunexpressão do receptor de progesterona e valores de p, por grupos de pacientes	33
Tabela 6 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto a imunexpressão da <i>Gross cystic disease fluid protein-15</i> e valores de p, por grupos de pacientes.....	34
Tabela 7 - Distribuição dos valores percentuais de sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e acurácia dos <i>Hepatocyte nuclear factor 4-alpha</i> , receptor de estrogênio, receptor de progesterona, <i>Gross cystic disease fluid protein-15</i> e respectivos intervalos de confiança.....	35

Resumo

Bases da investigação: o câncer de mama é a neoplasia maligna mais incidente em todo o mundo e muitas dessas mulheres desenvolvem metástases distantes, mais frequentemente para os ossos, linfonodos, pulmão, cérebro e fígado. Metástases para o trato gastrointestinal são raras, mas quando presentes o estômago é um dos locais mais comuns. O diagnóstico diferencial entre a metástase gástrica de origem mamária e o adenocarcinoma gástrico primário é difícil, os achados radiológicos e endoscópicos são semelhantes e as características morfológicas muitas vezes não permitem o diagnóstico da origem da neoplasia, dificultando a conduta terapêutica adequada. **Objetivo:** a motivação e o objetivo desta investigação foram a busca da caracterização do perfil de expressão de marcadores moleculares no carcinoma mamário, na metástase gástrica e no segundo primário gástrico sincrônico ou metacrônico, de forma a identificar possíveis marcadores que facilitem o diagnóstico da metástase gástrica de origem mamária. **Métodos:** o desenho de pesquisa proposto foi de natureza retrospectiva e controlada, compondo-se três grupos de análise com 42 pacientes cada, em um total de 126 pacientes; o grupo Teste incluiu pacientes com carcinoma mamário e que desenvolveram adenocarcinoma gástrico primário (n=17) ou carcinoma mamário metastático no estômago (n=25), diagnosticados previamente ao tratamento; o grupo Controle I incluiu pacientes com diagnóstico de carcinoma mamário primário, sem outras lesões associadas e o grupo Controle II incluiu pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico primário, também sem outras lesões associadas. Os marcadores selecionados para análise incluíram: o receptor de estrogênio (RE), o receptor de progesterona (RP), a *gross cystic disease fluid protein-15* (GCDFP-15) e o *hepatocyte nuclear factor 4-alpha* (HNF4A), que foram analisados nas amostras do carcinoma em 126 blocos de parafina, nos grupos Teste e Controles I e II. Foram calculadas as sensibilidades, especificidades, acurácia, prevalência, valores preditivos, estimando-se no grupo Teste os intervalos de confiança dos valores obtidos. **Resultados:** o marcador tumoral RE apresentou imunoexpressão positiva em 12/25 pacientes (48,0%) com carcinoma mamário metastático no estômago, sensibilidade de 48,0%, especificidade de 100,0% e acurácia de 69,0%, com valor de $p<0,001$; o marcador tumoral RP apresentou imunoexpressão positiva em 6/25 pacientes (24,0%) com carcinoma mamário metastático no estômago, sensibilidade de 24,0%, especificidade de 100,0% e acurácia de 54,8%, com valor de $p<0,001$; o marcador GCDFP-15 apresentou imunoexpressão positiva em 9/25 pacientes (36,0%) com carcinoma mamário metastático no estômago, sensibilidade de 36,0%, especificidade de 100,0% e acurácia de 61,9%, com valor de $p<0,001$; o marcador tumoral HNF4A apresentou imunoexpressão positiva em 17/17 pacientes (100,0%) com adenocarcinoma gástrico primário, e positivo em 1 paciente com carcinoma mamário metastático no estômago, sensibilidade de 100,0%, alta especificidade de 96,0% e acurácia de 97,6%, com valor de $p<0,001$. **Conclusão:** com base nos resultados obtidos nesta investigação podemos concluir que os marcadores HNF4A, RE, RP e GCDFP-15 são efetivos no diagnóstico diferencial entre câncer gástrico primário e metástase gástrica de origem mamária. O marcador HNF4A, em particular, pode ser considerado como altamente significativo para a exclusão de carcinoma mamário metastático no estômago, e que pode conferir desta forma alto poder de confiabilidade na distinção destas lesões.

Palavras-chave: HNF4A. Imuno-histoquímica. Biomarcador. Câncer gástrico. Metástase gástrica. Neoplasia mamária.

Abstract

Research bases: Breast cancer is the most frequent malignancy in the world, and many of these women develop distant metastases, most often to the bones, lymph nodes, lung, brain and liver. Metastases to the gastrointestinal tract are rare, but when present the stomach is the most common site. The differential diagnosis between gastric metastasis of mammary origin and primary gastric adenocarcinoma is difficult, and the radiological and endoscopic findings are similar and the morphological characteristics often do not allow the diagnosis of the cancer origin, hindering thus the proper treatment. **Objective:** The motivation and the goal of this research were to search the characterization of the molecular expression profile of markers in the primary site of breast carcinoma in gastric metastasis site and the second synchronous gastric primary or metachronous, in order to identify possible markers that facilitate the diagnosis of gastric metastases of mammary origin. **Methods:** The proposed research design was retrospective and controlled nature, making up three focus groups with 42 patients each, for a total of 126 patients; The Test group included patients with breast cancer who developed primary gastric adenocarcinoma (n=17) and metastatic mammary carcinoma in the stomach (n=25) diagnosed prior to treatment; the Control group I included patients diagnosed with primary breast carcinoma, without other associated lesions and the Control group II included patients with primary gastric adenocarcinoma, also without other associated lesions. The markers selected for analysis were: estrogen receptor (ER), progesterone receptor (PR), gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15) and hepatocyte nuclear factor 4-alpha (HNF4A), which were examined in tumor samples in 126 paraffin blocks, the Test and Controls groups I and II. The sensitivities, specific, accurate, prevalence, predictive values were calculated, estimating the test group the confidence intervals of values. **Results:** The tumor marker ER showed positive immunoreactivity in 12/25 patients (48.0%) with metastatic breast cancer in the stomach, sensitivity 48.0%, specificity of 100.0% and accuracy of 69.0%, with $p < 0.001$; tumor marker PR showed positive immunoreactivity in 6/25 patients (24.0%) with metastatic breast cancer in the stomach, 24.0% sensitivity, specificity 100.0% and accuracy of 54.8%, with $p < 0.001$; the GCDFP-15 marker showed positive immunoreactivity in 9/25 patients (36.0%) with metastatic breast cancer in the stomach, sensitivity 36.0%, specificity of 100.0% and accuracy of 61.9%, with $p < 0.001$; tumor marker HNF4A showed positive immunoreactivity in 17/17 patients (100.0%) with primary gastric adenocarcinoma and negative in 1 patient with metastatic breast cancer in the stomach, 100.0% sensitivity, high specificity of 96.0% and accuracy of 97.6% with p value < 0.001 . **Conclusion:** Based on the results obtained in this research we can conclude that HNF4A, ER, PR and GCDFP-15 markers are effective in the differential diagnosis of primary gastric cancer and gastric metastasis of mammary origin. The marker HNF4A, in particular, can be regarded as highly significant to the exclusion of metastatic mammary carcinoma in the stomach, and thus can confer high power reliability in distinguishing these lesions.

Keywords: HNF4A. Immunohistochemistry biomarker. Gastric cancer. Gastric câncer. Breast metastases.

1 INTRODUÇÃO

O câncer de mama representa nos países ocidentais uma das principais causas de morte em mulheres, e o carcinoma ductal infiltrante (CDI) é o tipo histológico mais comum.⁽¹⁾ Menos frequente, o carcinoma lobular infiltrante (CLI), que acomete os lóbulos do tecido mamário, corresponde a 10,0% dos casos de câncer de mama, apresentam um fenótipo menos agressivo quando comparado ao ductal, e em sua maioria expressam o receptor de estrógeno (RE), o receptor de progesterona (RP) e tem baixa expressão do *human epidermal growth factor receptor-type 2* (HER2).⁽²⁻⁴⁾ O padrão de disseminação hematogênica desses dois tipos histológicos também parece ser diferente, sendo mais frequente a ocorrência de metástases para o trato gastrointestinal (TGI) no CLI.⁽⁵⁻¹⁵⁾

Programas de rastreamento do câncer de mama em todo o mundo, que permitem a detecção precoce e novos regimes terapêuticos, têm aumentado a sobrevida global e muitas pacientes acabam desenvolvendo metástases à distância, sendo mais frequente o comprometimento de ossos, linfonodos, pulmão, cérebro e fígado.⁽¹⁶⁾

Metástases para o TGI são raras, mas quando presentes, o estômago é um dos locais mais comum.⁽¹⁷⁻²⁰⁾ A incidência de metástases gástricas varia de 0,3% em série retrospectiva e de 8,0% a 18,0% em séries de autópsias, e o câncer de mama é o segundo carcinoma primário que mais frequentemente apresenta metástase para o TGI.^(5,10,21,22) Apesar do CDI representar 80,0% dos carcinomas mamários, a maioria dos estudos concorda que o CLI é o tipo histológico mais envolvido na presença de metástases gástricas.⁽⁵⁻¹⁴⁾ A diferenciação entre adenocarcinoma gástrico primário e metástase gástrica de origem mamária é frequentemente difícil.^(11,12,23,24) Os achados radiológicos, endoscópicos e histopatológicos são inespecíficos.^(25,26) A apresentação clínica da metástase gástrica de origem mamária é semelhante a do adenocarcinoma gástrico primário, na maioria das vezes caracterizada macroscopicamente por linite plástica, que resulta da infiltração intramural difusa do carcinoma.^(8,27-30) A morfologia do CLI da mama, com células lineares, dissociadas, em fila indiana e em anel de sinete, e do CDI pouco diferenciado também pode lembrar o adenocarcinoma gástrico primário difuso com células em anel de sinete e indiferenciado.⁽³¹⁻³⁵⁾ Além disso, a metástase gástrica pode ser a primeira manifestação do câncer de mama.^(5,23,28,36-38)

O diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma gástrico primário e metastático de origem mamária é essencial, principalmente porque pacientes com câncer de mama e metástase gástrica e pacientes com dois carcinomas primários, de origem mamária e gástrica, tem prognósticos e tratamentos diferentes. O tratamento do câncer gástrico primário é cirúrgico e do câncer gástrico metastático de origem mamária é sistêmico e devido as novas estratégias terapêuticas resultam na maior sobrevida entre as pacientes com câncer de mama metastático.^(37,38)

Avanços no conhecimento da Biologia Molecular tem proporcionado melhor entendimento dos mecanismos fundamentais que regulam a proliferação e diferenciação celulares, bem como o desenvolvimento de metástases tumorais.⁽³⁹⁻⁴³⁾ Os marcadores tumorais identificados através da imuno-histoquímica (IHQ), são substâncias presentes no carcinoma, no sangue ou em outros líquidos biológicos, produzidos primariamente pelo carcinoma ou secundariamente pelo paciente, em resposta à presença do carcinoma. Esses marcadores são utilizados para diferenciar tecidos normais dos tecidos neoplásicos, para identificar a origem de um tumor metastático, como fatores prognósticos e, mais recentemente, como fatores preditivos de resposta ao tratamento.⁽⁴⁴⁻⁴⁸⁾

Os marcadores IHQ específicos de carcinoma mamário mais utilizados são o RE, RP, *gross cystic disease fluid protein-15* (GCDFP-15), e *mammaglobin* (MAM), entretanto apresentam sensibilidade variável e muito baixa nos tumores triplo negativos.⁽⁴⁹⁾ O mesmo ocorre com os marcadores específicos de carcinoma gástrico, como o *caudal type homeobox 2* (CDX2), que apesar de específico apresenta sensibilidade baixa.^(50,51) As citoqueratinas e *mucin* (MUC) também contribuem pouco para o diagnóstico diferencial entre metástase gástrica de origem mamária e adenocarcinoma gástrico primário.^(50,51)

O *hepatocyte nuclear factor 4-alpha* (HNF4A), membro da superfamília de marcadores nucleares, que é expresso no carcinoma gástrico e não apresenta expressão no carcinoma mamário pode ser fundamental para diagnóstico diferencial entre os dois tumores gástricos, primário ou de origem mamária.^(23,24) Considerando-se que a diferenciação entre a metástase gástrica de origem mamária e o adenocarcinoma gástrico primário é difícil, devido a achados clínicos e de imagens inespecíficos, que o painel de marcadores IHQ atualmente utilizado com marcadores específicos de carcinoma mamário e gástrico, apresenta sensibilidade

variável e não permite a realização do diagnóstico em todos os casos, e que estudos recentes referiram alta especificidade diagnóstica do marcador HNF4A na diferenciação dos carcinomas mamário e gástrico, iniciamos este estudo que pretende caracterizar através de um painel de marcadores o perfil molecular IHQ da metástase gástrica de origem mamária e do adenocarcinoma gástrico primário.^(23,24) Essa caracterização diagnóstica diferencial permitiria grande avanço na atenção aos pacientes tanto do ponto de vista de estratégia terapêutica como de prognóstico.

1.1 OBJETIVO

Caracterizar através de um painel de marcadores o perfil molecular imuno-histoquímica da metástase gástrica de origem mamária.

1.2 HIPÓTESE

A metástase gástrica de origem mamária apresenta perfil molecular imuno-histoquímica específico, o que pode auxiliar no seu diagnóstico diferencial com o adenocarcinoma gástrico primário.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer de mama comumente apresenta metástases para os ossos, fígado, sistema nervoso central e pele. Metástases para o TGI são menos frequentes e o tipo histológico mais frequentemente envolvido é o CLI.^(5,6,11,21)

2.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS DA METÁSTASE GÁSTRICA DE ORIGEM MAMÁRIA

A primeira grande série de autópsia que identificou 52 casos de metástases gastrointestinais em pacientes com câncer de mama foi publicada em 1968 por Asch et al., e 25,0% dos casos eram representadas por metástases gástricas.⁽⁵²⁾ Em 1996, Taal et al. publicaram estudo com 1.010 autópsias de pacientes com diagnóstico de câncer, e metástases gástricas estavam presentes em 1,7% dos casos.⁽⁵³⁾ Os autores concluíram que o melanoma, carcinoma mamário e carcinoma de pulmão são os carcinomas primários que mais frequentemente apresentam metástase para o estômago.

Em 2000, foi publicado o estudo de Taal, Peterse e Boot, com características endoscópicas e o tratamento na maior série retrospectiva com 51 pacientes com metástase gástrica de carcinoma mamário, encontrou incidência de 0,3% entre pacientes com carcinoma mamário.⁽⁵⁾ Os autores concluíram que metástases gástricas são mais frequentes no CLI, que o principal aspecto macroscópico da endoscopia digestiva alta é linite plástica e que a quimioterapia e/ou hormonioterapia é o tratamento paliativo indicado.

Em 2005, foi publicado o estudo de McLemore et al., com 73 pacientes com metástases gastrointestinal de origem mamária e desses 28,0% eram de origem gástrica.⁽⁶⁾ Os autores concluíram que as metástases gastrointestinais ocorrem mais frequentemente em pacientes com CLI e que a intervenção cirúrgica não prolonga significativamente a sobrevida global, mas pode ser observada em um grupo seletivo de pacientes.

Em 2006, em um estudo das características clínicas e endoscópicas de 65 pacientes com metástase gástrica, sendo 21 de origem mamária, de Palma et al. observaram que os nódulos pequenos com ou sem ulceração central, lesões polipoides e úlceras foram as lesões macroscópicas mais comuns, concluindo que

a biópsia gástrica de qualquer lesão endoscópica é sempre necessária, independentemente da macroscopia da lesão em pacientes com diagnóstico de câncer mamário.⁽⁸⁾

Em 2009, Pectasides et al., com intenção de demonstrar a importância de se distinguir a metástase gástrica de origem mamária do adenocarcinoma gástrico primário na definição do tratamento adequado, publicaram estudo de baseado nas características clínicas, endoscópicas, radiológicas e histopatológicas de oito pacientes com metástase gástrica de origem mamária.⁽⁹⁾ O tipo histológico de câncer de mama primário mais frequente foi o CLI. Todas as amostras de biópsia foram RE, *cytokeratin 7* (CK-7) e GCDFP-15 positivas e *cytokeratin 20* (CK-20) negativas. Os autores concluíram que a metástase gástrica de origem mamária pode ser distinguida do câncer gástrico primário através da IHQ com esses marcadores e que o tratamento sistêmico do câncer de mama metastático é o tratamento preferido, e a intervenção cirúrgica deve ser reservada para palição ou pode ser indicada em casos de metástases única ressecável.

Em 2011, o estudo de Almubarak et al. foi publicado com as características clínico-patológicas de 35 pacientes com metástases gástricas de origem mamária em 40.000 pacientes com câncer de mama, no Instituto Curie em Paris, constatando incidência de 0,1%.⁽¹¹⁾ O diagnóstico foi confirmado pelo exame histopatológico da biópsia gástrica obtida através de endoscopia ou após ressecção cirúrgica utilizando-se como marcadores de IHQ o RE, HER2, e-caderina e as CK-7 CK-20; 34 (97,0%) dos 35 pacientes apresentavam CLI, e apenas um CDI. O estadiamento do câncer de mama na maioria dos casos foi T1 (26,0%) ou T2 (44,0%). Trinta amostras de mama foram analisadas para RE e 23 para HER2. Dezenove casos (82,0%) RE positivo e HER2 negativo, dois casos (9,0%) RE e HER2 negativos, um caso (4,5%) RE positivo e HER2 positivo e um caso (4,5%) RE negativo e HER2 positivo. No carcinoma gástrico os receptores hormonais (RHs) foram avaliados em 24 casos e CK-7 / CK-20 em 12 casos. O RE estava positivo em 19 casos (79,0%) e negativo em 5 (21,0%). Esses autores concluíram que o CLI é o tipo histológico que mais frequentemente apresentam metástase para o estômago e que a comparação morfológica entre o carcinoma primário e metastático deve ser realizada para diferenciar o carcinoma mamário metastático do adenocarcinoma gástrico primário.

No Quadro 1 apresentamos um resumo dos autores, periódicos, ano de publicação e respectivos tamanhos amostrais de metástases gástricas originadas de carcinoma mamário.

Quadro 1 - Distribuição de autores, periódicos, anos de publicação e tamanhos amostrais (n) de séries de casos de pacientes com metástases gástricas de origem mamária

Autor	Periódico	Ano	n	Marcadores
Asch et al. ⁽⁵²⁾	<i>Archives of Surgery</i>	1968	13	NA
Taal et al. ^(54,55)	<i>Gastrointestinal Endoscopy</i>	1992	27	NA
Taal et al. ⁽⁵⁾	<i>BMC Cancer</i>	2000	51	NA
Oda et al. ⁽³⁶⁾	<i>Endoscopy</i>	2001	12	NA
McLemore et al. ⁽⁶⁾	<i>Annals of Surgical Oncology</i>	2005	15	NA
De Palma et al. ⁽⁸⁾	<i>World Journal of Gastroenterology</i>	2006	21	NA
Pectasides et al. ⁽⁹⁾	<i>Anticancer Research</i>	2009	8	RE, GCDFP-15, CK-7, CK-20
Almubarak et al. ⁽¹¹⁾	<i>Digestive and Liver Disease</i>	2011	35	RE, RP, HER2
Koyama et al. ⁽²³⁾	<i>Human Pathology</i>	2011	21	HNF4A, RE, RP, GCDFP-15, MAM, MUC-5AC, MUC-6, CDX2
Van der Post et al. ⁽²⁴⁾	<i>Virchows Archiv: An International Journal of Pathology</i>	2014	6	HNF4A, RE, RP, GCDFP-15

Legenda: não avaliado (NA); receptor de estrogênio (RE); *gross cystic disease fluid protein-15* (GCDFP-15); *cytokeratin 7* (CK-7); *cytokeratin 20* (CK-20); receptor de progesterona (RP); *human epidermal growth factor receptor-type 2* (HER2); *hepatocyte nuclear factor 4-alpha* (HNF4A); *mammaglobin* (MAM); *mucin* (MUC); *caudal type homeobox 2* (CDX2).

2.2 IDENTIFICAÇÃO DA METÁSTASE GÁSTRICA DE ORIGEM MAMÁRIA ATRAVÉS DE MARCADORES IMUNO-HISTOQUÍMICOS

Nos últimos 10 anos, dois estudos realizados com a intenção de identificar marcadores IHQ para o diagnóstico diferencial entre metástase gástrica de origem mamária e o carcinoma gástrico primário, foram encontrados.

Van der Post et al., em 2014, com objetivo de avaliar a sensibilidade e especificidade do HNF4A nos carcinomas mamário e gástrico na diferenciação entre carcinomas primários e metastáticos, publicaram uma série de casos em amostras de tecidos de adenocarcinoma gástrico (n=107), carcinoma mamário (n=105), mucosa gástrica normal (n=25), tecido glandular mamário normal (n=10).⁽²⁴⁾ Foram incluídas amostras de tecido de casos diagnosticados como carcinoma mamário metastático para o estômago (n=6), carcinoma gástrico metastático para a mama (n=1) e de dois carcinomas primários, mamário e gástrico (n=13); foi considerando positivo qualquer expressão do HNF4A. Todos os 25 casos de tecido gástrico normal apresentaram forte expressão nuclear de HNF4A, em concordância com os resultados encontrados em estudo de Tanaka et al.⁽⁵⁶⁾ Noventa e quatro por cento (101/107) dos adenocarcinomas gástricos primários apresentaram expressão difusa do HNF4A. Menos de 10,0% (cinco casos) tiveram expressão fraca e uma completamente negativa. As 10 amostras de tecido mamário normal não apresentaram expressão do HNF4A que também foi negativa em todos os 105 carcinomas de mama.⁽²⁴⁾

Ainda no estudo van der Post et al., seis pacientes apresentaram CLI com metástase para o estômago, com base nos relatórios originais histológicos, IHQ e evolução clínica. Todos os carcinomas mamários metastáticos não expressaram o HNF4A e todos expressaram RE e GCDFP-15 no carcinoma mamário primário e na metástase, sendo que dos 13 pacientes apresentando dois carcinomas primários, na mama e no estômago, nove eram CDI da mama, enquanto os outros quatro eram CLI. Todos os carcinomas primários do estômago foram positivos para HNF4A, enquanto que os carcinomas primários de mama foram negativos para HNF4A. Nos carcinomas gástricos primários, não houve expressão de RE, RP e GCDFP-15. Nos carcinomas primários da mama, havia expressão de RE em 9/13, RP em 6/13 e GCDFP-15 em 11/13 dos casos.⁽²⁴⁾

Esses autores concluíram que o HNF4A é um marcador muito útil na diferenciação do carcinoma mamário primário e metastático no estômago, com uma sensibilidade de 99,0% e uma especificidade de 100,0%. Eles enfatizaram que a expressão de RE, RP e GCDFP-15 poderia ser útil, uma vez que nenhum dos carcinomas gástricos primários apresentou expressão destes marcadores. No entanto, uma vez que parte dos carcinomas mamários primários é negativo para RE, RP, e GCDFP-15, a ausência de marcação para estes anticorpos não exclui o carcinoma mamário.⁽²⁴⁾

Koyama et al., em 2011, publicaram estudo realizado em espécimes de biópsias endoscópicas de 21 pacientes com metástase gástrica de carcinoma mamário, diagnosticados através da história clínica, semelhança morfológica entre o carcinoma na mama e no estômago e utilizando um ou mais dos seguintes anticorpos: RE, RP, GCDFP-15, MAM, CK-20, MUC-5AC, MUC-6 e CDX2.⁽²³⁾ Os autores incluíram uma série consecutiva de 33 biópsias endoscópicas de adenocarcinomas gástricos pouco diferenciados em pacientes clinicamente sem evidência de carcinoma mamário. A expressão do HNF4A foi estudada em todos esses casos. Para determinar a especificidade e a sensibilidade de cada anticorpo, casos com qualquer coloração positiva foram considerados positivos pelos autores. O aspecto endoscópico de lesões gástricas foi de linite plástica em oito casos (38,0%), múltiplas erosões em seis casos (28,0%), carcinoma da submucosa com ulceração/erosão central em três casos (14,0%), carcinomas da submucosa solitário em dois casos (10,0%) e vários carcinomas da submucosa em dois casos (10,0%). O tipo histológico de câncer de mama primário mais frequente foi o CLI nos casos de carcinoma mamário metastático e no estômago todos apresentaram morfologia pouco diferenciada.⁽²³⁾

Ainda nesse estudo, na IHQ das 21 lesões gástricas de carcinoma mamário metastático e dos 12 carcinomas mamários primários disponíveis, o HNF4A foi consistentemente negativo. Em contraste, nos 33 carcinomas gástricos primários, o HNF4A estava difusamente positivo em 31 casos e focalmente positivo em dois casos. O HNF4A foi consistentemente expresso no epitélio gástrico não neoplásico, mas negativo nas células estromais em todos os casos que foram examinados conferindo sensibilidade e especificidade de 100% ao HNF4A. Nas metástases gástricas de carcinoma mamário o RE, RP, MAM e GCDFP-15 foram expressos em

16 (76,0%), 7 (33,0%), 11 (52,0%), e 13 (62,0%) casos, respectivamente. Um caso foi negativo para todos esses anticorpos. Nenhum dos carcinomas gástrico primário expressou qualquer um destes quatro anticorpos. As expressões de RE, RP, MAM e GCDFP-15 estavam completamente ausentes na mucosa gástrica não neoplásica e foram 100,0% específicas para carcinomas mamários metastáticos, com sensibilidade variando de 33,0% a 76,0. Na IHQ todos os carcinomas gástricos primários, mas nenhum dos carcinomas mamários metastáticos foi positivo para HNF4A, com expressão difusa e forte, o que é uma grande vantagem para a sua utilização no diagnóstico de amostras de biópsia, onde apenas uma quantidade limitada de tecido está disponível.⁽²³⁾

Esses autores concluíram que o HNF4A foi capaz de distinguir sozinho todos os carcinomas gástricos primários e carcinoma mamário metastático, sugerindo que o HNF4A pode ser um marcador muito útil para a exclusão de carcinomas da mama metastáticos no diagnóstico de amostras de biópsias gástricas.⁽²³⁾

2.2.1 *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha*

O marcador HNF4A é um membro da superfamília de receptores nucleares que desempenha papel importante na diferenciação morfológica e funcional dos hepatócitos. Descoberto no início dos anos 1990, o HNF4A tem sido amplamente associado à regulação transcricional de genes de hepatócitos especificamente envolvidos no metabolismo lipídico, metabolismo da glicose, na diferenciação e na morfogênese.^(57,58)

A IHQ demonstra expressão do HNF4A nas células epiteliais dos tecidos endodérmicos, incluindo o estômago, intestino, fígado e pâncreas, e não na maioria dos outros órgãos, incluindo a glândula mamária e o ovário. Estudos demonstram que o carcinoma que se origina de células epiteliais são HNF4A positivos e mantêm a expressão, sugerindo que o HNF4A pode ser útil na determinação da origem primária de carcinomas metastáticos.^(57,58)

Tanaka et al., em 2006, publicaram estudo da expressão tecidual e distribuição do promotor 1 (P1) e promotor 2 (P2) da proteína HNF4A utilizando anticorpos monoclonais em células de tecidos normais e neoplasias malignas no diagnóstico diferencial de carcinomas primários de origem desconhecida.⁽⁵⁶⁾ Embora

tenham examinado um número limitado de amostras de carcinomas metastáticos, a IHQ do HNF4A foi concordante em todas as amostras sem resultados falsos negativos ou falsos positivos. A IHQ do HNF4A no estômago apresentou sensibilidade e especificidade de 100,0% nos 14 casos de carcinoma gástrico primários sugerindo que HNF4A pode ser um marcador útil no diagnóstico diferencial entre o carcinoma primário e carcinoma metastático. A coloração intensa foi observada no núcleo dos hepatócitos e ductos biliares no fígado e dos túbulos proximais no rim, células epiteliais da mucosa do intestino delgado, do cólon e do estômago, e também nas células endócrinas e exócrinas do pâncreas e do ducto eferente do epidídimo. Não foi observada coloração no pulmão, tireoide, mama, ovário, próstata ou carcinomas do endométrio. Os autores concluíram que a avaliação IHQ do HNF4A pode ser uma ferramenta útil no diagnóstico diferencial do carcinoma primário ou metastático e que a alteração que ocorre na expressão dos promotores do HNF4A, pode ser um evento importante na transformação e patogênese do câncer.

Takano et al., em 2009, publicaram estudo das isoformas P1 e P2 do HNF4A na diferenciação celular do câncer gástrico precoce em 41 espécimes cirúrgicas e uma endoscópica de 39 pacientes com a neoplasia gástrica.⁽⁵⁹⁾ Para estudar a expressão de mRNA do HNF4A no tecido sem neoplasia, incluíram tecidos normais do esôfago, estômago, intestino, colón e fígado de seis pacientes submetidos a cirurgia. A expressão do HNF4A, MUC-1, MUC-2, MUC-5AC e CDX2 acima de 2,0% foi considerada positiva. A expressão da isoforma P2 foi observada em todas as células epiteliais da mucosa gástrica, enquanto P1 foi negativo. A positividade para P1 e P2 ocorreu em todas as células que compreendem a metaplasia intestinal, incluindo células caliciformes e células de Paneth. Concluíram que a expressão de P1 é um novo marcador de metaplasia intestinal e que a expressão negativa de P1 pode ser útil no tipo de diferenciação do carcinoma.

2.2.2 Receptores de estrogênio e de progesterona

O RE e o RP são fatores de transcrição nuclear, ativados por meio da ligação a seus hormônios, 17 beta estradiol e progesterona, respectivamente. Ambos desempenham importante papel no desenvolvimento normal da mama e do carcinoma mamário.

Em 1996, uma nova classe de RE foi identificada e chamada receptor de estrogênio beta (RE-B). O RE tradicional passou a ser chamado receptor de estrogênio alfa (RE-A). Os RE-A e RE-B demonstram sequência homóloga e ambos são constituídos por cinco domínios. Algumas isoformas RE são conhecidas incluindo 3 alfa e 5 beta. As ações dos estrógenos são mediadas através de proteínas do RE-A e RE-B, que são membros da superfamília de receptores nucleares. Esses dois subtipos de receptores de estrogênio, alfa e beta, são transcritos de dois genes diferentes, receptor de estrogênio 1 localizado no cromossoma 6 (6q25.1) e receptor de estrogênio 2 no cromossoma 14 (14q23.2), respectivamente, separados em dois locais cromossômicos diferentes, e partilham cerca de 96,0% de homologia entre os seus domínios de ligação ao ácido desoxirribonucleico.⁽⁶⁰⁾ O RE-B é expresso em muitos tecidos, incluindo sistema nervoso central, sistema cardiovascular, sistema imunológico, sistema urogenital, pulmão e TGI.^(61,62)

Em 2008, a American Society of Clinical Oncology e o College of American Pathologists convocaram um painel de patologistas para estabelecer as diretrizes dos testes para o RE e RP, que passaram a ser recomendadas para todos os casos de câncer de mama infiltrantes e recorrentes. Um teste reprodutível e acurado foi proposto, sendo recomendado que RE e RP sejam considerados positivos se houver pelo menos 1,0% dos núcleos de carcinomas positivos da amostra testada, na presença da reatividade esperada nos controles interno e externo.⁽⁶³⁾ Somente a partir de 2008, os estudos publicados apresentam essa padronização, podendo ter seus resultados analisados e comparados com a literatura atual.

2.2.3 Receptores de estrogênio e câncer de mama

O tecido mamário normal tem expressão mais elevada do RE-B que do RE-A, mas essa relação B/A sofre modificação durante a carcinogênese e no tecido tumoral a expressão do RE-B diminui e é menor que a do RE-A. Mais de 75,0% dos carcinomas mamários expressam RE-A, o que demonstra a importante participação desses subtipos de RE, na patogênese e progressão tumoral. Esses dois subtipos, A e B, tem fatores de transcrição distintos e função antagonista entre eles. Agindo como

fator de supressão tumoral, o RE-B interfere no efeito do RE-A na proliferação celular, promoção e progressão tumoral. No câncer de mama o RE-A é o RE clássico e está associado a prognóstico mais favorável e resposta a terapia antiestrogênica.^(47,64)

Em 2014, em um estudo para identificar a participação dos subtipos de RE na carcinogênese, os pesquisadores concluíram que os níveis desses dois RE alteram significativamente durante a tumorigênese, a expressão do RE-B diminui e a do RE-A aumenta no tecido tumoral, refletindo a expressão aumentada do RE de promoção tumoral alfa e a expressão diminuída do RE de supressão tumoral beta.^(47,64) O RE-A está associado ao tamanho do carcinoma ($p=0,042$), TNM¹ ($p=0,037$) e ao RP positivo ($p=0,017$) e a expressão do RE-B não apresentou associação com fatores clínico-patológico. A expressão do RE-B esta relacionada à melhor prognóstico, maior intervalo livre de doença e melhor resposta a hormonioterapia com tamoxifeno.

Em 2016, foi publicado uma revisão sistemática com metanálise dos marcadores de carcinoma metastático de origem mamária, comparando o RE, GCDFP-15 e MAM.⁽⁶⁵⁾ No carcinoma mamário metastático 50,0%, os pesquisadores demonstram expressão do RE-A, comparado a 75,0% a 80,0% no carcinoma primário, podendo estar expresso no carcinoma de ovário e endométrio, carcinoma papilífero da tireóide e carcinomas de glândulas sudoríparas da pele, adenocarcinoma pulmonar (10,0% a 20,0%) e raramente no adenocarcinoma gastrointestinal. Em outro estudo anterior, em 2005, pesquisadores já haviam concluído que, dependendo da clínica e localização do carcinoma metastático, a adição de outros marcadores órgãos específicos pode ser necessário para aumentar a sensibilidade diagnóstica, resultado este que foi validado pelo estudo de 2016.⁽⁶⁶⁾

2.2.4 Receptores de estrogênio e câncer gástrico

Vários estudos epidemiológicos têm investigado a redução da incidência de câncer gástrico pelo efeito de proteção de hormônios sexuais femininos.⁽⁶¹⁾ No câncer de mama, endométrio e próstata, a presença de receptores de hormônios sexuais, como RE, RP e o receptor de androgênio, desempenham um papel

¹ T, para o tumor primário; N, para linfonodos; M para metástase.

importante na carcinogênese e progressão tumoral. Embora o estômago não seja conhecido como um órgão alvo direto dos hormônios sexuais, a presença de RE no câncer gástrico tem sido demonstrada.

Em 2005, foi publicado um estudo IHQ com RE, RP e e-caderina em 75 pacientes divididos em três grupos: grupo A, pacientes com diagnóstico de câncer gástrico primário submetidos a ressecção gástrica (n=28); grupo B, pacientes com uma história clínica de carcinoma mamário metastático com amostra da biópsia gástrica (n=28); e grupo C, pacientes com biópsias gástricas contendo adenocarcinoma (n=19).⁽⁶⁷⁾ Para RE e RP qualquer intensidade de coloração nuclear foi considerada positiva. Em todos os casos, a mucosa gástrica pré-existente normal foi negativa para RE e RP. Todos os carcinomas do grupo A foram negativos para a RE e RP. No grupo B, 19 casos expressaram RE e RP (14 RE+, 8 RP+). Os pesquisadores concluíram que esses pacientes do grupo B tinham metástases gástricas de carcinoma mamário. No grupo B, um dos pacientes apresentou RH negativos no estômago, embora o carcinoma mamário primário fosse RE positivo e foi considerado um segundo carcinoma primário. Os outros oito casos remanescentes eram RE e RP negativos no carcinoma mamário e por isso a coloração do RH não contribuiu para o diagnóstico diferencial entre carcinoma mamário metastático e câncer gástrico primário. No grupo C, um dos casos apresentou expressão do RE no carcinoma gástrico, e a mamografia subsequente demonstrou um carcinoma na mama. A biópsia revelou CLI, RE positivo.

Em 2014, pesquisadores publicaram estudo do nível de expressão dos RE-A e RE-B no câncer gástrico primário e o significado clínico e prognóstico desses receptores.⁽⁶²⁾ Os níveis de expressão dos RE foram avaliados por reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa em 35 e por coloração IHQ em 211 carcinomas gástricos ressecados cirurgicamente e nos tecidos normais correspondentes. Os níveis de expressão de mRNA do RE-A no carcinoma gástrico e tecidos normais não apresentaram diferença estatisticamente significativa. Os níveis do mRNA do RE-B em tecidos normais foram significativamente mais elevados do que os observados no carcinoma gástrico ($p=0,001$). Os níveis de expressão dos mRNA dos RE-A e RE-B, não apresentaram correlação significativa com os parâmetros clínico-patológicos. Quarenta e oito dos 211 (22,7%) carcinomas gástricos apresentaram nível de expressão positiva do RE-A apenas no citoplasma

sendo todas fracamente positivas, e 49,3% expressaram RE-B no núcleo da célula. Nesse mesmo estudo, a expressão RE-A positiva foi correlacionada com pior sobrevida global ($p=0,014$), assim como a ausência de expressão RE-B em pacientes com carcinoma gástrico ($p=0,001$). Sendo que, na análise multivariada, a expressão positiva do RE-A e a ausência de expressão do RE-B foram fatores prognósticos significativamente independentes da sobrevida global. Concluíram os pesquisadores, que tanto o câncer gástrico como o tecido gástrico normal podem expressar RE-A e RE-B.

Em 2012, em estudo do significado clínico do RE-B em 148 espécimes de câncer gástrico, a coloração IHQ para RE-A não apresentou positividade em qualquer uma das micromatrizes de tecido.⁽⁶¹⁾ A expressão do RE-B foi positiva em 67 (45,3%) dos 148 pacientes com câncer gástrico. A expressão do RE-B foi considerada positiva quando mais de 50,0% do citoplasma e/ou núcleo das células apresentaram coloração no carcinoma gástrico do tipo intestinal de Lauren, e não foi observada em nenhuma célula do tipo difuso em anel de sinete. A análise estatística mostrou que a RE-B mais frequentemente está expresso no grupo de idade mais avançada ($p=0,027$), em carcinomas pT1 e pT2 ($p<0,001$) e no tipo intestinal do Lauren de câncer gástrico ($p=0,025$). A invasão perineural foi inversamente correlacionada com a expressão do RE-B ($p=0,003$). Concluíram os pesquisadores, que câncer gástrico que expressa RE-B apresenta melhor prognóstico, garantindo a presença de RE, especialmente RE-B, no câncer gástrico, sugeriram que ele poderia ter um efeito protetor contra a invasão do câncer gástrico.

2.2.5 *Gross cystic disease fluid protein-15*

A GCDFP-15 é um monômero de 15 kDa encontrado no cromossomo 7 e expresso em células com diferenciação apócrina.⁽⁶⁸⁾ E é considerado um marcador específico para células com diferenciação apócrina apresentando-se expresso no epitélio apócrino metaplásico.^(44,68)

A expressão da GCDFP-15 no carcinoma mamário, em estudos publicados na literatura, apresenta variações: 74,0%⁽⁶⁹⁾, 57,0%⁽⁷⁰⁾ e 25,0%⁽⁷¹⁾. Em um estudo empregando o anticorpo 23A3, mais específico, os pesquisadores encontraram sensibilidade de 11,0% no carcinoma da mama metastático.⁽⁷²⁾ Em outro estudo,

utilizando anticorpo monoclonal 23A3, em 49 carcinomas mamários, os pesquisadores encontraram sensibilidade de 69,0%.⁽⁷³⁾

Na prática clínica, a coloração positiva para GCDFP-15 em um carcinoma de origem desconhecida favorece o diagnóstico de carcinoma mamário, embora a coloração negativa não exclua a origem mamária.

Em 2010, foi publicado um estudo com 43 recidivas locais e 72 à distância do carcinoma mamário, oito metástases para a mama, oriundas de outros órgãos, e 30 metástases não mamárias, utilizando IHQ com mamaglobina e GCDFP-15.⁽⁷³⁾ A mamaglobina apresentou expressão em 55 (47,8%) e GCDFP-15 em 13 (11,3%) das recidivas locais e à distância do carcinoma mamário. A MAM estava expressa em uma percentagem mais elevada de células tumorais e com maior intensidade de coloração que a GCDFP-15, estatisticamente significativa ($p < 0,005$). Sendo que as metástases para a mama oriundas em outros órgãos e lesões metastáticas de origem extramamária foram uniformemente negativos tanto para a MAM como GCDFP-15. Desta forma, os pesquisadores concluíram que a MAM é superior a GCDFP-15 na detecção de um carcinoma de origem mamária, e pode ser incorporado em painéis de IHQ na avaliação de carcinomas primários de origem desconhecido.

Mais recentemente a GCDFP-15 tem sido estudado relacionado ao prognóstico do carcinoma mamário. Em estudo da expressão de GCDFP-15 e MAM em 833 pacientes com carcinoma mamário (778 neoplasia infiltrante e 55 *in situ*), a MAM (42,3%) apresentou maior expressão no carcinoma mamário (infiltrante e *in situ*) que a GCDFP-15 (31,6%), apenas 14,8% dos casos apresentaram expressão dos dois marcadores ($p = 0,071$), sendo que a sensibilidade de ambos os marcadores não foi elevada e quando combinados foi de 58,9%.⁽⁴⁴⁾ Comparando MAM e GCDFP-15, a MAM demonstrou uma sensibilidade global superior para a detecção de carcinoma mamário, enquanto GCDFP-15 foi associado a um perfil de biomarcadores de bom prognóstico. Os pesquisadores concluíram que a MAM pode ser mais adequada para detectar o carcinoma mamário com pior prognóstico que a GCDFP-15.

Em 2014, foi publicado estudo da expressão IHQ da GCDFP-15 em 602 espécimes de biópsia de carcinoma mamário correlacionando com tempo livre de doença, tempo de sobrevivência global e a resposta patológica completa para Quimioterapia neoadjuvante (QT Neo), sendo que a GCDFP-15 foi positivo em 239

carcinomas (39,7%) e foi relacionado com a positividade dos RHs e HER2, enquanto a maioria dos carcinomas triplo-negativo não expressou a GCDFP-15 ($p < 0,0001$).⁽⁴⁶⁾ Concluíram os pesquisadores, que a GCDFP-15 é expresso em todos os principais subtipos de carcinoma mamário e pode ser útil como um marcador de diagnóstico para a diferenciação mamária em carcinomas RHs positivos, ocorrendo redução na sensibilidade no subtipo triplo negativo, e está relacionado a fatores clínico-patológicas que indicam um melhor resultado para o paciente.

3 MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO

Este estudo do tipo teste diagnóstico de natureza retrospectiva e com análise controlada, foi executado no Instituto Nacional de Câncer (INCA), Hospital do Câncer III, Rio de Janeiro, subsidiado financeiramente pela Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro, por meio do Processo E-26/110.664/2012 (Anexo 1), desenvolvido e apresentado no formato tese de doutorado no Programa de Pós-Graduação em Ciência Cirúrgica Interdisciplinar da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Os dados clínicos e as amostras biológicas foram obtidos no Arquivo Médico e no Departamento de Patologia do INCA, Divisão de Patologia (DIPAT), respectivamente, e registrados em fichas de coletas de dados padronizadas e previamente estruturadas (Anexo 2). Desta forma, todas as lâminas foram revistas e reanalisadas.

O estudo foi analisado e aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa do INCA e da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, tendo sido registrado na Plataforma Brasil, com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética n. 12390213.3.0000.5274, em 19 de abril 2013 (Anexo 3).

3.2 ETAPAS DESENVOLVIDAS NA EXECUÇÃO DO PROJETO

3.2.1 Amostragem e coleta dos dados clínicos e histopatológicos

Os pacientes, todos do gênero feminino, foram identificados através dos dados disponíveis no Departamento de Patologia do INCA-DIPAT, sendo posteriormente confirmada a disponibilidade das amostras biológicas necessárias para o presente estudo (lâminas e blocos de parafina).

Todos os casos selecionados foram submetidos à revisão dos dados histopatológicos por patologista do DIPAT.

3.2.2 Amostra analisada

Foram incluídas no estudo 126 pacientes, selecionadas sequencialmente de acordo com a data de registro no DIPAT e atendendo aos critérios de inclusão. O período de atendimento destas pacientes, no INCA, foi de janeiro de 1997 a março de 2013, com seguimento até julho de 2014 (Anexo 4). As 126 pacientes foram então reunidas em três grupos de 42 pacientes cada, distribuídos e designados da seguinte forma:

- a) Grupo Teste: todos os pacientes com carcinoma mamário (n=42) e que desenvolveram adenocarcinoma gástrico primário (n=17) ou carcinoma mamário metastático no estômago (n=25), diagnosticados previamente ao tratamento;
- b) Grupo Controle I: pacientes com diagnóstico de carcinoma mamário primário (n=42), sem outras lesões associadas;
- c) Grupo Controle II: pacientes com diagnóstico de adenocarcinoma gástrico primário (n=42), sem outras lesões associadas.

O grupo Teste, foco central desta investigação, é constituído por pacientes portadoras de carcinoma mamário primário, ductal ou lobular, que se apresentaram com um segundo carcinoma primário, adenocarcinoma gástrico primário, ou que desenvolveram metástase gástrica de carcinoma mamário nas suas evoluções, com base em dados clínicos e histopatológicos considerados na época. O grupo Teste foi então dividido em dois subgrupos – subgrupo A, pacientes com metástase gástrica de carcinoma mamário (n=25), e subgrupo B, com dois carcinomas primários (n=17) – para efeito de interpretação diagnóstica da imunoexpressão dos marcadores.

Os grupos Controles I e II são constituídos por pacientes portadoras de carcinoma mamário primário, ductal ou lobular infiltrante, e adenocarcinoma gástrico primário não associado ao carcinoma mamário respectivamente, conforme critérios clínicos, endoscópicos e histopatológicos previamente padronizados.

3.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO NO ESTUDO

Foram considerados critérios de inclusão no estudo pacientes do gênero feminino, submetidas a tratamento no INCA, nos períodos de janeiro de 1997 a março de 2013, com diagnóstico histológico de carcinoma mamário ductal ou lobular infiltrante, carcinoma mamário metastático no estômago e adenocarcinoma primário gástrico, todos com dados clínicos e histopatológicos disponíveis (Figura 1). A exclusão de pacientes do estudo foi realizada quando da indisponibilidade ou insuficiência para análise da amostra biológica coletada.

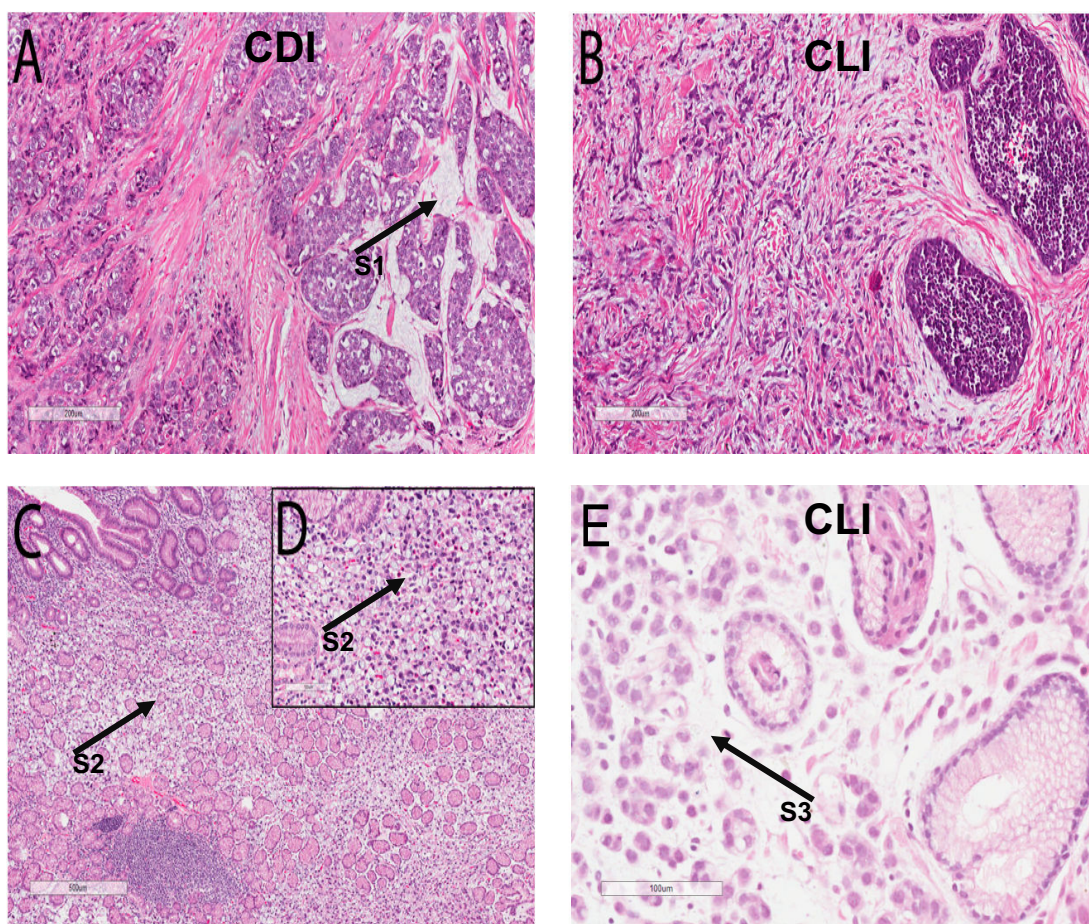


Figura 1 - Representação histopatológica dos grupos do estudo em coloração hematoxilina-eosina): (A) carcinoma ductal infiltrante com área de diferenciação de mucina (S1); (B) carcinoma lobular infiltrante, associado a carcinoma lobular *in situ*; (C) adenocarcinoma gástrico primário pouco diferenciado com células em anel de sinete (S2); (D) detalhes com ampliação de 20x (S2); (E) carcinoma lobular infiltrante da mama metastático para a mucosa gástrica (S3).

3.4 CARACTERÍSTICAS DA AMOSTRA ANALISADA

Foram consideradas como variáveis do estudo a idade, a localização do carcinoma primário, o grau de diferenciação celular, o estadiamento anatomopatológico, estabelecido no *AJCC Cancer Staging Manual* (2010), sétima edição, da American Joint Committee on Cancer (AJCC)/Union for International Cancer Control, a realização de tratamento neoadjuvante e se a amostra analisada foi coletada em material de biopsia ou do espécime operatório.^(74,75) Como desfecho primário da investigação foi considerada a expressão dos marcadores tumorais. Fichas padronizadas de coleta de dados foram estruturadas previamente.

A idade dos pacientes do gênero feminino variou de 27 a 93 anos, e a média foi de 60,5 anos, sendo 52,4% com idade superior a 60 anos.

Quanto à localização do carcinoma primário, 67 (53,2%) apresentavam câncer de mama primário (CDI, 60%; CLI, 40%) e 59 (46,8%) câncer gástrico primário, todos adenocarcinoma.

Em 60,3% os carcinomas eram grau III e em 39,7%, graus I e II. Nos carcinomas localizados no estômago houve predominância do grau III e nos carcinomas de mama graus I e II (Tabela 1).

Tabela 1 - Características da amostra

Característica	Descrição	n (%)
Gênero	Feminino	126 (100,0)
Idade	De 27 a 93 anos (média 60,5 anos)	-
	< 60 anos	66 (52,4)
	Até 60 anos	60 (47,6)
Localização primária	Mama	67 (53,2)
	Estômago	59 (46,8)
Tipo histológico	Adenocarcinoma gástrico primário	42 (33,3)
	Carcinoma mamário primário	42 (33,3)
	Metástase gástrica de carcinoma mamário	25 (19,9)
	Adenocarcinoma gástrico e carcinoma mamário primários	17 (13,5)
Grau histológico	I-II	50 (39,7)
	III	76 (60,3)
	I	19 (15,0)
Estadiamento	II	23 (18,3)
	III	40 (31,8)
	IV	43 (34,1)
	Desconhecido	1 (0,8)
Mortalidade	Vivos	33 (26,2)
	Óbitos	93 (73,8)
Seguimento (média)	De 1 a 186,4 meses (56,4 meses)	-

3.5 PROCEDIMENTOS REALIZADOS

3.5.1 Levantamento dos blocos e respectivos prontuários

Após a identificação das pacientes do estudo e levantados os seus respectivos prontuários médicos, lâminas hematoxilina-eosina de cada bloco de parafina de peças cirúrgicas ou amostras de biópsia foram separadas e analisadas pelo patologista, selecionando-se as com maior quantidade de tecido tumoral e com tecido normal presente como controle interno. Foram realizados 10 cortes

histológicos com 3 µm de espessura de cada bloco de parafina para confecção de lâminas silanizadas para análise IHQ dos marcadores.

3.5.2 Classificação histopatológica

Os tipos histológicos foram agrupados, conforme *WHO Classification of Tumours of the Breast* (2012), no carcinoma mamário como CDI e lobular infiltrante e no carcinoma gástrico, adenocarcinoma.⁽⁷⁶⁾

Para o grau de diferenciação celular do câncer gástrico primário foi utilizada a *WHO Classification of Tumors of The Digestive System* (2010), tipo bem diferenciado (grau I), predomínio de formações glandulares em mais de 95,0% da neoplasia; no tipo moderadamente diferenciado (grau II) fusão das glândulas apresentando áreas sólidas e estruturas glandulares em 50,0% a 95,0% da neoplasia; no tipo pouco diferenciado (grau III) apresenta estruturas das glândulas bem formadas em 0% a 49,0% e indiferenciado (grau IV) não apresenta estruturas glandulares.⁽⁷⁷⁾ Os adenocarcinomas do tipo mucinoso foram considerados como grau III por apresentar um pior prognóstico.

No câncer de mama primário a classificação do grau histológico combinado de Nottingham (Scarff-Bloom-Richardson, modificado por Elston-Ellis), que inclui o percentual de diferenciação tubular, avaliação do pleomorfismo nuclear e índice mitótico.⁽⁷⁸⁾ Considerou-se na análise a localização do carcinoma na mama ou no estômago e a origem primária ou metastática. A classificação TNM da AJCC descrita para carcinoma gástrico e carcinoma mamário.⁽⁷⁵⁾

3.5.3 Análise imuno-histoquímica

Os marcadores IHQ incluíram o RE, o RP, a GCDFP-15 e o HNF4A, que foram analisados nas amostras do carcinoma nos grupos Teste e Controles I e II, totalizando 126 blocos de parafina.

Identificada a concentração dos anticorpos com a menor diluição para coloração positiva e negativa nos controles externos de acordo com dados fornecidos pelo fabricante. Com os RE e RP foi utilizado como controle externo

positivo o tecido mamário normal. Para a GCDFP-15, tecido linfonodal e para o HNF4A utilizou-se o tecido hepático.

Para os RE e RP, na diluição 1:1600, clones 1D51 EgR alfa e 636 PgR da empresa Dako, respectivamente. Para o anticorpo HNF4A na diluição 1:100, clone H1:sc-374229 e GCDFP-15 na diluição 1:1000, clone 23A3, ambos do Laboratório Santa Cruz, em todos os 126 blocos de carcinoma na mama e estômago.

Realizada recuperação antigênica dos blocos de parafina, tamponados com citrato pH 6,0 e bloqueados com peroxidase por cinco minutos utilizando-se Novolink Polymer Detection Systems. Foi considerado positivo o marcador com expressão $\leq 5,0\%$.

3.5.4 Técnica de imuno-histoquímica

A técnica de IHQ foi realizada em dois dias. No primeiro foi realizada a desparafinização dos blocos, com três banhos de cinco minutos cada em xilol, seguidos de banhos em álcool 100%, 90%, 80% e 70% e água corrente por cinco minutos. A recuperação antigênica foi realizada utilizando-se panela à vapor (*steamer*) com tampões de citrato pH=6,0. As lâminas foram cicladas com caneta hidrofóbica da empresa DAKO e incubadas com tampão TBST² (TBS + 0,1% Tween® 20). Remoção do TBST, secagem do excesso e incubação com bloqueio de peroxidase por cinco minutos (Novolink Polymer Detection Systems). Realizados três banhos de cinco minutos cada com TBST seguidos de lavagem com água destilada e aplicação do anticorpo primário na diluição previamente estabelecida, incubado durante uma noite em refrigerador.

No segundo dia foi realizada a lavagem das lâminas com água destilada seguida de três banhos de cinco minutos cada, com TBST. Incubação do anticorpo (Novolink Polymer Detection Systems), por 30 minutos. Lavagem com água destilada seguida de três banhos de cinco minutos cada, com TBST. Incubação com o Polímero (Novolink Polymer Detection Systems), por 30 minutos. Lavagem com água destilada seguida de três banhos de cinco minutos cada, com TBST. Remoção do

² Mistura de solução salina tamponada com Tris (TBS) e Polissorbato 20 (também conhecido como Tween 20).

TBST, secagem do excesso e incubação com DAB³: 50 µl cromógeno para 1 ml substrato, por três minutos. A reação foi paralisada com água destilada, lavagem por três minutos em água corrente, secagem do excesso e incubação com hematoxilina-eosina por 25 segundos; lavagem em água corrente por três minutos seguidos de banhos de álcool 70%, 80%, 90%, 100% e xilol; montagem das lâminas com bálsamo.

As lâminas utilizadas foram previamente tratadas com silano 3-Aminopropyl triethoxysilane (Sigma-Aldrich) 4% em álcool etílico P.A. Os cortes dos tecidos que foram realizados no micrótomo com espessura de três micra.

3.5.5 Critérios adotados para mensuração da expressão imuno-histoquímica

A investigação histopatológica, relativas às leituras das lâminas e adoção de *score* de mensuração da expressão IHQ, foi feita pelo patologista e pelo pesquisador responsável. Para o RE, RP e HNF4A foi considerada a expressão nuclear e para a GCDFP-15 a expressão citoplasmática. A expressão da coloração foi quantificada conforme os seguintes critérios: expressão negativa quando todas as células não apresentavam nenhum sinal do corante; nos casos em que de 5,0% a 10,0% de células tumorais apresentavam coloração, a expressão foi considerada como focal, acima de 10,0% a 50,0% como expressão limitada e, finalmente, quando acima de 50,0%, como expressão difusa. Para os cálculos dos valores percentuais de sensibilidade e especificidade, os casos com até 5,0% da expressão IHQ foram considerados como negativos e aquele acima de 5,0% de imunoexpressão foram considerados como positivos. ^(23,24,63,79-82)

Analizamos os carcinomas dos três grupos do estudo utilizando um dos quatro marcadores (RP, RE, HNF4A e GCDFP-15).

Os grupos controles foram analisados separadamente e posteriormente o carcinoma localizado no estômago do grupo Teste foi classificado e teve sua acurácia, sensibilidade e especificidade calculadas. Apenas o carcinoma localizado no estômago deste grupo foi utilizado para a classificação, uma vez que este era o carcinoma para o qual existia incerteza diagnóstica na classificação.

³ Dimethylaminobenzaldehyde.

Para avaliação serão considerados os valores de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) para carcinomas gástricos e de mama, assim como a acurácia total de cada marcador, quando aplicados ao grupo Teste.

3.5.6 Banco de dados amostrais e análise estatística

Para este estudo foi montado um banco de dados com as seguintes variáveis: identificação do paciente; prontuário (número de identificação do prontuário médico da paciente no INCA); gênero (neste caso, todos femininos); idade (em anos); localização do carcinoma (mama ou estômago); origem do carcinoma (primário ou metastático – diagnóstico do patologista); tipo histológico; grau histológico; estágio TNM; QT Neo; seguimento; óbito (sim ou não); RE (resultado do teste: positivo ou negativo); RP (resultado do teste: positivo ou negativo); HNF4A (resultado do teste: positivo ou negativo); GCDFP-15 (resultado do teste: positivo ou negativo) e o grupo ao qual pertence (grupo I – teste; grupo II – Controle mama; grupo III – Controle estômago).

Para a análise estatística dos dados obtidos, foram utilizados os programas SPSS Statistics, Excel e R Project, tendo sido calculadas as estatísticas descritivas das variáveis e construção das tabelas com características diagnósticas dos testes HNF4A, RE, RP e GCDFP-15. Foram calculadas as sensibilidades, especificidades, acurácia, prevalência, valores preditivos e o teste exato de Fisher para verificar a associação entre os resultados do teste e o tipo de marcador utilizado (para cada grupo) e a associação entre o resultado do teste e o grupo (para cada marcador). O teste exato de Fisher tem como hipótese nula a não existência de associação. Foram calculados os intervalos de confiança de todos os resultados de imunoexpressão dos marcadores, para se estimar a magnitude da variação dos valores e consequente confiabilidade dos resultados obtidos.

4 RESULTADOS

4.1 DADOS AMOSTRAIS E RESULTADOS GERAIS

Na Tabela 2 podem ser observadas a distribuição dos números e os respectivos percentuais de pacientes incluídos na amostra, nos diferentes grupos, correlacionando-os com as variáveis estudadas.

Tabela 2 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto às variáveis e valores de p, nos grupos estudados

Variáveis	Grupo (n, %)			p
	Teste	Controle I	Controle II	
Idade (anos) (média±DP)	59,19±11,97	57,64±15,70	60,57±11,52	0,597
Localização do tumor:				
Mama	0 (0)	42 (100,0)	0 (0)	0,000
Estômago	42 (100,0)	0 (0)	42 (100,0)	
Origem do tumor:				
Primário	17 (40,5)	42 (100,0)	42 (100,0)	0,000
Metastático	25 (59,5)	0 (0)	0 (0)	
Tipo histológico:				
Adenocarcinoma	42 (100,0)	0 (0)	42 (100,0)	0,000
CDI	0 (0)	27 (64,3)	0 (0)	
CLI	0 (0)	15 (35,7)	0 (0)	
Grau histológico:				
2	13 (31,0)	29 (69,0)	8 (19,0)	0,000
3	29 (69,0)	13 (31,0)	34 (81,0)	
Estágio TNM:				
Desconhecido	1 (2,4)	0 (0)	0 (0)	0,000
I	3 (7,1)	7 (16,7)	9 (21,4)	
II	5 (11,9)	14 (33,3)	4 (9,5)	
III	1 (2,4)	21 (50,0)	18 (42,9)	
IV	32 (76,2)	0 (0)	11 (26,2)	
QT Neo:				
Sim	0 (0)	9 (21,4)	0 (0)	0,000
Não	42 (100,0)	33 (78,6)	42 (100,0)	
Mortalidade:				
Óbitos	35 (83,3)	24 (57,1)	34 (81,0)	0,010
Vivos	7 (16,7)	18 (42,9)	8 (19,0)	
Seguimento (meses)	24,27±28,78	104,23±59,79	40,37±44,79	0,000

Legenda: desvio padrão (DP); carcinoma ductal infiltrante (CDI); carcinoma lobular infiltrante (CLI); T, tumor primário, N, linfonodos, M metástase (TNM); quimioterapia neoadjuvante (QT Neo). No grupo teste apenas o tumor localizado no estômago foi considerado para classificação.

Pode-se observar que a distribuição dos pacientes nos diferentes grupos de análise foi significativamente diferente com relação às variáveis grau de estadiamento, tempo de seguimento e mortalidade. Quanto à idade essa distribuição nos diferentes grupos se mostrou homogênea.

4.2 RESULTADOS DAS IMUNOEXPRESSÕES DOS MARCADORES SELECIONADOS

Os resultados da expressão de cada marcador – HNF4A, RE, RP e GCDFP-15 – em cada grupo de pacientes, são apresentados nas Tabelas 3 a 6, observando que o grupo Teste foi subdividido em subgrupo A e subgrupo B, conforme critérios diagnósticos prévios.

4.2.1 *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha*

Tabela 3 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto à imunoexpressão do *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha* e valores de p, por grupos de pacientes

Resultado	Teste (n, %)		Controle (n, %)		Total (n, %)	p
	Subgrupo A	Subgrupo B	Grupo I	Grupo II		
Negativo	24 (96,0)	0 (0)	42 (100,0)	0 (0)	66 (52,4)	<0,001
Positivo	1 (4,0)	17 (100,0)	0 (0)	42 (100,0)	60 (47,6)	
Total	25 (100,0)	17 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	126 (100,0)	-

Legenda: subgrupo A (metástase gástrica de origem mamária); subgrupo B (adenocarcinoma gástrico primário), grupo I (carcinoma mamário primário); grupo II (adenocarcinoma gástrico primário).

Em 17 pacientes diagnosticados anteriormente como adenocarcinoma gástrico primário (grupo Teste, subgrupo B) observou-se imunoexpressão positiva do marcador HNF4A, tendo sido considerados, portanto, como primários do estômago (Figura 2A). Dos 25 pacientes do grupo Teste, subgrupo A, ou seja, diagnosticados como metástase gástrica de origem mamária, 1 apresentou imunoexpressão do HNF4A e 24 não apresentaram imunoexpressão do HNF4A metástase (Figura 2B).

O HNF4A apresentou positividade de expressão em todos os pacientes diagnosticados como portadores de adenocarcinoma gástrico primário (grupo Controle II) e se mostrou negativo em todos os casos de carcinoma mamário primário (grupo Controle I). O valor estimado de p foi $<0,001$, correspondendo à diferença significativa de expressão do HNF4A entre os grupos testes e seus respectivos controles.

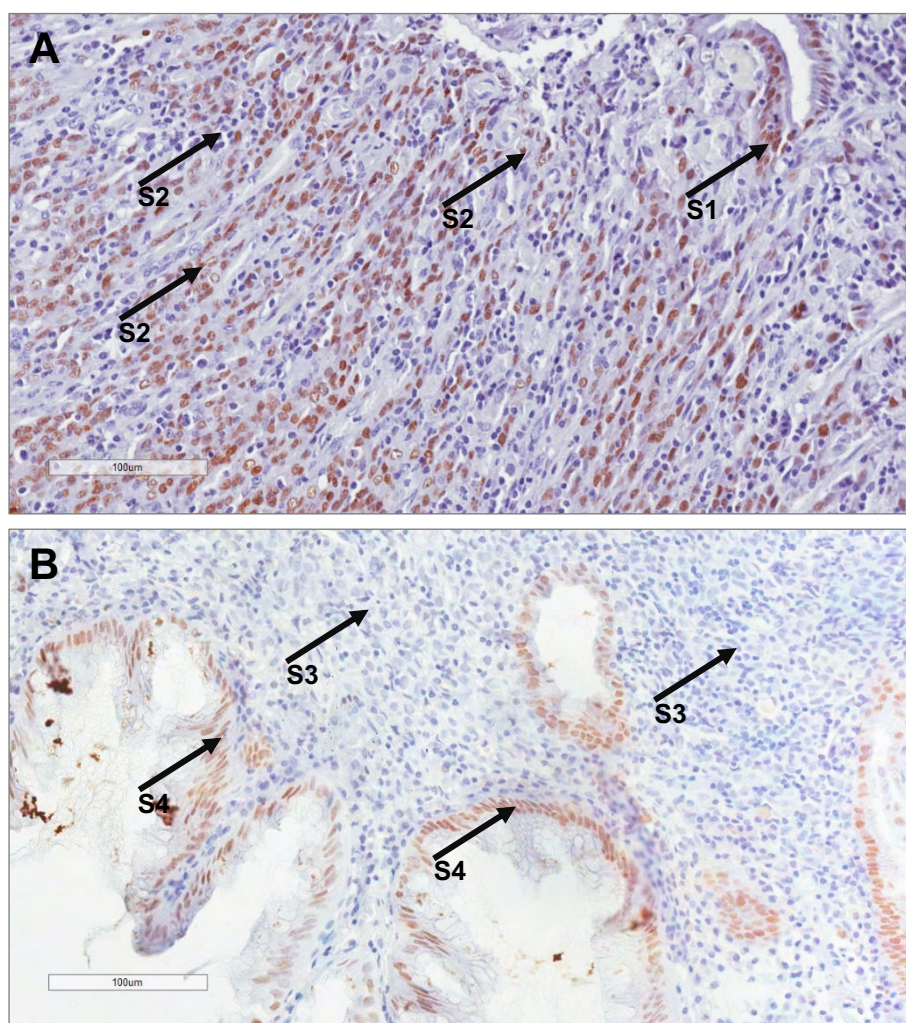


Figura 2 - *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha* coloração por imunoperoxidase de tecido gástrico: A) marcação nuclear em glândula não neoplásica à direita (S1) (controle interno) e marcação nuclear nas células do carcinoma gástrico pouco diferenciado com células em “anel de sinete” (S2) (restante); B) mostra marcação nuclear nas células da mucosa gástrica (S3) e ausência de marcação nuclear nas células do carcinoma lobular infiltrante da mama metastático para a mucosa gástrica (S4).

4.2.2 Receptor de estrogênio

Tabela 4 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto à imunoexpressão do receptor de estrogênio e valor de p, por grupos de pacientes

Resultado	Teste (n, %)		Controle (n, %)		Total (n, %)	p
	Subgrupo A	Subgrupo B	Grupo I	Grupo II		
Negativo	13 (52,0)	17 (100,0)	7 (16,4)	42 (100,0)	79 (62,7)	<0,001
Positivo	12 (48,0)	0 (0)	35 (83,3)	0 (0)	47 (37,3)	
Total	25 (100,0)	17 (100,0)	42 (100,0)	42 (100,0)	126 (100,0)	-

Legenda: subgrupo A (metástase gástrica de origem mamária); subgrupo B (adenocarcinoma gástrico primário), grupo I (carcinoma mamário primário); grupo II (adenocarcinoma gástrico primário).

Em 25 pacientes do grupo Teste, subgrupo A, o marcador RE apresentou-se imunoexpresso em 12 (48,0%) e em 42 pacientes do grupo Controle I esta imunoexpressão foi observada em 35 (83,0%) (Figura 3A). Nenhum carcinoma do grupo Controle II e do grupo Teste, subgrupo B, apresentou expressão do RE. O valor estimado de p foi <0,001, correspondendo à diferença significativa de expressão do RE entre os grupos testes e seus respectivos controles.

4.2.3 Receptor de progesterona

Tabela 5 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto a Imunoexpressão do receptor de progesterona e valores de p, por grupos de pacientes

Resultado	Teste (n, %)		Controle (n, %)		Total (n, %)	p
	Subgrupo A	Subgrupo B	Grupo I	Grupo II		
Negativo	19 (76,0)	17 (100,0)	11 (26,2)	42 (100,0)	89 (70,6)	<0,001
Positivo	6 (24,0)	0 (0)	31 (73,8)	0 (0)	37 (29,4)	
Total	25 (19,8)	17 (13,5)	42 (33,33)	42 (33,33)	126 (100,0)	-

Legenda: subgrupo A (metástase gástrica de origem mamária); subgrupo B (adenocarcinoma gástrico primário), grupo I (carcinoma mamário primário); grupo II (adenocarcinoma gástrico primário).

Em 25 pacientes do grupo Teste, subgrupo A, o marcador RP apresentou-se imunoexpresso em 6 (24,0%) e em 42 pacientes do grupo Controle I esta imunoexpressão foi observada em 31 (73,8%) pacientes (Figura 3B). Nenhum carcinoma do grupo Controle II e do grupo Teste, subgrupo B, apresentou expressão do RP. O valor estimado de p foi $<0,001$, correspondendo à diferença significativa de expressão do RP entre os grupos testes e seus respectivos controles.

4.2.4 *Gross cystic disease fluid protein-15*

Tabela 6 - Distribuição dos números de pacientes e respectivos percentuais, quanto a imunoexpressão da *Gross cystic disease fluid protein-15* e valores de p, por grupos de pacientes

Resultado	Teste (n, %)		Controle (n, %)		Total (n, %)	p
	Subgrupo A	Subgrupo B	Grupo I	Grupo II		
Negativo	16 (64,0)	17 (100,0)	27 (64,3)	42 (100,0)	102 (81,0)	$<0,001$
Positivo	9 (36,0)	0 (0)	15 (35,7)	0 (0)	24 (19,0)	
Total	25 (19,8)	17 (13,5)	42 (33,33)	42 (33,33)	126 (100,0)	-

Legenda: subgrupo A (metástase gástrica de origem mamária); subgrupo B (adenocarcinoma gástrico primário), grupo I (carcinoma mamário primário); grupo II (adenocarcinoma gástrico primário).

Em 25 pacientes do grupo Teste, subgrupo A, o marcador proteína do fluido da doença cística apresentou-se imunoexpresso em 9 (36,0%) e dos 42 pacientes do grupo Controle I esta imunoexpressão foi observada em 15 (35,7%) pacientes (Figura 3C e Figura 3D). Nenhum carcinoma do grupo Controle II e do grupo Teste, subgrupo B, apresentou expressão da GCDFP-15. O valor estimado de p foi $<0,001$, correspondendo à diferença significativa de expressão do GCDFP-15 entre os grupos testes e seus respectivos controles.

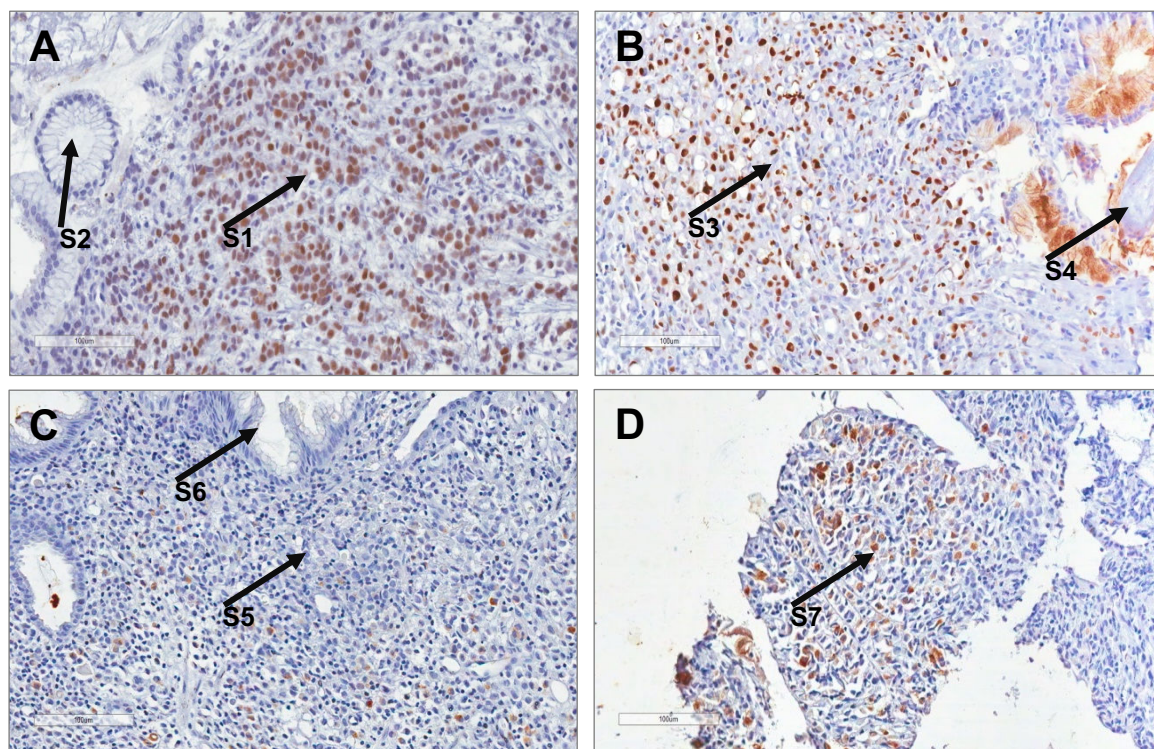


Figura 3 - Coloração por imunoperoxidase de tecido gástrico: (A) marcação nuclear do receptor de estrogênio nas células do carcinoma lobular infiltrante da mama metastático (S1) e ausência da coloração na mucosa gástrica normal (S2); (B) marcação nuclear do receptor de progesterona nas células do carcinoma lobular infiltrante da mama metastático (S3) e ausência de coloração na mucosa gástrica normal (S4); (C) marcação citoplasmática da *Gross cystic disease fluid protein-15* em células do carcinoma lobular infiltrante da mama metastático (S5) e ausência de coloração na mucosa gástrica normal (S6); (D) marcação citoplasmática da *Gross cystic disease fluid protein-15* em maior aumento 20x (S7).

Tabela 7 - Distribuição dos valores percentuais de sensibilidade, especificidade, valor preditivo negativo, valor preditivo positivo e acurácia dos *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha*, receptor de estrogênio, receptor de progesterona, *Gross cystic disease fluid protein-15* e respectivos intervalos de confiança

Marcadores	HNF4A	RE	RP	GCDFP-15
Sensibilidade	100,0% (0,805 – 1,000)	48,0% (0,270 – 0,687)	24,0% (0,094 – 0,451)	36,0% (0,180 – 0,575)
Especificidade	96,0% (0,797 – 0,999)	100,0% (0,805 – 1,000)	100,0% (0,805 – 1,000)	100,0% (0,805 – 1,000)
VPP	94,4% (0,727 – 0,999)	100,0% (0,735 – 1,000)	100,0% (0,541 – 1,000)	100,0% (0,664 – 1,000)
VPN	100,0% (0,858 – 1,000)	56,7% (0,374 – 0,745)	47,2% (0,304 – 0,645)	51,5% (0,335 – 0,692)
Acurácia	97,6% (0,874 – 0,999)	69,0% (0,529 – 0,824)	54,8% (0,387 – 0,702)	61,9% (0,456 – 0,764)

Legenda: *hepatocyte nuclear factor 4-alpha* (HNF4A); receptor de estrogênio (RE); receptor de progesterona (RP); *gross cystic disease fluid protein-15* (GCDFP-15); valor preditivo positivo (VPP); valor preditivo negativo (VPN).

4.3 INDICADORES DIAGNÓSTICOS DE CADA MARCADOR NO GRUPO TESTE COM OS INTERVALOS DE CONFIANÇA

A sensibilidade dos marcadores considerados isoladamente, ou seja, a proporção de indivíduos com a doença e que têm um teste positivo para a doença, é alta (100,0%) no HNF4A e baixa e média (24,0%, 36,0% e 48,0%) nos demais.

A especificidade dos marcadores, ou seja, a proporção de indivíduos sem a doença e que têm um teste negativo para a doença, é alta em todos os marcadores (96,0% a 100,0%). Estes níveis de especificidade, encontrados raramente, diagnosticarão indivíduos que não têm a doença, como doentes.

O VPP, ou seja, a probabilidade da doença em um indivíduo com teste positivo para aquela doença, de todos os marcadores analisados isoladamente pode ser considerado como alto (94,4% a 100,0%) e desta forma raramente o indivíduo não terá a doença quando apresentar um teste positivo.

O VPN, ou seja, a probabilidade de um indivíduo não ter a doença quando o teste para esta doença é negativo, do HNF4A é alto (100,0%), enquanto todos os outros marcadores apresentam isoladamente VPN baixo (47,2%, 51,5%, 56,7% e 58,6%).

Quando analisados sob o conceito de acurácia, ou seja, o conjunto de resultados, positivos e negativos, que podem ser considerados como corretos, observa-se uma elevação global de todos os marcadores, destacando-se a participação diagnóstica isolada do HNF4A.

O cálculo do intervalo de confiança para cada marcador permitiu avaliar a extensão de variação de cada resultado obtendo-se, desta forma, uma estimativa da precisão da medida em um nível admitido de 0,05.

4.4 RESUMO DOS RESULTADOS OBTIDOS NESTA INVESTIGAÇÃO

O marcador tumoral RE apresentou imunoexpressão considerada como positiva em 12 dos 25 pacientes (48,0%) com carcinoma mamário metastático no estômago, grau médio de sensibilidade (48,0%), alta especificidade (100,0%) e

acurácia de grau médio (69,0%). Seu nível de expressão quando comparado ao respectivo grupo controle, foi significativa ($p < 0,001$).

O marcador tumoral RP apresentou imunoexpressão considerada como positiva em seis dos 25 pacientes (24,0%) com carcinoma mamário metastático no estômago, grau baixo de sensibilidade (24,0%), alta especificidade (100,0%) e acurácia de grau médio (54,8%). Seu nível de expressão, quando comparado ao respectivo grupo controle, foi significativa ($p < 0,001$).

O marcador tumoral GCDFP-15 apresentou imunoexpressão considerada como positiva em nove dos 25 pacientes (36,0%) com carcinoma mamário metastático no estômago, baixa sensibilidade (36,0%), alta especificidade (100,0%) e acurácia de grau médio (61,9%). Seu nível de expressão, quando comparado ao respectivo grupo controle, foi significativa ($p < 0,001$).

O marcador tumoral HNF4A apresentou imunoexpressão considerada como positiva em 17 dos 17 pacientes (100,0%) com adenocarcinoma gástrico primário, e em um paciente com carcinoma mamário metastático no estômago, alta sensibilidade (100,0%), alta especificidade (96,0%) e alta acurácia (97,6%). Seu nível de expressão, quando comparado ao respectivo.

5 DISCUSSÃO

5.1 RELEVÂNCIA DA PERGUNTA DA PESQUISA

Existem poucos estudos publicados sobre metástase gástrica de origem mamária, sendo que a maioria deles classifica o adenocarcinoma gástrico como primário ou metastático de acordo com a avaliação da morfologia tumoral realizada pelo patologista.^(5,6,8,36) Estudos mais recentes, no entanto, utilizaram a IHQ com marcadores específicos, porém pouco sensíveis, o que dificulta a conclusão diagnóstica e a orientação do tratamento adequado.^(9,11,23,24)

O diagnóstico diferencial entre a metástase gástrica com o adenocarcinoma gástrico primário é muito difícil quando se utiliza métodos convencionais como os clínicos, radiológicos e endoscópicos.⁽¹¹⁾

A diferenciação entre pacientes com carcinoma metastático e pacientes com dois carcinomas primários de origem gástrica e mamária é importante, tanto para o prognóstico como para o tratamento; além disto dois carcinomas primários associados podem ser indicativos de carcinogênese de natureza hereditária, particularmente em pacientes jovens, o que implica orientação oncológica terapêutica diferente.⁽²⁴⁾

Os pacientes com carcinoma da mama metastático são mais frequentemente tratados com quimioterapia enquanto que aqueles com adenocarcinoma gástrico primário requerem um estadiamento prévio para o tratamento cirúrgico adequado.

Recentemente o HNF4A foi demonstrado como altamente específico na diferenciação entre metástase gástrica de origem mamária e adenocarcinoma gástrico primário, em virtude do seu envolvimento no metabolismo das células do endoderma visceral, o que permite a sua identificação, por IHQ, no estômago, intestino, fígado e pâncreas mas não na grande maioria de outros órgãos como, por exemplo, as mamas e os ovários.⁽²³⁾

Nosso objetivo, nesta investigação, foi determinar a sensibilidade e a especificidade do HNF4A nos carcinomas primários da mama e do estômago e avaliar a sua importância na diferenciação entre carcinoma gástrico primário e metastático em uma série de casos de pacientes com carcinoma na mama e no estômago.

Consideramos desta forma a nossa pergunta de pesquisa de alta relevância, pois a sua resposta pode permitir a consolidação da possibilidade de uso de uma ferramenta diagnóstica mais confiável, contribuindo sobremaneira na atenção à saúde destes pacientes.

5.2 A BAIXA PREVALÊNCIA DA METÁSTASE DO CÂNCER MAMÁRIO NO ESTÔMAGO E O SEU MECANISMO

As metástases de carcinoma mamário no tubo digestivo podem ser consideradas como raras, variando de 0,3% em séries retrospectivas até 8,0%-18,0% em séries de autopsias; quando ocorrem, no entanto, a sua localização preferencial é o estômago. A maioria dos autores concorda que a baixa prevalência pode estar subestimada em todos os estudos, pois pacientes com sintomas inespecíficos podem não ter sido investigados e o IHQ para identificação da doença metastática, realizado através de marcadores biológicos, não foram utilizado na maioria dos estudos inicialmente publicados na literatura. De acordo com Koyama et al. a metástase gástrica pode ser a primeira manifestação do câncer de mama.⁽²³⁾

A metástase do câncer de mama para o estômago é um evento que contém no seu modelo de disseminação alguns aspectos característicos que, em frequentes situações, costumam dificultar o diagnóstico e a conduta. Dessa forma Cormier et al., em 1980, que descreveram pela primeira vez a linite plástica do estômago como lesão metastática de um carcinoma lobular infiltrante da mama, referem que em etapas mais precoces da invasão da parede gástrica as lesões aparecem como placas nodulares ou polipóides isoladas da submucosa, o que permitiu a estes autores interpretar estes achados como uma disseminação de células tumorais envolvendo progressivamente todas as camadas da parede do estômago cuja mucosa pode ser poupada no início. Interessante observar que neste modelo de disseminação a biopsia superficial da mucosa gástrica pode levar a resultados falso-negativos em até 50,0% dos casos.⁽⁸³⁾ Na lesão avançada o câncer gástrico primário e o metastático da mama no estômago podem apresentar o mesmo quadro clínico, endoscópico e radiológico, o que pode não permitir o diagnóstico diferencial acurado dessas lesões. Neste contexto, os autores propuseram um algoritmo IHQ, empregando sucessivamente anticorpos selecionados CK-20, CK-7, RE, RP e GCDFP-15.^(17,84)

5.3 MODELO DE PESQUISA

Este estudo de natureza retrospectiva, utiliza procedimentos de análise da expressão IHQ de proteínas relacionadas a origem tumoral, em pacientes com diagnóstico de carcinoma mamário e adenocarcinoma gástrico, para se determinar a origem primária ou metastática do carcinoma no estômago.

Os marcadores tumorais investigados foram selecionados baseando-se em estudos anteriores. O foco desta investigação é identificar marcadores tumorais com maior sensibilidade e especificidade no diagnóstico diferencial entre metástase gástrica de origem mamária e adenocarcinoma gástrico primário.

O agrupamento dos pacientes, conforme o diagnóstico inicial de carcinoma mamário primário, adenocarcinoma gástrico primário e metástase gástrica de origem mamária a ser determinada, permitiu estruturar um modelo de pesquisa analítica, ou seja, onde este último grupo designado como teste é controlado pelos dois outros considerados como de referência.

A análise da composição desses grupos de pacientes, estruturados conforme critérios prévios de inclusão e exclusão, demonstrou não ocorrer diferenças significantes entre eles quando se consideraram variáveis gerais de natureza clínico-patológicas; o resultado conferiu homogeneidade aos grupos analisados e deu sustentação à comparabilidade dos mesmos, minimizando-se, desta forma, possíveis tendenciosidades de processo de amostragem.

O tamanho amostral analisado não foi previamente estimado mas, quando se compara este estudo com a literatura pertinente de primeira ordem, verifica-se que podemos dispor, em virtude do potencial de atendimento do INCA, Hospital do Câncer III, Rio de Janeiro, de um número considerável de pacientes, o que pôde, certamente, conferir maior poder estatístico para demonstrar eventuais diferenças entre os desfechos primários investigados. Os achados significantes desta investigação comprovam esta assertiva.

5.4 PROCEDIMENTOS EMPREGADOS E POSSÍVEIS VIESES

Esse estudo utilizou blocos de parafina armazenados no Departamento de Patologia do INCA-DIPAT há vários anos, não tendo sido identificado dificuldade

técnica no preparo das lâminas e coloração, o que está de acordo com o relatado por Engel e Moore, que identificaram 62 variáveis que influenciam os resultados da IHQ, e concluíram que 15 fatores incluindo a demora na fixação, tipo e concentração do fixador, pH, tempo de fixação, reagentes e condições de desidratação, reagente de limpeza, temperatura e duração da inclusão em parafina, de secagem e armazenamento, eram capazes de impactar um teste IHQ.⁽⁸⁵⁾ Em contraste, 12 fatores incluindo a proporção de tecido fixado, tipo de processador, tipo de parafina, duração da lavagem pós-fixação, número e posição das amostras durante a desidratação e a duração do armazenamento em bloco de parafina, não têm influência sobre o ensaio de IHQ.⁽⁸²⁾

Considerando-se a complexidade do exame por método de IHQ, é importante ressaltar que este estudo utilizou anticorpos monoclonais, o que aumenta significativamente a especificidade de diagnóstico, realizando recuperação antigênica, que torna possível executar mais eficazmente ensaios de IHQ em tecido fixados em formalina e parafina e considerou positiva apenas a expressão nuclear para o RE, RP e HNF4A e a citoplasmática para o GCDFP-15.

Nesta investigação tentamos minimizar os efeitos dessas causas possíveis de vieses com base em várias pesquisas anteriores sobre biomarcadores e suas correlações diagnósticas e prognósticas e na qualidade do serviço que utilizamos, o laboratório do Departamento de Patologia do INCA-DIPAT, setor altamente reconhecido nesta atividade, com protocolos de coleta e armazenamento de amostras biológicas.

Acreditamos que, do ponto de vista metodológico, as citadas possibilidades de vieses puderam ser evitadas ou minimizadas pela condução da investigação clínica de maneira adequada e/ou pela análise apropriada dos dados obtidos, princípios classicamente apontados na epidemiologia clínica.

5.5 MARCADORES TUMORAIS SELECIONADOS

5.5.1 *Hepatocyte nuclear factor 4-alpha*

Todos os estudos que incluíram o HNF4A na análise IHQ para o diagnóstico diferencial entre câncer gástrico primário e metástase gástrica de origem mamária

encontraram resultados semelhantes. Desta forma o HNF4A é considerado como expresso no tecido gástrico normal e neoplásico e não apresenta expressão no tecido mamário.

No presente estudo todos os 42 casos de adenocarcinoma gástrico primários do grupo Controle II, apresentaram expressão nuclear difusa e de forte intensidade do HNF4A, e nenhum dos 42 casos de carcinoma mamário primário, grupo Controle I (tumor localizado na mama), expressaram HNF4A, em concordância com os resultados de Koyama et al. e van der Post et al.^(23,24) A mucosa gástrica normal circunjacente (controle interno) nos casos negativos, também apresentava coloração de HNF4A, indicando que a qualidade e a fixação da amostra estavam adequadas.

No grupo Teste, dos 17 pacientes apresentando dois carcinomas primários, na mama e no estômago, 16 eram CDI no carcinoma primário da mama. Todos os carcinomas primários do estômago foram positivos para HNF4A com expressão difusa em 12 e limitada em 6, enquanto que todos os carcinomas mamários primários foram negativos para HNF4A. Entre as 25 metástases gástricas de carcinoma mamário, uma apresentou expressão do HNF4A, com controle interno positivo, RE, RP e GCDFP-15 negativo. Treze foram diagnosticados como do tipo CLI (52,0%) no carcinoma primário da mama.

A interpretação destes resultados sugere que, os marcadores atualmente conhecidos que apresentam-se expressos no carcinoma mamário, apesar de específicos, apresentam sensibilidade variável no poder discriminatório entre metástase mamária no estômago e a lesão gástrica primária. A introdução do HNF4A à IHQ diagnóstica da metástase gástrica de origem mamária vem demonstrando especificidade e sensibilidade ideais, com significância estatística e, principalmente, possibilidade de aplicação na prática clínica. Da mesma forma, como o fenômeno da carcinogênese se integra pela ação simultânea de vários genes, com diferentes funções, a expressão IHQ de suas proteínas, deve ser do ponto de vista fisiopatológico, um parâmetro de referência seguro no processo de diagnóstico de lesões gástricas secundárias ou não.

5.5.2 Receptor de estrógeno e receptor de progesterona

O RE e RP somente apresentam expressão na metástase gástrica de origem mamária, se o carcinoma mamário primário for RH positivo, o que ocorre em 75,0% a 80,0% com o RE e 20,0% a 30,0% com o RP, o que compromete a sensibilidade diagnóstica destes marcadores. Além disso, estudos recentes relacionados ao prognóstico e ao tratamento têm comprovado a presença do RE-A e RE-B no carcinoma gástrico, o que poderia diminuir mais ainda as especificidades desses marcadores. Alguns estudos demonstraram expressão de RE-B, mas não do RE-A no câncer gástrico primário, enquanto outros demonstraram que o RE-A também está expresso no câncer gástrico.^(47,59,86,87)

A expressão do RE-A no carcinoma gástrico demonstra acentuada variabilidade (0-65,0%) nos diferentes estudos publicados, principalmente porque a leitura da imunorreação realizada nesses estudos tem diferentes critérios e a imunointensidade fraca da expressão do RE-A no câncer gástrico considerada positiva por alguns pode gerar resultados inconsistentes entre os estudos.⁽⁶¹⁾ No estudo de Wang et al., o RE-A marcador de expressão nuclear, foi considerado positivo quando detectado no citoplasma e com expressão fraca, confirmando que a interpretação dos resultados da análise IHQ é variável.⁽⁶²⁾ No estudo de Zhao et al. a coloração citoplasmática também foi considerada positiva, embora a coloração nuclear seja a específica.⁽¹³⁾ Já no estudo de van Velthuisen et al., Koyama et al. e van der Post et al., assim como no presente estudo, utilizando anticorpos de segunda geração, que agora são rotineiramente utilizados na prática da patologia cirúrgica para detectar RE, nenhum dos carcinomas gástricos primários expressou RE-A, podendo ser usado de forma confiável para diagnosticar metástase de carcinoma gástrico, quando o carcinoma mamário primário é RE positivo.^(23,24,67)

O RE-A e RP neste estudo não demonstraram expressão em nenhum carcinoma gástrico primário, tanto no grupo Teste como no grupo Controle II. No carcinoma mamário primário do grupo Teste a expressão foi de 85,7% (36/42) e 76,2% (32/42), respectivamente; e nas metástases gástricas de origem mamária também no grupo Teste foi de 48,0% (12/25) e 24,0% (6/25), respectivamente. No grupo Controle I, a expressão foi de 83,3% (35/42) e 73,3% (31/42) respectivamente; com especificidade de 100,0%. Seis pacientes com carcinoma

mamário primário em 42 do grupo Teste e 7 em 42 pacientes no grupo Controle I eram RH negativos, não sendo possível realizar o diagnóstico da metástase gástrica através destes dois marcadores. Além disto, o número de metástases gástricas de origem mamária RH negativa é maior que no carcinoma primário da mama, e no presente estudo corresponderam a 13 (25) das metástases do grupo Teste que foram RE e RP negativo.

Achamos que a imunoexpressão destes marcadores hormonais nos grupos analisados pode ser considerada como boa, mas ainda não o suficiente para considerá-los como determinantes do diagnóstico diferencial entre carcinoma da mama metastático no estômago e adenocarcinoma primário gástrico, principalmente em carcinoma mamário triplo-negativo ou receptor hormonal negativo. Quanto à inserção destes marcadores, no entanto, entendemos que são importantes; outros estudos com padronização metodológica mais adequada devem ser realizados, para dirimir as dúvidas e controvérsias da literatura correlata.

5.5.3 *Gross cystic disease fluid protein-15*

Embora alguns estudos tenham demonstrado expressão de GCDFP-15 em carcinomas de origem não mamária, a taxa de expressão é muito menor do que no carcinoma mamário, e não encontramos relatos de expressão no adenocarcinoma gástrico.⁽⁴⁴⁾ Portanto, o GCDFP-15 é considerado marcador específico para o carcinoma mamário, mas pode não estar presente em todos os casos. Ainda no mesmo estudo, os autores comparam a expressão do GCDFP-15 e da MAM no carcinoma mamário primário, a expressão de GCDFP-15 no carcinoma mamário infiltrante foi de 30,6%, resultado comparável a outros estudos que utilizaram *tissue microarray*, mas inferior aos resultados obtidos quando o espécime tumoral era examinado de forma mais abrangente e não pontualmente quando se utiliza a técnica de *tissue microarray* (70,0%).

Em nosso estudo o GCDFP-15 apresentou expressão em 54,8% (23/42) no carcinoma mamário primário do grupo Teste e 36% (9/25) nas metástases gástricas de origem mamária também no grupo Teste e em 35,7% (15/42), no grupo Controle I. Não houve expressão do GCDFP-15 em nenhum adenocarcinoma gástrico primário, tanto no grupo Teste como no grupo Controle II, com especificidade de

100,0%. Três casos que eram negativos no carcinoma mamário primário apresentaram expressão na metástase gástrica de origem mamária, como tem sido descrito na literatura.^(44,68)

5.6 RESULTADOS OBTIDOS NESTA INVESTIGAÇÃO

Embora examinado em um número limitado de amostras de carcinomas metastáticos, a expressão IHQ do HNF4A foi negativa em todos os casos, exceto um que apresentou expressão fortemente positiva. Esse caso era RE, RP e GCDFP-15 negativos.

O HNF4A apresentou expressão em todos os casos de adenocarcinoma gástrico primário e foi negativo em todos os casos de carcinoma mamário primário, o que também ocorreu no estudo de Koyama et al. e van der Post et al., sugerindo que a identificação da expressão do HNF4A em tecido tumoral exclui a origem mamária, pois de acordo com esse e outros estudos o tecido mamário normal e neoplásico não tem expressão de HNF4A.^(23,24)

5.7 IMPLICAÇÕES PARA A PRÁTICA MÉDICA

No diagnóstico diferencial em uma paciente com lesão gástrica e carcinoma mamário primário, sincrônicos ou metacrônicos, o estudo de IHQ deve incluir o HNF4A, além dos RE e RP, mais comuns na prática médica, principalmente em casos de carcinoma mamário RH negativos cujas metástases também serão RH negativas. No presente estudo 13 em 25 metástases gástrica de origem mamária eram RH negativas e destes apenas uma apresentou expressão do GCDFP-15, ou seja, apenas 13 casos de metástases gástricas poderiam ser diagnosticados com o estudo IHQ incluindo os três marcadores.

Futuramente, com novos estudos de validação com amostras maiores, o HNF4A tem o potencial de ser utilizado isoladamente como marcador no diagnóstico diferencial, para confirmar ou excluir a presença de metástase gástrica de origem mamária.

Somente após o diagnóstico correto podemos iniciar o tratamento sistêmico adequado para carcinoma mamário metastático ou tratamento cirúrgico no adenocarcinoma gástrico primário. O prognóstico dessas pacientes ainda é incerto, mas com todo o armamento terapêutico utilizado no carcinoma mamário, a sobrevida dessas pacientes tem aumentado. A abordagem terapêutica adequada provavelmente terá efeito na sobrevida, especialmente se não existirem outros locais de metástases.

5.8 IMPLICAÇÕES PARA A PESQUISA

Para dar maior consistência aos nossos achados, investigações semelhantes poderiam ser conduzidas e, posteriormente, outros estudos com desenhos de validação clínica poderiam, então, ser implementados. Considerando-se o potencial número atual de marcadores biológicos, essas tarefas de investigação constituem um verdadeiro desafio na produção do conhecimento desta área de atenção à saúde.

Outro enfoque que sugerimos para continuidade na investigação deste tema é o sequenciamento de DNA do tipo *next-generation* nestes pacientes, que se apresenta atualmente como uma inovação tecnológica excelente, oportuna e desafiadora. Sua introdução na prática médica, como uma alternativa ao sequenciamento convencional, já vem sendo utilizada e pode representar a integração definitiva multidisciplinar no processo de orientação terapêutica no câncer mamário.⁽⁷⁷⁾

5.9 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O HNF4A é um marcador muito útil na diferenciação do adenocarcinoma gástrico primário e carcinoma mamário metastático no estômago, com uma sensibilidade de 100,0% e uma especificidade de 96,0%.

A expressão de RE, RP e GCDFP-15 pode ser útil, uma vez que nenhum dos carcinomas gástricos primários apresentou expressão destes marcadores. No entanto, uma vez que parte dos carcinomas mamários primários é negativo para RE, RP, e GCDFP-15, a ausência de marcação para estes anticorpos não exclui o carcinoma mamário.

Esses resultados sugerem que HNF4A pode ser um novo marcador útil no diagnóstico diferencial entre adenocarcinoma gástrico primário e metástase gástrica de carcinoma mamário, pois o HNF4A foi capaz isoladamente de distinguir todos os carcinomas gástricos primários e de carcinoma mamário metastático confirmando a origem gástrica da doença.

6 CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta investigação podemos concluir que:

1. A expressão conjunta dos marcadores RE, RP, GCDFP-15 e HNF4A pode ser considerada como efetiva na diferenciação diagnóstica entre o câncer gástrico primário e a metástase gástrica de origem mamária.
2. O marcador HNF4A, em particular, se mostrou como de maior acurácia na diferenciação entre o câncer gástrico primário e a metástase gástrica de origem mamária, conferindo maior efetividade diagnóstica a este painel de marcadores.

REFERÊNCIAS

1. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil [Internet]. Rio de Janeiro: INCA; 2015. [citado 2015, Set. 21]. Portuguese. Available in: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>
2. Arpino G, Bardou VJ, Clark GM, Elledge RM. Infiltrating lobular carcinoma of the breast: Tumor characteristics and clinical outcome. *Breast Cancer Res.* 2004;6(3):R149-56.
3. Carcoforo P, Raiji MT, Langan RC, Lanzara S, Portinari M, Maestroni U, et al. Infiltrating lobular carcinoma of the breast presenting as gastrointestinal obstruction: A mini review. *J Cancer.* 2012;3:328-32.
4. Lucarelli AP, Martins MM, Oliveira VM, Silva M, Guedes JM, Rinaldi JF, et al. HER2 protein overexpression in infiltrating ductal carcinoma of the breast associated with lymph node involvement. *Am J Appl Sci.* 2008;6(3):445-8.
5. Taal BG, Peterse H, Boot H. Clinical presentation, endoscopic features, and treatment of gastric metastases from breast carcinoma. *Cancer.* 2000;89(11):2214-21.
6. McLemore EC, Pockaj BA, Reynolds C, Gray RJ, Hernandez JL, Grant CS, et al. Breast cancer: Presentation and intervention in women with gastrointestinal metastasis and carcinomatosis. *Ann Surg Oncol.* 2005;12(11):886-94.
7. Aurello P, D'Angelo F, Cosenza G, Petrocca S, Stoppacciaro A, Ramacciato G, et al. Gastric metastasis 14 years after mastectomy for breast lobular carcinoma: case report and literature review. *Am Surg.* 2006;72(5):456-60.
8. De Palma GD, Masone S, Rega M, Simeoli I, Donisi M, Addeo P, Iannone L, Pilone V, Persico G. Metastatic tumors to the stomach: Clinical and endoscopic features. *World J Gastroenterol.* 2006;12(45):7326-8.
9. Pectasides D, Psyrri A, Pliarchopoulou K, Floros T, Papaxoinis G, Skondra M, et al. Gastric metastases originating from breast cancer: Report of 8 cases and review of the literature. *Anticancer Res.* 2009;29(11):4759-63.
10. Critchley AC, Harvey J, Carr M, Iwuchukwu O. Synchronous gastric and colonic metastases of invasive lobular breast carcinoma: Case report and review of the literature. *Ann R Coll Surg Engl.* 2011;93(5):e49-50.
11. Almubarak MM, Laé M, Cacheux W, de Cremoux P, Pierga JY, Reyat F, et al. Gastric metastasis of breast cancer: A single centre retrospective study. *Dig Liver Dis.* 2011;43(10):823-7.
12. Ambroggi M, Stroppa EM, Mordenti P, Biasini C, Zangrandi A, Michieletti E, et al. Metastatic breast cancer to the gastrointestinal tract: Report of five cases and review of the literature. *Int J Breast Cancer.* 2012;2012: 439023.
13. Zhao L, Yang X, Khan A, Kandil D. Diagnostic role of immunohistochemistry in the evaluation of breast pathology specimens. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(1):16-24.

14. Tan L, Piao Y, Liu Z, Han T, Song F, Gao F, et al. Breast cancer metastasis to the stomach confirmed using gastroscopy: A case report. *Oncol Lett*. 2014;8(3):1205-7.
15. Barroso-Sousa R, Metzger-Filho O. Differences between invasive lobular and invasive ductal carcinoma of the breast: Results and therapeutic implications. *Ther Adv Med Oncol*. 2016;8(4):261-6.
16. Cheng YC, Ueno NT. Improvement of survival and prospect of cure in patients with metastatic breast cancer. *Breast Cancer*. 2012;19(3):191-9.
17. Ciulla A; Castronovo G; Tomasello G; Maiorana AM; Russo L; Daniele E, et al. Gastric metastases originating from occult breast lobular carcinoma: Diagnostic and therapeutic problems. *World J Surg Oncol*. 2008;6:78.
18. Eo WK. Breast cancer metastasis to the stomach resembling early gastric cancer. *Cancer Res Treat*. 2008;40(4):207-10.
19. Arrangoiz R, Papavasiliou P, Dushkin H, Farma JM. Case report and literature review: Metastatic lobular carcinoma of the breast an unusual presentation. *Int J Surg Case Rep*. 2011;2(8):301-5.
20. Namikawa T, Hanazaki K. Clinicopathological features and treatment outcomes of metastatic tumors in the stomach. *Surg Today*. 2014;44(8):1392-9.
21. Yamamoto D, Yoshida H, Sumida K, Ueyama Y, Kanematsu S, Shoji T, et al. Gastric tumor from metastasis of breast cancer. *Anticancer Res*. 2010;30(9):3705-8.
22. Bosolino A, Cravero A, Ratto R. Gastric metastases: Not only identified at autopsies. *Acta Gastroenterol Latinoam*. 2013;43(4):316-20.
23. Koyama T, Sekine S, Taniguchi H, Tsuda H, Ikegami M, Hano H, et al. Hepatocyte nuclear factor 4A expression discriminates gastric involvement by metastatic breast carcinomas from primary gastric adenocarcinomas. *Hum Pathol*. 2011;42(11):1777-84.
24. Van der Post RS, Bult P, Vogelaar IP, Ligtenberg MJ, Hoogerbrugge N, van Krieken JH. HNF4A immunohistochemistry facilitates distinction between primary and metastatic breast and gastric carcinoma. *Virchows Arch*. 2014;464(6):673-9.
25. Trouillet N, Robert B, Charfi S, Bartoli E, Joly JP, Chatelain D. Gastric metastases. An endoscopic series of ten cases. *Gastroenterol Clin Biol*. 2010;34(4-5):305-9.
26. Gerova VA, Tankova LT, Mihova AA, Drandarska IL, Kadian HO. Gastrointestinal metastases from breast cancer: Report of two cases. *Hepatogastroenterology*. 2012;59(113):178-81.
27. Dumoulin FL, Sen Gupta R. Breast cancer metastasis to the stomach resembling small benign gastric polyps. *Gastrointest Endosc*. 2009;69(1):174-5.

28. Hara F, Kiyoto S, Takabatake D, Takashima S, Aogi K, Ohsumi S, et al. Metastatic breast cancer to the stomach resembling early gastric cancer. *Case Rep Oncol*. 2010; 3(2):142-7.
29. Brandi G, Campadelli E, Nobili E, Leone O. Breast carcinoma presenting as linitis plastica. *Dig Liver Dis*. 2010;42(4):306.
30. Abid A, Moffa C, Monga DK. Breast cancer metastasis to the GI tract may mimic primary gastric cancer. *J Clin Oncol*. 2013;31(7):e106-7.
31. Doval DC, Pande SB, Sharma JB, Khatri S, Khurana AK, Vaid AK, et al. Metastatic signet-ring cell gastric carcinoma masquerading as breast primary. *Case Rep Gastroenterol*. 2009;3(1):21-5.
32. Terada T. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: I. Cytokeratin profile in 42 cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(4):703-10.
33. Terada T. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: II. Expression of MUC1, MUC2, MUC5AC, and MUC6 in normal mucosa and in 42 cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(4):613-21.
34. Terada T. An immunohistochemical study of primary signet-ring cell carcinoma of the stomach and colorectum: III. Expressions of EMA, CEA, CA19-9, CDX-2, p53, Ki-67 antigen, TTF-1, vimentin, and p63 in normal mucosa and in 42 cases. *Int J Clin Exp Pathol*. 2013;6(4):630-8.
35. Gregoire C, Muller G, Machiels JP, Goeminne JC. Metastatic signet-ring cell carcinoma of unknown primary origin. *Acta Clin Belg*. 2014;69(2):135-8.
36. Oda I, Kondo H, Yamao T, Saito D, Ono H, Gotoda T, Yamaguchi H, Yoshida S, Shimoda T. Metastatic tumors to the stomach: Analysis of 54 patients diagnosed at endoscopy and 347 autopsy cases. *Endoscopy*. 2001;33(6):507-10.
37. Jones GE, Strauss DC, Forshaw MJ, Deere H, Mahedeva U, Mason RC. Breast cancer metastasis to the stomach may mimic primary gastric cancer: Report of two cases and review of literature. *World J Surg Oncol*. 2007;5 :75.
38. Koike K, Kitahara K, Higaki M, Urata M, Yamazaki F, Noshiro H. Clinicopathological features of gastric metastasis from breast cancer in three cases. *Breast Cancer*. 2014 Sep; 21(5):629-34.
39. Panis C, Pizzatti L, Herrera AC, Cecchini R, Abdelhay E. Putative circulating markers of the early and advanced stages of breast cancer identified by high-resolution label-free proteomics. *Cancer Lett*. 2013;330(1):57-66.
40. Panis C, Pizzatti L, Herrera AC, Corrêa S, Binato R, Abdelhay E. Label-free proteomic analysis of breast cancer molecular subtypes. *J Proteome Res*. 2014;13(11):4752-72.

41. Panis C, Pizzatti L, Corrêa S, Binato R, Lemos GF, Herrera AC, et al. The positive is inside the negative: HER2-negative tumors can express the HER2 intracellular domain and present a HER2-positive phenotype. *Cancer Lett.* 2015;357(1):186-95.
42. Panis C, Pizzatti L, Bufalo AC, Herrera AC, Victorino VJ, Cecchini R, Abdelhay E. Early downregulation of acute phase proteins after doxorubicin exposition in patients with breast cancer. *Tumour Biol.* 2016;37:3775-83.
43. Yang H, Guan L, Li S, Jiang Y, Xiong N, Li L, Wu C, Zeng H, Liu Y. Mechanosensitive caveolin-1 activation-induced PI3K/Akt/mTOR signaling pathway promotes breast cancer motility, invadopodia formation and metastasis *in vivo*. *Oncotarget.* 2016;7(13):16227-47.
44. Luo MH, Huang YH, Ni YB, Tsang JY, Chan SK, Shao MM, Tse GM. Expression of mammaglobin and Gross cystic disease fluid protein-15 in breast carcinomas. *Hum Pathol.* 2013;44(7):1241-50.
45. Zaha DC. Significance of immunohistochemistry in breast cancer. *World J Clin Oncol.* 2014;5(3):382-92.
46. Darb-Esfahani S, von Minckwitz G, Denkert C, Ataseven B, Högel B, Mehta K, et al. Gross cystic disease fluid protein 15 (GCDFP-15) expression in breast cancer subtypes. *BMC Cancer.* 2014;14 :546.
47. Sun W, Gu C, Xia M, Zhong G, Song H, Guo J. Significance of estrogen receptor subtypes in breast tumorigenesis and progression. *Tumour Biol.* 2014;35(9):9111-7.
48. Schink JC, Trosman JR, Weldon CB, Siziopikou KP, Tsongalis GJ, Rademaker AW, et al. Biomarker testing for breast, lung, and gastroesophageal cancers at NCI designated cancer centers. *J Natl Cancer Inst.* 2014;106(10): dju256.
49. Rakhshani N, Daryakar A. Are mammaglobin and GCDFP-15 sensitive markers for diagnosis of metastatic basal-like triple negative breast carcinomas? *Türk Patoloji Derg.* 2014;30(1):18-22.
50. Dennis JL, Hvidsten TR, Wit EC, Komorowski J, Bell AK, Downie I, et al. Markers of adenocarcinoma characteristic of the site of origin: Development of a diagnostic algorithm. *Clin Cancer Res.* 2005;11(10):3766-72.
51. Wong HH, Chu P. Immunohistochemical features of the gastrointestinal tract tumors. *J Gastrointest Oncol.* 2012;3(3):262-84.
52. Asch MJ, Wiedel PD, Habif DV. Gastrointestinal metastases from carcinoma of the breast. Autopsy study and 18 cases requiring operative intervention. *Arch Surg.* 1968;96(5):840-3.
53. Taal BG, Boot H, van Heerde P, de Jong D, Hart AA, Burgers JM. Primary non-Hodgkin lymphoma of the stomach: endoscopic pattern and prognosis in low versus high grade malignancy in relation to the MALT concept. *Gut.* 1996;39(4):556-61.

54. Taal BG, den Hartog Jager FCA, Steinmetz R, Peterse H. The spectrum of gastrointestinal metastases of breast carcinoma: II. The colon and the rectum. *Gastrointest Endosc.* 1992a;38(2):136-41.
55. Taal BG, den Hartog Jager FCA, Steinmetz R, Peterse H. The spectrum of gastrointestinal metastases of breast carcinoma: I. Stomach. *Gastrointest Endosc* 1992b;38(2):130-5.
56. Tanaka T, Jiang S, Hotta, H, Takano K, Iwanari H, Sumi K, et al. Dysregulated expression of P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α in the pathogenesis of human cancer. *J Pathol.* 2006;208(5):662-72.
57. Yao D, Peng S, Dai C. The role of hepatocyte nuclear factor 4 α in metastatic tumor formation of hepatocellular carcinoma and its close relationship with the mesenchymal-epithelial transition markers. *BMC Cancer.* 2013;13 :432.
58. Babeu JP, Boudreau F. Hepatocyte nuclear factor 4- α involvement in liver and intestinal inflammatory networks. *World J Gastroenterol.* 2014;20(1):22-30.
59. Takano K, Hasegawa G, Jiang S, Kurosaki I, Hatakeyama K, Iwanari H, et al. Immunohistochemical staining for P1 and P2 promoter-driven hepatocyte nuclear factor-4 α may complement mucin phenotype of differentiated-type early gastric carcinoma. *Pathol Int.* 2009; 59(7):462-70.
60. Warner M, Nilsson S, Gustafsson JA. The estrogen receptor family. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 1999;11(3):249-54.
61. Ryu WS, Kim JH, Jang YJ, Park SS, Um JW, Park SH, et al. Expression of estrogen receptors in gastric cancer and their clinical significance. *J Surg Oncol.* 2012;106(4):456-61.
62. Wang Y, Yao M, Yang J. NIM: A node influence based method for cancer classification. *Comput Math Methods Med.* 2014;2014:826373.
63. Krasinskas AM, Goldsmith JD. Immunohistology of the gastrointestinal tract. In: Dabbs DJ, editors. *Diagnostic immunohistochemistry: Theranostic and genomic applications.* 4th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; 2014. p. 508-39.
64. Moura Ramos EH, Martinelli S, Silva I, Nazário A, Facina G, Costa A, et al. Association between estrogen receptor gene polymorphisms and breast density in postmenopausal women. *Climacteric.* 2009;12(6):490-501.
65. Gown AM, Fulton RS, Kandalaft PL. Markers of metastatic carcinoma of breast origin. *Histopathology.* 2016;68(1):86-95.
66. O'Connell FP, Wang HH, Odze RD. Utility of immunohistochemistry in distinguishing primary adenocarcinomas from metastatic breast carcinomas in the gastrointestinal tract. *Arch Pathol Lab Med.* 2005;129(3):338-47.
67. Van Velthuisen ML, Taal BG, van der Hoeven JJ, Peterse JL. Expression of oestrogen receptor and loss of E-cadherin are diagnostic for gastric metastasis of breast carcinoma. *Histopathology.* 2005;46(2):153-7.

68. Huo L, Zhang J, Gilcrease MZ, Gong Y, Wu Y, Zhang H, et al. Gross cystic disease fluid protein-15 and mammaglobin A expression determined by immunohistochemistry is of limited utility in triple-negative breast cancer. *Histopathology*. 2013;62(2):267-74.
69. Wendroth SM, Mentrikoski MJ, Wick MR. GATA3 expression in morphologic subtypes of breast carcinoma: a comparison with gross cystic disease fluid protein 15 and mammaglobin. *Ann Diagn Pathol*. 2015;19(1):6-9.
70. Fiel MI, Cernaianu G, Burstein DE, Batheja N. Value of GCdFP-15 (BRSt-2) as a specific immunocytochemical marker for breast carcinoma in cytologic specimens. *Acta Cytol*. 1996;40(4):637-41.
71. Bhargava R, Beriwal S, Dabbs DJ. Mammaglobin vs GCDFP-15: An immunohistologic validation survey for sensitivity and specificity. *Am J Clin Pathol*. 2007;127(1):103-13.
72. Chia SY, Thike AA, Cheok PY, Tan PH. Utility of mammaglobin and gross cystic disease fluid protein-15 (GCDFP-15) in confirming a breast origin for recurrent tumors. *Breast*. 2010;19(5):355-9.
73. Kandalaft PL, Simon RA, Isacson C, Gown AM. Comparative sensitivities and specificities of antibodies to breast markers GCDFP-15, mammaglobin A, and different clones of antibodies to GATA-3: A study of 338 tumors using whole sections. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2015. [Epub ahead of print].
74. Edge SB, Carolyn CC, editors. *AJCC cancer staging manual*. 7th ed. New York, NY: Springer; 2010.
75. Ricci MD, Calvano Filho CM, Oliveira Filho HR, Filassi JR, Pinotti JA, Baracat EC. Analysis of the concordance rates between core needle biopsy and surgical excision in patients with breast cancer. *Rev Assoc Med Bras*. 2012;58(5):532-6.
76. Lakhani SR, Ellis IO, Schnitt SJ, Tan, PH, van de Vijver MJ, editors. Vol. 4, *WHO classification of tumours of the breast*. 4th. Lyon: IARC Press; 2012.
77. Hamilton SR, Bosman FT, Boffetta P, Ilyas M, Morreau H, Nakamura SI, et al. Carcinoma of the colon and rectum. In: Bosman FT, Carneiro F, Hruban RH, Theise ND, editors. Vol. 3, *WHO classification of tumors of the digestive system*. Lyon: IARC Press; 2010. p. 131-82.
78. 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.
79. Nash JW, Morrison C, Frankel WL. The utility of estrogen receptor and progesterone receptor immunohistochemistry in the distinction of metastatic breast carcinoma from other tumors in the liver. *Arch Pathol Lab Med*. 2003;127(12):1591-5.

80. Takeda Y, Tsuta K, Shibuki Y, Hoshino T, Tochigi N, Maeshima AM, et al. Analysis of expression patterns of breast cancer-specific markers (mammaglobin and gross cystic disease fluid protein 15) in lung and pleural tumors. *Arch Pathol Lab Med.* 2008;132(2):239-43.
81. Hammond ME, Hayes DF, Dowsett M, Allred DC, Hagerty KL, Badve S, et al. American Society of Clinical Oncology/College of American Pathologists guideline recommendations for immunohistochemical testing of estrogen and progesterone receptors in breast cancer. *Arch Pathol Lab Med.* 2010;134(6):907-22.
82. Lin F, Chen Z. Standardization of diagnostic immunohistochemistry literature review and geisinger experience. *Arch Pathol Lab Med.* 2014;138(12):1564-77.
83. Cormier WJ, Gaffey TA, Welch JM, Welch JS, Edmonson JH. Linitis plastica caused by metastatic lobular carcinoma of the breast. *Mayo Clin Proc.* 1980;55(12):747-53.
84. Castronovo G, Tomasello G, Maiorana AM, Russo L, Daniele E, Genova G. Gastric metastases originating from breast lobular carcinoma: diagnostic and therapeutic problems. *World J Surg Oncol.* 2008;6 :78.
85. Engel KB, Moore HM. Effects of preanalytical variables on the detection of proteins by immunohistochemistry in formalin-fixed, paraffin-embedded tissue. *Arch Pathol Lab Med.* 2011;135(5):537-43.
86. Xu CY, Guo JL, Jiang ZN, Xie SD, Shen JG, Shen JY, et al. Prognostic role of estrogen receptor alpha and estrogen receptor beta in gastric cancer. *Ann Surg Oncol.* 2010;17(9):2503-9.
87. Pilgrim SM, Painand SJ, Tischkowitz MD. Opportunities and challenges of next-generation DNA sequencing for breast units. *Br J Surg.* 2014;101(8):889-98.

ANEXOS

Anexo 1 – Financiamento Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – Processo n. E-26/110.664/2012.

 FAPERJ GOVERNO DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO SECRETARIA DE ESTADO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA FAPERJ - Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro		FAPERJ Processo Nº E-26 _____ Data: ____/____/____ Fls. ____ Rubrica: _____	
TERMO DE OUTORGA E ACEITAÇÃO DE AUXÍLIO		Rio de Janeiro, 11/05/2012,	
Nº DO PROCESSO E-26/110.664/2012		Nº DE MATRÍCULA 1989.0932.8	
		Parcela: 1	
PROGRAMA	Edital 19/2011 - Pensa Rio		
PROJETO	Do Conhecimento Científico a Assistência a População: Implantando a Pesquisa Translacional para o Controle do Câncer		
OUTORGANTE	Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro		
OUTORGADO	Eliana Saul Furquim Werneck Abdelhay		
ENDEREÇO	Rua Fonte da Saudade, 165, apto 202 Lagoa RJ 22471-210 E-MAIL eabdelhay@inca.gov.br		
	Rio de Janeiro TEL. 2506-6691		
INSTITUIÇÃO	INCA - Instituto Nacional do Câncer		
UNIDADE	Centro de Transplante de Medula Óssea		
DEPARTAMENTO	Divisão de Laboratórios do CEMO		
PLANO DE APLICAÇÃO			
CUSTEIO		56.661,00	
Mat. Consumo Nacionais			53.328,00
Serv. Terc. Pessoa Jurídica			3.333,00
CAPITAL		56.661,00	
EQ. e Mat. Perm. Nacionais			56.661,00
TOTAL			113.322,00
REPRESENTANTE DA INSTITUIÇÃO: Diretor do Departamento			
RELATÓRIO(S) CIENTÍFICO(S)		O prazo máximo para apresentação do relatório científico é de 60 (sessenta) dias, a partir do prazo estipulado para o desenvolvimento do projeto (execução orçamentária) – 36 (trinta e seis) meses	
PRESTAÇÃO DE CONTAS		O prazo máximo para prestação de contas é de 60 (sessenta) dias, a partir do prazo estipulado para o desenvolvimento do projeto (execução orçamentária) – 36 (trinta e seis) meses (com devolução de saldo, se houver)	
Declaro que os dados acima foram conferidos por mim nesta data, estando os mesmos corretos.			
Rio, 29 de Maio de 2012.			
 Assinatura			
Avenida Erasmo Braga, 118 – 6º Andar – Centro – Rio de Janeiro, CEP 20020-000			

Anexo 2 – Ficha de coleta de dados

FICHA DE DADOS

PRONTUÁRIO: _____

DATA DA MATRÍCULA: __/__/__

TELEFONE: _____

DATA DO NASCIMENTO: __/__/__

NOME: _____

IDADE NO DIAGNÓSTICO: ____ ANOS

CÂNCER DE MAMA: DATA DO DIAGNÓSTICO: __/__/__

BILATERAL: ☐ SIM ☐ NÃO

TIPO HISTOLÓGICO: ☐ CDI ☐ CLI

GRAU: ☐ I ☐ II ☐ III

RE: ☐ POSITIVO ☐ NEGATIVO

RP: ☐ POSITIVO ☐ NEGATIVO

HER2: ☐ POSITIVO ☐ NEGATIVO

ESTADIAMENTO: ☐ T1 ☐ T2 ☐ T3 ☐ T4 N: _____

QT NEO: ☐ SIM ☐ NÃO

HT: ☐ SIM ☐ NÃO

RXT: ☐ SIM ☐ NÃO

CÂNCER GÁSTRICO:

DATA DO DIAGNÓSTICO: __/__/__

TIPO HISTOLÓGICO: Adenocarcinoma ☐ GI ☐ GII ☐ GIII ☐ ANEL DE SINETE

RE: ☐ POSITIVO ☐ NEGATIVO

RP: ☐ POSITIVO ☐ NEGATIVO

OUTROS: _____

ESTADIAMENTO: ☐ T1 ☐ T2 ☐ T3 ☐ T4 N: _____

TRATAMENTO CIRÚRGICO: ☐ SIM ☐ NÃO

TIPO DE CIRURGIA: ☐ GST ☐ GT

QT NEO: ☐ SIM ☐ NÃO

OUTROS SÍTIOS DE METÁSTASE:

OSSO ☐ SIM ☐ NÃO FÍGADO ☐ SIM ☐ NÃO

PERITONEO ☐ SIM ☐ NÃO CÉREBRO ☐ SIM ☐ NÃO

GINECO ☐ SIM ☐ NÃO

OUTROS:

METÁSTASSE GÁSTRICA ISOLADA: ☐ SIM ☐ NÃO

ÚLTIMA AVALIAÇÃO: __/__/__

DOENÇA CONTROLADA: ☐ SIM ☐ NÃO

ÓBITO: ☐ SIM ☐ NÃO

DATA: __/__/__

Anexo 3 – Aprovação dos Comitês de Ética em Pesquisa do Instituto Nacional de Câncer e da Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo. Plataforma Brasil, Parecer n. 226.117.



INSTITUTO NACIONAL DE
CÂNCER/ INCA/ RJ



COMPROVANTE DE ENVIO DO PROJETO

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ANÁLISE COMPARATIVA DO PERFIL MOLECULAR DE BRCA1 E BRCA2 E DE MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS NO CARCINOMA MAMÁRIO E NOS RESPECTIVOS SÍTIOS DE METÁTASE GÁSTRICA E SEGUNDO PRIMÁRIO GÁSTRICO

Pesquisador: Patrícia Chaves de Freitas Campos Jucá

Versão: 6

CAAE: 12390213.3.0000.5274

Instituição Proponente: Hospital do Câncer III

DADOS DO COMPROVANTE

Número do Comprovante: 072351/2015

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ

Endereço: RUA DO RESENDE, 128 - SALA 203

Bairro: CENTRO

CEP: 20.231-092

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3207-4550

Fax: (21)3207-4556

E-mail: cep@inca.gov.br

Anexo 4 - Dados clínicos e patológicos dos pacientes inseridos no estudo

QUADRO GERAL - DADOS CLÍNICOS E PATOLÓGICOS DOS PACIENTES INSERIDOS NESTE ESTUDO

ID	Prontuário	Gênero	Idade (anos)	Localização do tumor	Origem do tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Estágio TNM	QT Neo	Seguimento	Óbito	RE	RP	HNF4A	GCDFP-15
1	1355711	F	67	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	3,6	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
2	1389347	F	47	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	<1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
3	1246213	F	74	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	7,2	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
4	1308738	F	72	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	2,7	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
5	1311678	F	68	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2	I	Não	48,7	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
6	1197326	F	72	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	8,7	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
7	1310632	F	49	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	126,7	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
8	1316941	F	76	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2		Não	11,3	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
9	1316757	F	44	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	9,3	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
10	1323366	F	66	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2		Não	25,7	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
11	1379625	F	65	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	67,0	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
12	1302051	F	76	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2	II	Não	8,7	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
13	1318391	F	46	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2	I	Não	129,0	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
14	1323407	F	48	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	32,7	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
15	1309170	F	61	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2	III	Não	23,1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
16	1308813	F	62	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	<1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
17	1322681	F	62	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	II	Não	49,2	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
18	1354909	F	78	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	2,5	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
19	1308917	F	48	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	147,3	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
20	1308859	F	43	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	2,7	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
21	1307883	F	62	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	<1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
22	1367629	F	68	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	10,6	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo

Continua...

ID	Prontuário	Gênero	Idade (anos)	Localização do tumor	Origem do tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Estágio TNM	QT Neo	Seguimento	Óbito	RE	RP	HNF4A	GCDFP-15
23	1249083	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	6,3	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
24	1304996	F	65	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	95,1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
25	1365807	F	51	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	5,9	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
26	1309029	F	77	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	2,0	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
27	1314466	F	54	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2	I	Não	61,3	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
28	1305035	F	44	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	132,7	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
29	1310941	F	46	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	12,3	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
30	1309823	F	60	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	4,8	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
31	1366545	F	63	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	II	Não	35,2	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
32	1367044	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	94,0	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
33	1376502	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	40,9	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
34	1375839	F	62	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	58,1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
35	1367567	F	76	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	4,9	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
36	3450616	F	46	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	52,8	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
37	1366644	F	52	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	II	Não	31,5	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
38	1372423	F	72	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	141,8	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
39	1376804	F	66	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2	III	Não	29,2	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
40	1387989	F	68	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	97,2	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
41	1702772	F	65	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	64,4	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
42	1358664	F	31	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	8,6	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
43	3469555	F	70	Mama	Primário	CDI	2	I	Não	66,7	S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
44	3468824	F	29	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	136,3	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
45	3469964	F	56	Mama	Primário	CDI	2	III	Não	22,1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
46	3468914	F	69	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	102,6	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
47	3470351	F	40	Mama	Primário	CDI	3	III	Não	15,4	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
48	3470595	F	69	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	53,4	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Continua...

ID	Prontuário	Gênero	Idade (anos)	Localização do tumor	Origem do tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Estágio TNM	QT Neo	Seguimento	Óbito	RE	RP	HNF4A	GCDFP-15
49	3467491	F	53	Mama	Primário	CDI	3	III	Não	123,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
50	3468421	F	27	Mama	Primário	CDI	3	III	Não	186,4	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
51	3469972	F	75	Mama	Primário	CDI	2	I	Não	175,6	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
52	3467436	F	53	Mama	Primário	CDI	3	III	Sim	32,2	S	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
53	3467941	F	30	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	29,1	S	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
54	3469884	F	56	Mama	Primário	CDI	2	III	Não	180,6	N	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
55	3470690	F	44	Mama	Primário	CDI	2	III	Não	178,3	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
56	3469973	F	73	Mama	Primário	CDI	3	III	Sim	30,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
57	3468786	F	48	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	181,2	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
58	3467170	F	56	Mama	Primário	CDI	3	III	Sim	184,7	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
59	3469687	F	75	Mama	Primário	CDI	2	I	Não	59,2	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
60	3470239	F	52	Mama	Primário	CDI	3	I	Não	154,4	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
61	3296637	F	64	Mama	Primário	CDI	2	III	Sim	43,6	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
62	3470113	F	73	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	175,4	N	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
63	3471797	F	28	Mama	Primário	CDI	3	III	Não	9,9	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
64	3470294	F	46	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	66,1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
65	3472116	F	43	Mama	Primário	CDI	3	III	Sim	174,1	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
66	3471232	F	52	Mama	Primário	CDI	3	II	Não	153,8	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
67	3471418	F	66	Mama	Primário	CDI	3	II	Não	144,1	N	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
68	3471294	F	81	Mama	Primário	CDI	2	III	Não	140,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
69	3471233	F	80	Mama	Primário	CDI	3	II	Não	97,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
70	3476702	F	72	Mama	Primário	CLI	2	III	Não	152,5	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
71	3471272	F	54	Mama	Primário	CLI	2	III	Não	35,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
72	3478280	F	56	Mama	Primário	CLI	2	I	Não	101,8	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
73	3477746	F	45	Mama	Primário	CLI	2	III	Não	135,1	N	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
74	3474137	F	44	Mama	Primário	CLI	2	III	Sim	32,8	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo

Continua...

ID	Prontuário	Gênero	Idade (anos)	Localização do tumor	Origem do tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Estágio TNM	QT Neo	Seguimento	Óbito	RE	RP	HNF4A	GCDFP-15
75	3477589	F	72	Mama	Primário	CLI	2	I	Não	148,8	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
76	3477873	F	72	Mama	Primário	CLI	2	II	Não	59,8	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
77	3073489	F	75	Mama	Primário	CLI	2	I	Não	97,8	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
78	3476362	F	43	Mama	Primário	CLI	2	II	Não	73,6	N	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
79	3475331	F	44	Mama	Primário	CLI	2	III	Sim	157,8	N	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
80	3466069	F	71	Mama	Primário	CLI	2	II	Não	163,7	S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
81	2061552	F	87	Mama	Primário	CLI	2	III	Sim	49,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
82	3474266	F	46	Mama	Primário	CLI	2	III	Não	159,8	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
83	3471645	F	63	Mama	Primário	CLI	2	II	Não	88,9	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
84	3469377	F	69	Mama	Primário	CLI	3	III	Sim	4,7	S	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
85	3460507	F	73	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	49,6	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
86	5071135	F	38	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	32,2	S	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
87	5031776	F	93	Mama	Primário	CDI	2	III	Não	75,8	S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
88	3487383	F	63	Mama	Primário	CLI	2	IV	Não	25,1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
89	5020107	F	42	Mama	Primário	CDI	3	II	Não	69,7	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
90	1266715	F	68	Mama	Primário	CDI	3	II	Não	13,1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
91	5073365	F	45	Mama	Primário	CLI	2	II	Não	47,7	N	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
92	3367987	F	56	Mama	Primário	CLI	2	III	Sim	143,6	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
93	3446876	F	72	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	155,9	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
94	3473659	F	59	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	75,3	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
95	5054371	F	47	Mama	Primário	CLI	1	III	Sim	72,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
96	5044667	F	56	Mama	Primário	CDI	3	II	Sim	7,3	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
97	5002954	F	79	Mama	Primário	CDI	1	I	Não	89,3	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
98	3494501	F	62	Mama	Primário	CDI	2	III	Não	30,5	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
99	3491027	F	60	Mama	Primário	CDI	3	I	Não	67,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
100	2058022	F	38	Mama	Primário	CDI	2	IV	Não	162,5	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Continua...

ID	Prontuário	Gênero	Idade (anos)	Localização do tumor	Origem do tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Estágio TNM	QT Neo	Seguimento	Óbito	RE	RP	HNF4A	GCDFP-15
101	3470255	F	65	Mama	Primário	CDI	3	IV	Não	54,1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
102	3494712	F	63	Mama	Primário	CLI	3	IV	Sim	104,8	N	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
103	3479511	F	46	Mama	Primário	CDI	3	II	Sim	105,1	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
104	3484973	F	62	Mama	Primário	CLI	2	II	Não	159,3	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
105	3487953	F	34	Mama	Primário	CDI	2	III	Sim	150,4	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
106	5041567	F	61	Mama	Primário	CDI	2		Não	1,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
107	5029199	F	47	Mama	Primário	CDI	3	III	Sim	34,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
108	3484698	F	63	Mama	Primário	CDI	3	II	Não	32,3	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
109	3486877	F	37	Mama	Primário	CLI	2	II	Não	131,3	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
110	1201527	F	44	Mama	Primário	CLI	3	III	Sim	147,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
111	5036266	F	48	Mama	Primário	CLI	2	III	Não	43,8	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
112	3490934	F	53	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	60,5	S	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
113	3491917	F	61	Mama	Primário	CLI	3	III	Não	41,4	S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
114	3478569	F	42	Mama	Primário	CLI	3	III	Sim	91,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
115	5050446	F	47	Mama	Primário	CLI	2	III	Sim	33,2	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
116	3490676	F	63	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	15,4	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
117	5012285	F	58	Mama	Primário	CDI	2	I	Não	24,1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
118	3492552	F	63	Mama	Primário	CDI	2	II	Não	87,4	S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
119	5012776	F	64	Mama	Primário	CLI	2	IV	Não	10,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
120	3479390	F	63	Mama	Primário	CDI	3	I	Não	90,0	N	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
121	5039962	F	62	Mama	Primário	CDI	3	III	Sim	13,3	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
122	5092168	F	47	Mama	Primário	CDI	3	I	Não	25,9	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
123	5052034	F	52	Mama	Primário	CDI	2	III	Não	71,2	N	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
124	3492089	F	56	Mama	Primário	CDI	3	II	Não	50,5	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
125	3491222	F	39	Mama	Primário	CLI	2	III	Não	112,4	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
126	5050425	F	44	Mama	Primário	CLI	2	III	Não	43,7	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo

Continua...

ID	Prontuário	Gênero	Idade (anos)	Localização do tumor	Origem do tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Estágio TNM	QT Neo	Seguimento	Óbito	RE	RP	HNF4A	GCDFP-15
85	3460507	F	75	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2		Não	26,5	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
86	5071135	F	39	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	II	Não	10,2	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
87	5031776	F	99	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2		Não	10,8	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
88	3487383	F	65	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	<1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
89	5020107	F	47	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	17,7	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
90	1266715	F	65	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	50,4	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
91	5073365	F	48	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	7,2	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
92	3367987	F	68	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	<1	S	Positivo	Positivo	Negativo	Negativo
93	3446876	F	81	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	III	Não	54,4	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
94	3473659	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	I	Não	12,8	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
95	5054371	F	53	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	2,4	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
96	5044667	F	57	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	<1	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
97	5002954	F	86	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	2,0	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
98	3494501	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	II	Não	6,1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
99	3491027	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	28,1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
100	2058022	F	51	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	6,1	S	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
101	3470255	F	67	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	23,9	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
102	3494712	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2	II	Não	99,8	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
103	3479511	F	54	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	1,3	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
104	3484973	F	65	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	123,6	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
105	3487953	F	43	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	40,3	N	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
106	5041567	F	61	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	1,2	S	Negativo	Negativo	Negativo	Positivo
107	5029199	F	49	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	3,8	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
108	3484698	F	65	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	3,2	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
109	3486877	F	46	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	13,5	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
110	1201527	F	53	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	32,0	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo

Continua...

ID	Prontuário	Gênero	Idade (anos)	Localização do tumor	Origem do tumor	Tipo histológico	Grau histológico	Estágio TNM	QT Neo	Seguimento	Óbito	RE	RP	HNF4A	GCDFP-15
111	5036266	F	48	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	43,3	S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo
112	3490934	F	54	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	53,7	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
113	3491917	F	64	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	11,6	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
114	3478569	F	47	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	27,7	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
115	5050446	F	48	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	14,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
116	3490676	F	64	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	II	Não	1,3	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
117	5012285	F	60	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	1,1	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
118	3492552	F	63	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3	II	Não	85,8	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
119	5012776	F	63	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	25,0	S	Positivo	Positivo	Negativo	Positivo
120	3479390	F	69	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	3		Não	12,0	N	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
121	5039962	F	59	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	49,7	S	Negativo	Negativo	Negativo	Negativo
122	5092168	F	49	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	9,4	S	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
123	5052034	F	52	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	3		Não	70,7	N	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
124	3492089	F	60	Estômago	Primário	Adenocarcinoma	2		Não	1,4	S	Negativo	Negativo	Positivo	Negativo
125	3491222	F	46	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	22,7	S	Positivo	Negativo	Negativo	Positivo
126	5050425	F	47	Estômago	Metastático	Adenocarcinoma	2		Não	12,8	S	Positivo	Negativo	Negativo	Negativo

Legenda: identificação do paciente (ID); T, tumor primário, N, linfonodos, M metástase (TNM); quimioterapia neoadjuvante (QT Neo); receptor de estrogênio (RE); receptor de progesterona (RP); *hepatocyte nuclear factor 4-alpha* (HNF4A); *gross cystic disease fluid protein-15* (GCDFP-15).

BIBLIOGRAFIA CONSULTADA

Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6024: informação e documentação – numeração progressiva das seções de um documento escrito – apresentação. Rio de Janeiro: ABNT; 2003. 2p.

Bacelar S, Galvão CC, Alves E, Tubino P. Expressões médicas: falhas e acertos. Rev Med Res. 2012;14(4):265-269. Portuguese.

Biblioteca Virtual em Saúde. Descritores em Ciências da saúde [Internet]. São Paulo: BIREME/OPAS; 2004 [cited 2015 Jan 25]. Available from: <http://decs.bvs.br/vmx.htm>

Fletcher RH, Fletcher SW, Fletcher GS. Clinical epidemiology: The essentials. 5nd ed. Baltimore, MD: Lippincott Williams & Wilkins, 2014.

Houaiss AV, Salles M. Dicionário Houaiss da Língua Portuguesa. Rio de Janeiro: Objetiva; 2001. Portuguese.

Patrias K. Citing medicine: The NLM style guide for authors, editors, and publishers [Internet]. 2nd ed. Wendling DL, technical editor. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US); 2007 [updated 2015 Oct 2]. Available from: <http://www.nlm.nih.gov/citingmedicine>

Rother ET, Braga MER. Como elaborar sua tese: estrutura e referências. 2^a ed. São Paulo: BIREME; 2005. Portuguese.